

## KARAKTERISASI PATOGEN HAWAR DAUN BAKTERI SECARA FENOTIPIK PADA BAWANG MERAH (*ALLIUM CEPA L.* KELOMPOK AGGREGATUM)

### Phenotypic Characterization of Bacterial Leaf Blight Pathogens on Shallot (*Allium cepa L.* Aggregatum group)

Asrul<sup>1)</sup>, Triwidodo Arwiyanto<sup>2)</sup>, Bambang Hadisutrisno<sup>2)</sup> dan Jaka Widada<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Fakultas Pertanian Universitas Tadulako, Kota Palu. Jln. Soekarno Hatta KM 5 Palu Timur, Kota Palu.  
E-mail: asrul1203@gmail.com

<sup>2)</sup>Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Jln. Flora 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

#### ABSTRACT

The research aimed at determining the types of pathogen associated with bacterial leaf blight diseases of shallots. The bacteria were isolated and characterized based on the morphological, biochemical and physiological morphology of their colony and cell. There were eight isolates of pathogenic bacteria from pure culture. Generally, the isolates have Gram-negative characters, short rod-shaped cells, have peritrikus flagellum and mucoid, yellow or beige colonies, round, convex or flat forms, and is shiny. The isolates react positively to catalase, urease, levan, indole production, and tween 8 tests. They also can live at temperature between 20 – 37<sup>0</sup>C, pH 5 – 7 and tolerant to NaCl content ranging from 0 – 8.5%. The isolates react negatively to oxidases, reduce nitrates, fluorescent pigments, arginine, gelatin and starch. Based on these characteristics, the isolates found generally have a closer resemblance to the properties of *P. ananatis* with a similarity coefficient of 88% than bacteria *X. axonopodis* pv. *allii* with a similarity coefficient of 78%. The symptoms appeared in the plant leaves were wilted (water soaked), shrinking, curving down, chlorosis, necrosis, and dieback.

**Keywords:** Bacterial leaf blight, *Pantoea ananatis*, Shallot, and *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*.

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jenis patogen yang berasosiasi dengan bawang merah sakit hawar daun bakteri. Penelitian dilakukan dengan metode isolasi dan karakterisasi bakteri berdasarkan sifat morfologi koloni dan sel bakteri, serta biokimiawi dan fisiologis. Hasil isolasi dan karakterisasi diperoleh 8 isolat murni bakteri patogenik yang berasosiasi dengan bawang merah sakit. Umumnya isolat memiliki sifat gram negatif, sel berbentuk batang pendek, mempunyai flagel peritrikus, koloni berwarna kuning, atau krem, berbentuk bundar, cembung, rata, *mucoid* dan mengkilap. Isolat bereaksi positif terhadap uji katalase, urease, levan, produksi indol, tween 80, dapat hidup pada suhu antara 20 - 37<sup>0</sup>C, pH 5 - 7 dan toleran pada kandungan NaCl 0 - 8,5%. Isolat bereaksi negatif terhadap oksidase, reduksi nitrat, pigmen fluorescen, arginine, gelatin dan pati. Berdasarkan sifat-sifat tersebut, isolat yang ditemukan umumnya memiliki kemiripan lebih dekat dengan sifat-sifat bakteri *P. ananatis* (koefisien kemiripan 88%) dibanding bakteri *X. axonopodis* pv. *allii* (koefisien kemiripan 78%). Gejala yang ditimbulkan berupa daun layu kebasah-basahan (*water soaked*), mengkerut, melekok kebawah, klorosis, nekrosis, dan mati pucuk.

**Kata Kunci:** Bacterial leaf blight, *Pantoea Ananatis*, Shallot dan *Xanthomonas axonopodis* pv. *Allii*.

## PENDAHULUAN

Hawar daun bakteri (*bacterial leaf blight*) merupakan salah satu penyakit penting pada bawang sayuran (genus *Allium*), seperti bawang bombay (*Allium cepa* L) di seluruh dunia. Penyakit ini disebabkan oleh *Xanthomonas axonopodis* pv. *Allii* (*Xaa*) dan *Pantoea ananatis* (*Pa*) (Schwartz *et al.*, 2003). Kedua bakteri patogenik mempunyai tipe gejala yang hampir sama, yakni daun tampak kebasah-basahan (*water soaked*), layu, terdapat bercak klorosis dan nekrosis. Pada hawar daun *Xanthomonas*, bercak nekrosis berwarna coklat (Schwartz & Gent, 2005) dan serangan patogen tidak menyebabkan busuk pada umbi (Gent *et al.*, 2005), sedangkan hawar daun *Pantoea*, bercak nekrosis berwarna putih (Goszczyńska *et al.*, 2006) dan menimbulkan busuk pada umbi (*center rot disease*) (Schwartz *et al.*, 2003; Eric *et al.*, 2013).

Gejala penyakit bawang bombay memiliki kemiripan dengan gejala hawar daun bakteri yang pernah terlihat di sentra produksi bawang merah (*Allium cepa* L. kelompok agregatum) dan bawang wakegi (*Allium × wakegi* Araki) di Indonesia, yakni daun kebasah-basahan dan layu seperti tersiram air panas, atau berbekas minyak tetapi belum diketahui secara jelas spesies bakteri patogeniknya. Diduga patogennya telah berada di Indonesia melalui perdagangan benih impor dari mancanegara. Bakteri *Xaa* dan *Pa* diketahui sebagai patogen terbawa benih (Roumagnac *et al.*, 2004; Walcott *et al.*, 2002), sehingga benih menjadi media yang cocok bagi perpindahan bakteri patogenik tersebut. Ini berarti peluang masuk dan menyebarnya bakteri patogenik menjadi besar. Duriat *et al.* (2004) pernah melakukan identifikasi patogen pada sampel umbi bawang merah impor di Pulau Jawa, tetapi tidak ditemukan adanya serangan patogen dari kelompok bakteri. Oleh karena itu, penelitian identifikasi patogen saat ini lebih diarahkan pada sampel daun bawang merah sakit di lapangan berdasarkan gejala yang diduga menyerupai hawar daun bakteri.

Identifikasi bakteri patogenik dapat dilakukan dengan pendekatan konvensional

(karakterisasi fenotipik). Sampai saat ini penggunaan metode konvensional masih dipercaya untuk digunakan dalam identifikasi bakteri patogenik, terutama dalam kondisi teknologi yang terbatas. Karakterisasi fenotipik penting dilakukan untuk memberi gambaran mengenai morfologis koloni dan sel, maupun sifat-sifat fisiologis dan biokimiawi bakteri patogenik yang menjadi target. Menurut Duveiller *et al.* (1997), pengujian fisiologis dan biokimiawi merupakan metode konvensional yang masih dapat digunakan untuk identifikasi bakteri patogenik. Pendekatan konvensional ini dianggap telah cukup digunakan untuk mengidentifikasi bakteri karena dengan pengujian tersebut sudah dapat membedakan sifat-sifat penting dari suatu spesies bakteri patogenik dengan spesies lainnya. Pengujian sederhana ini dapat juga digunakan untuk mengetahui identitas suatu bakteri patogenik sampai pada tingkat spesies. Identifikasi perlu dilakukan agar dapat membantu usaha pengendalian yang tepat terhadap spesies yang bersangkutan dalam rangka mendukung keberhasilan kegiatan budidaya bawang merah. Karakterisasi fenotipik (konvensional) ini bertujuan untuk menentukan jenis patogen yang berasosiasi dengan bawang merah sakit hawar daun bakteri.

## METODE PENELITIAN

**Pengambilan sampel.** Pengambilan sampel bawang yang menunjukkan gejala hawar daun bakteri dilakukan pada bulan Agustus – September tahun 2014 saat memasuki akhir musim kemarau di sentra produksi bawang merah (Kabupaten Bantul, Ciribon, Tegal, Nganjuk) dan bawang wakegi (Kabupaten Sigi) di Indonesia. Terdapat delapan sampel daun bawang merah sakit yang diambil dengan rincian: Bantul (2), Ciribon (3), Sigi (1), Tegal (1) dan Nganjuk (1). Selanjutnya, sampel dimasukkan dalam kantong plastik, kemudian ditempatkan dalam *ice box* dan diuji di laboratorium.

**Isolasi dan Pengamatan Morfologi Bakteri.** Isolasi bakteri patogenik dilakukan dengan memotong jaringan daun pada batas antara yang bergejala (sakit) dan sehat

menggunakan skalpel steril (ukuran 0,5 x 0,5 cm). Potongan daun disterilkan melalui perendaman dalam larutan alkohol 70% selama 1 menit, kemudian dibilas dalam air steril sebanyak 3 kali, dan dikeringanginkan diatas kertas filter kering. Selanjutnya, potongan daun dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi larutan PBS (*Phospat Buffer Saline*) steril dan digojok agar ooze (massa bakteri) dari jaringan sakit keluar. Suspensi yang terbentuk kemudian digoreskan (Goszczyńska *et al.*, 2007) pada permukaan medium YPGA (*Yeast Peptone Glucose Agar*) (Janse, 2005) padat menggunakan ooze (sebelumnya medium telah ditambahkan sikloheksimid 100 ppm). Koloni yang tumbuh secara tunggal dengan karakteristik berbentuk bundar, cembung, tepi rata, berlendir (*mucoïd*), berwarna kuning atau krem, dipindahkan ke medium YPGA segar beberapa kali menggunakan metode gores dan diinkubasi selama 3 - 5 hari hingga diperoleh isolat murni dari biakan tersebut. Selanjutnya 8 isolat patogen yang berasal dari delapan sampel dari lokasi yang berbeda dikarakterisasi. Karakteristik morfologis koloni yang diamati meliputi bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni, kepekatan, wajah permukaan, halus-kasar permukaan, warna koloni dan pigmen fluoresen, sedangkan pengamatan morfologi sel meliputi bentuk dan ukuran sel bakteri menggunakan mikroskop transmisi elektron (TEM).

**Uji Reaksi Hipersensitif.** Uji reaksi hipersensitif dilakukan dengan menginjeksikan suspensi sel bakteri pada ruang antar sel daun bunga pukul 4 (*Mirabilis jalapa*) (Hibberd *et al.*, 1996) menggunakan alat suntik tanpa jarum hingga membentuk lapisan kebasah-basahan (*water soaked*) dan nekrotik. Pengamatan perkembangan gejala nekrotik antara 24 – 72 jam setelah injeksi.

**Uji Postulat Koch.** Suspensi disiapkan dengan cara menumbuhkan biakan murni isolat patogen hasil isolasi yang telah dikulturkan selama 48 jam, kemudian ditambahkan air steril sampai suspensi menjadi keruh, atau diencerkan hingga mencapai konsentrasi  $10^7$ . Suspensi sel bakteri patogenik diinokulasikan ke daun bawang

menggunakan metode semprot menurut Nunez *et al.* (2002) yang telah dimodifikasi.

**Uji Patogenisitas pada Umbi.** Delapan isolat bakteri patogenik yang berhasil diisolasi dari lapang diinokulasikan ke daun bawang sehat dan setelah menunjukkan gejala hawar daun bakteri kemudian digunakan dalam uji patogenisitas pada umbi bawang menggunakan metode injeksi menurut Schwartz & Otto (2000) yang telah dimodifikasi. Perkembangan gejala penyakit dimonitor setiap hari sejak umbi diinjeksi sampai muncul gejala, kemudian dibelah untuk visualisasi patogenisitas patogen dan umbi yang menunjukkan gejala penyakit dicatat. Dalam uji patogenisitas ini, isolat bakteri patogenik yang diuji pada umbi berasal dari jenis bawang merah yang sama.

**Pengujian Sifat-sifat Fisiologis dan Biokimiawi.** Uji fisiologis dan biokimiawi menggunakan sistem pendekatan, yaitu hasil yang diperoleh dari penelitian dibandingkan dengan hasil deskripsi bakteri sebelumnya. Uji ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik isolat patogen berdasarkan reaksi biokimiawi, antara lain uji gram, uji OF, uji oksidase, uji katalase, uji indol dan uji penggunaan sumber karbon.

**Analisis Data.** Hasil uji fisiologis dan biokimiawi semua isolat patogen digunakan sebagai sumber data kemudian dikonversi ke dalam bentuk data biner, yakni bila hasil uji biokimia bereaksi positif maka diberi nilai 1 dan bila bereaksi negatif mendapat nilai 0. Selanjutnya, data yang diperoleh dimasukkan kedalam program komputer *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSys) versi 2.00 untuk penyusunan dendogram (Ogunjobi *et al.*, 2010). Hasil pengujian semua isolat patogen diperbandingkan dengan sifat-sifat bakteri *Xaa* dan *Pa* yang telah dideskripsikan sebelumnya oleh Schaad *et al.* (2001), Kadota *et al.* (2000), Roumagnac *et al.* (2004), Mergaert *et al.* (1993), Azad *et al.* (2000), Coplin & Kado (2001), dan Perez-y-Terron *et al.* (2009). Perbandingan dilakukan untuk dianalisis kemiripan sifat

antara isolat-isolat patogen yang ditemukan dengan bakteri yang telah dideskripsikan sebelumnya melalui dendogram.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi, Morfologi Koloni dan Sel Bakteri.

Hasil isolasi dan pengamatan morfologi bakteri pada medium YPGA menunjukkan bahwa semua isolat patogen uji memiliki karakteristik koloni berbentuk bundar, permukaan cembung, tepi rata, berlendir (*mucoid*), mengkilap, tekstur halus dan berwarna kuning, atau krem, tidak tembus cahaya dan koloni bakteri tidak berpondar membentuk warna kehijauan dibawah sinar ultraviolet (Gambar 1). Secara umum, karakteristik ini memiliki kesamaan baik dengan koloni bakteri *P. ananatis* (Janse, 2005; Alippi & Lopez, 2010; Zaid *et al.*, 2012) maupun *Xanthomonas* spp. (Schaad *et al.*, 2001; Rougmagnac *et al.* 2004; Mortensen *et al.*, 2011; Schumann & D'Arcy, 2010).

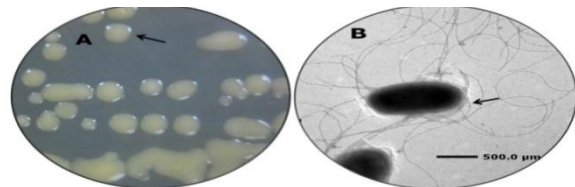
Hasil pengamatan morfologis sel menggunakan Mikroskop Elektron Transmisi (TEM) menunjukkan karakteristik sel berbentuk batang pendek, lurus dengan ukuran panjang 1,2 - 1,4  $\mu\text{m}$  dan lebar 0,6 - 0,8  $\mu\text{m}$ . Ujung sel membulat, tidak berkapsul dan tidak membentuk spora, mempunyai flagel yang dapat menggerakkan bakteri secara aktif (motil) dengan bentuk **flagel peritrikus** yang tersebar pada seluruh permukaan sel. Karakteristik isolat-isolat patogen ini umumnya memiliki kemiripan dengan sel bakteri *Pa* yang telah dilaporkan oleh Grimont & Grimont (2006) dan Mondal *et al.* (2011). Sebaliknya pada *Xaa*, sel bakteri mempunyai bentuk **flagel polar tunggal** (Schwartz & Mohan, 2008) yang menempel pada salah satu ujung selnya sehingga berbeda dengan isolat yang ditemukan.

**Uji Reaksi Hipersensitif** . Hasil uji reaksi hipersensitif menunjukkan bahwa semua isolat patogen menimbulkan respon nekrosis pada daun bunga pukul 4 (*Mirabilis jalapa*) (Gambar 2). Respon nekrosis ini merupakan karakteristik dari reaksi hipersensitif (Alarcon *et al.*, 1998). Isolat patogen yang dapat menimbulkan

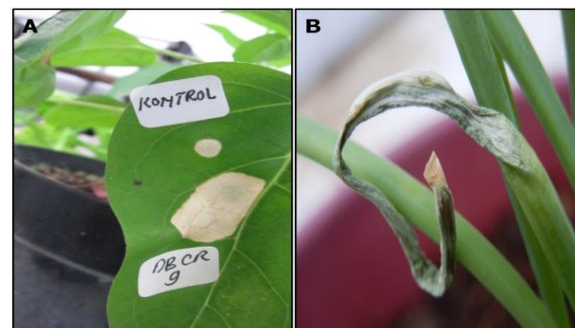
reaksi hipersensitif pada daun bunga pukul 4 merupakan bakteri yang bersifat patogen.

**Uji Postulat Koch.** Hasil uji postulat Koch pada daun bawang merah membuktikan bahwa isolat-isolat patogen uji tersebut mampu menimbulkan gejala seperti yang ditemukan di lapangan. Gejala tersebut meliputi kebasahan-basahan (*water soaked*), layu, lunak, berkerut, berwarna hijau pucat, coklat, atau hampir putih (klorosis), mengering berwarna putih atau coklat (nekrosis), dan mati pucuk (Gambar 3). Menurut Yousef (2008), uji postulat Koch dikatakan berhasil jika patogen yang diinokulasikan ke tanaman menimbulkan gejala yang serupa dengan gejala awal tanaman sakit. Gejala penyakit bawang merah ini memiliki kesamaan dengan gejala hawar daun *Pantoea* pada bawang bombay seperti yang dilaporkan oleh Goszczyńska *et al.* (2006).

Pengujian postulat Koch ini telah mendukung hasil uji reaksi hipersensitif yang menunjukkan bahwa semua isolat tersebut merupakan bakteri patogenik pada bawang merah.



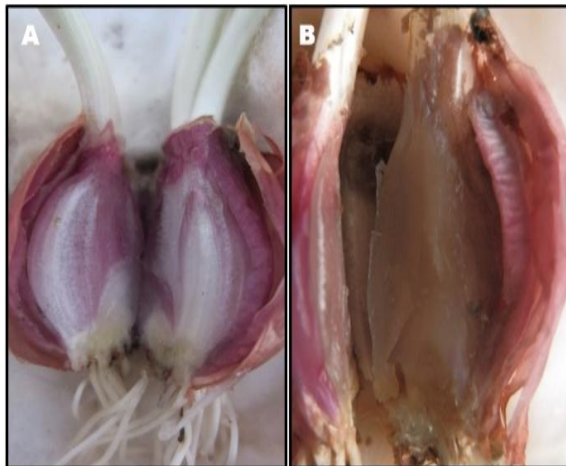
Gambar 1. Karakteristik koloni bakteri uji yang ditumbuhkan pada medium YPGA (A); Karakteristik sel bakteri uji yang diamati dengan menggunakan TEM.



Gambar 2. Uji reaksi hipersensitif: bercak nekrosis berwarna putih kecoklatan pada daun bunga pukul 4 (A); gejala *watersoaked* pada daun bawang merah (B)



Gambar 3. Uji postulat Koch: gejala hawar daun bakteri pada bawang merah di lapangan (A) mempunyai kemiripan dengan gejala di rumah kaca (B)



Gambar 4. Uji patogenisitas pada umbi bawang merah: kontrol (A), tampak gejala penyakit (B)

**Uji Patogenisitas pada Umbi.** Hasil uji patogenisitas menunjukkan bahwa bakteri patogenik asal daun bawang merah mampu menginfeksi dan menimbulkan gejala penyakit pada umbinya, sedangkan pada kontrol tidak menyebabkan gejala penyakit (Gambar 4). Gejala penyakit yang teramati berupa jaringan bagian dalam umbi yang terinfeksi menjadi lebih gelap, berwarna agak kecoklatan, lunak, agak kebasahan tetapi tidak berair, sedikit menimbulkan bau busuk, dan infeksi meluas melampaui tempat inokulasi.

Gejala tersebut memiliki kesamaan dengan gejala penyakit yang dilaporkan

oleh Schwartz & Mohan (2008) bahwa patogen penyebab penyakit hawar daun bakteri pada bawang bombay akan menginvasi umbi dan menyebabkan jaringan umbi yang terinfeksi akan melunak, berair, dan membusuk. Pembusukan terjadi kemungkinan karena kehadiran patogen sekunder atau saprofit yang menyerang bagian tanaman yang terinfeksi. Hasil penelitian Eric *et al.* (2013) menunjukkan bahwa selain menginfeksi daun bawang bombay, patogen *P. ananatis* juga dapat menyebabkan infeksi pada umbinya.

### **Analisis Hasil Uji Fisiologis dan Biokimiawi.**

Hasil uji fisiologis dan biokimiawi delapan isolat bakteri patogenik asal daun bawang merah sakit dan dua bakteri penyebab penyakit hawar daun acuan sebagai pembanding (*X. axonopodis* pv. *allii* dan *P. ananatis*) ditampilkan pada Tabel 1. Pada Tabel 1 terlihat bahwa semua isolat menunjukkan karakteristik dasar yang khas untuk spesies *P. ananatis* seperti bakteri bersifat oksidatif/fermentatif, produksi indol, dan bakteri tidak dapat menghidrolisis gelatin. Selanjutnya, hasil uji fisiologis dan biokimiawi ditransformasikan ke dalam bentuk dendrogram pada Gambar 5. Pada dendrogram terlihat bahwa seluruh isolat mempunyai koefisien kemiripan antara 78 - 100%. Isolat CR11, CR14, TG24, PL7, dan BT14 menunjukkan kemiripan sifat, atau karakteristik yang sangat identik (koefisien kemiripan 100%) dan berada dalam satu klaster yang terpisah dengan isolat lainnya. Demikian pula, isolat CR30 dan NG25 memiliki kesamaan sifat yang identik (koefisien kemiripan 100%).

Menurut Shegro *et al.* (2013), semakin tinggi nilai koefisien kemiripan maka hubungan individu-individu dalam suatu populasi semakin dekat. Oleh karena itu, isolat-isolat yang mempunyai kemiripan sifat yang identik kemungkinan berada dalam satu kelompok strain, atau spesies bakteri yang sama. Secara umum, isolat-isolat patogen asal daun memiliki kemiripan sifat sebesar 88% terhadap bakteri *Pa* dan 78% terhadap bakteri *Xaa* berdasarkan reaksi fisiologis dan biokimiawi.

Tabel 1. Karakteristik (sifat-sifat) isolat bakteri patogenik dari daun bawang merah berdasarkan uji biokimiawi dan fisiologis.

| Karakteristik bakteri | Isolat bakteri |         |         |         |   |     |     |     | A   | B |
|-----------------------|----------------|---------|---------|---------|---|-----|-----|-----|-----|---|
|                       | 1              | 2       | 3       | 4       | 5   | 6   | 7   | 8   |     |   |
| Reaksi gram           | -              | -       | -       | -       | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| Uji O-F               | O/F            | O/F     | O/F     | O/F     | O/F   | O/F | O/F | O/F | O/F | O |
| Oksidase              | -              | -       | -       | -       | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| Katalase              | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   | + |
| Urease                | +              | +       | -       | -       | +   | +   | +   | -   | -   | - |
| Reduksi nitrat        | -              | -       | +       | +       | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| Levan                 | +              | +       | +       | +       | -   | +   | +   | +   |     |   |
| Pigmen fluorescen     | -              | -       | -       | -       | -   | -   | -   | -   |     |   |
| Dehidrolase arginin   | -              | -       | -       | -       | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| Produksi indol        | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   | - |
| Hidrolisis :          |                |         |         |         |   |     |     |     |     |   |
| Gelatin               | -              | -       | -       | -       | -   | -   | -   | -   | -   | + |
| Pati                  | -              | -       | -       | -       | -   | -   | -   | -   | -   | + |
| Tween 80              | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   |   |
| Sumber karbon:        |                |         |         |         |   |     |     |     |     |   |
| Arabinosa             | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   |   |
| Selobiosa             | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   | + |
| Fruktosa              | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   | + |
| Glukosa               | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   | + |
| Sukrosa               | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   | + |
| Laktosa               | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   | + |
| Trehalosa             | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   | + |
| Sorbitol              | -              | -       | -       | -       | -   | -   | -   | -   | +   |   |
| Dulcitol              | -              | -       | -       | -       | -   | -   | -   | -   | -   |   |
| Gliserol              | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   | + |
| DL-arginin            | -              | -       | -       | -       | -   | -   | -   | -   |     |   |
| Pengaruh suhu:        |                |         |         |         |   |     |     |     |     |   |
| 4°C                   | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   |   |
| 10°C                  | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 20°C                  | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 25°C                  | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 37°C                  | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   |   |
| 41°C                  | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | -   | - |
| Pengaruh pH:          |                |         |         |         |   |     |     |     |     |   |
| 4                     | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 4,5                   | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 5                     | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 6                     | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 7                     | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 8,5                   | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 10                    | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| Pengaruh NaCl:        |                |         |         |         |   |     |     |     |     |   |
| 0                     | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 2                     | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 4                     | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   | +   | + |
| 6                     | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 8                     | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| 10                    | +              | +       | +       | +       | +   | +   | +   | +   |     |   |
| Keterangan            | =              | 1. CR11 | 4. NG25 | 7. BT14 | A. <i>Pa</i> menurut Perez-y-Terron <i>et al.</i> (2009), Azad <i>et al.</i> (2000), Mergaert <i>et al.</i> (1993) dan Coplin & Kado (2001) |     |     |     |     |   |
|                       |                | 2. CR14 | 5. TG24 | 8. BT29 | B. <i>Xaa</i> menurut Schaad <i>et al.</i> , 2001, Kadota <i>et al.</i> , 2000 Roumagnac <i>et al.</i> , 2004                               |     |     |     |     |   |
|                       |                | 3. CR30 | 6. PL7  |         |   |     |     |     |     |   |

Pada uji OF, semua isolat uji terlihat bersifat oksidatif/ fermentatif (anaerob fakultatif) yang menunjukkan bahwa bakteri dapat tumbuh dan bertahan hidup baik dalam suasana oksigen (aerob) maupun tanpa oksigen (anaerob). Dalam kondisi anaerob, bakteri dapat melakukan proses metabolisme melalui fermentasi alkohol, asam laktat, atau asam sitrat untuk menghasilkan energi. Pada fermentasi asam laktat bakteri akan mengoksidasi karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat (asam susu) dan energi (Pelczar & Chan, 2008) untuk pertumbuhannya. Bakteri *Pa* diketahui bersifat anaerob fakultatif (Mergaert *et al.*, 1993). Namun umumnya bakteri lebih cenderung melakukan metabolisme respirasi jika tersedia oksigen bebas (aerob) karena akan menghasilkan energi yang lebih besar (Pelczar & Chan, 2008). Sebaliknya, *Xaa* bersifat oksidasi (aerob) (Schaad *et al.*, 2001), yakni bakteri memerlukan O<sub>2</sub> dari udara bebas dalam melakukan proses metabolisme sel (respirasi) dengan mengoksidasi karbohidrat (glukosa) menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O, sedangkan energi yang diperoleh dari hasil oksidasi digunakan oleh bakteri tersebut (Yeung, 2011). Udara bebas diperlukan untuk memecahkan zat-zat yang diperlukan bakteri dalam hidupnya. Tanpa adanya oksigen (proses fermentasi), bakteri ini tidak dapat tumbuh.

Seluruh isolat patogen uji dapat membentuk indol sebagai sumber karbon (bereaksi positif). Menurut Coutinho & Venter (2009), bakteri *Pa* dapat memproduksi indol (Coutinho & Venter, 2009). Sebaliknya *Xaa* tidak dapat menghasilkan indol (Roumagnac *et al.*, 2004) meskipun kedua patogen merupakan penyebab penyakit hawar daun bakteri pada tanaman yang sama. Pembentukan indol ini menjadi pembeda yang sangat mendasar dalam klasifikasi antara kedua patogen. Indol merupakan senyawa yang mengandung nitrogen yang terbentuk sebagai hasil pemecahan triptofan (Mukherjee, 2010), sedangkan triptofan adalah asam amino esensial yang

dapat teroksidasi oleh aktivitas enzimatis bakteri (Cappuccino & Sherman, 2005). Pemecahan asam amino triptofan menjadi produk metabolik seperti amoniak, asam piruvat, dan indol dilakukan oleh enzim *tryptophanase* (Cappuccino & Sherman, 2005) yang merupakan hasil sekresi bakteri. Amoniak dan asam piruvat hasil pemecahan akan dimetabolisme kembali untuk menghasilkan energi, sedangkan indol tidak dimetabolisme (Benson & Brown, 2004) tetapi dimanfaatkan sebagai sumber karbon oleh sebagian bakteri (Cappuccino & Sherman, 2005). Pengujian indol sangat penting dilakukan karena tidak semua bakteri mampu menghidrolisis asam amino triptofan membentuk indol. Produksi indol bukan merupakan karakteristik yang terdapat pada setiap bakteri sehingga dapat digunakan untuk klasifikasi bakteri. Oleh karena itu, keberadaan indol pada bakteri bersifat spesifik yang mengindikasikan sifat fenotip yang khusus sehingga sangat bermanfaat untuk identifikasi bakteri.

Selanjutnya, semua isolat uji tidak dapat menghidrolisis gelatin (reaksi negatif) pada uji gelatin. Reaksi negatif juga ditunjukkan oleh *Pa* pada uji yang sama (Coplin & Kado, 2001). Hal ini menandakan bahwa bakteri tersebut tidak mampu menghasilkan enzim gelatinase dan mendegradasi gelatin menjadi asam amino. Sebaliknya, *Xaa* bereaksi positif terhadap uji gelatin (Roumagnac *et al.*, 2004; Kadota *et al.*, 2000).

Isolat CR11, CR14, TG24, PL7, dan BT14 mampu menghasilkan enzim urease dan membentuk klaster 4 (Gambar 5). Enzim urease berperan dalam menyediakan energi internal dan eksternal bakteri untuk menggunakan urea, atau hidroksi urea sebagai **sumber nitrogen** (Suhartono, 1989). Produksi enzim urease ini menjadi pembeda ke lima isolat tersebut terhadap isolat CR30, NG25, BT29, serta *Xaa* dan *Pa*. Selanjutnya, isolat CR30, NG25 dan BT29 membentuk satu kelompok tersendiri (klaster 5) dan terpisah dengan isolat lainnya berdasarkan ketidakmampuan

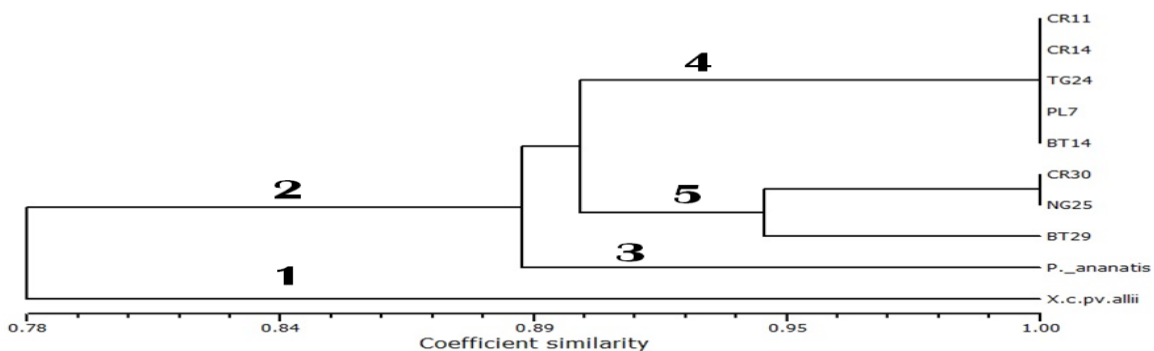
ketiga isolat tersebut menghasilkan enzim urease. Schaad *et al.* (2001) melaporkan bahwa *Xaa* (klaster 1) tidak mampu menghasilkan enzim urease, demikian pula *Pa* pada klaster 3 (Perez-y-Terron *et al.*, 2009).

Nilai positif pada penggunaan sumber karbon menunjukkan bahwa semua isolat uji mempunyai kemampuan melakukan fermentasi karbohidrat (mendegradasi gula) dan menghasilkan produk akhir berupa asam organik. Satu-satunya komponen karbohidrat yang tidak dapat digunakan sebagai sumber karbon oleh seluruh isolat uji adalah sorbitol (reaksi negatif), sedangkan bakteri pembanding *Pa* bereaksi positif terhadap sumber karbon tersebut (Coplin & Kado, 2001). Sebagian besar bakteri membutuhkan senyawa karbon organik (gula dan karbohidrat) untuk keberlangsungan hidupnya tetapi beberapa diantaranya memerlukan zat karbon dalam bentuk senyawa karbondioksida (CO<sub>2</sub>) sebagai **sumber karbon** utama. Sumber karbon dibutuhkan sebagai nutrisi untuk membentuk energi dan menyusun komponen-komponen sel (Pelczar & Chan, 2008).

Semua isolat bakteri yang diuji mampu tumbuh hingga pada suhu 41<sup>o</sup>C, tetapi telah dilaporkan bahwa *Pa* (Mergaert *et al.*, 1993) dan *Xaa* (Kadota *et al.*, 2000) tidak dapat tumbuh pada suhu tersebut. Perbedaan lingkungan habitat bakteri untuk

tumbuh dan berkembangbiak diduga menjadi penyebab terjadinya perbedaan faktor-faktor ekologi yang lain sehingga akan mempengaruhi sifat-sifat fisiologi dan biokimiawi diantara bakteri. Di Eropa dan Amerika bawang bombay banyak dibudidayakan pada kondisi iklim subtropik, sedangkan di Indonesia memiliki kondisi iklim tropik yang sangat sesuai untuk penanaman bawang merah.

Hal ini memungkinkan bakteri *Pa* di daerah tropik mampu tumbuh dan memperbanyak diri pada kondisi suhu ekstrim. Menurut Suwanto (1995), karakteristik bakteri berdasarkan sifat fenotipik seringkali berbeda karena perbedaan ekspresi gen yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Informasi yang diperoleh berdasarkan sifat fenotipik seringkali memberikan hasil yang tidak konsisten karena karakter yang terlihat bukan hanya menggambarkan informasi secara genetik tetapi juga sudah dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Berdasarkan dendogram, dapat diperkirakan bahwa semua isolat patogen yang diuji cenderung memiliki hubungan kekerabatan lebih dekat dengan spesies *Pa* yang dideskripsikan oleh Mergaert *et al.* (1993), Azad *et al.* (2000), Coplin & Kado (2001), dan Perez-y-Terron *et al.* (2009) dari pada *Xaa*. Dengan demikian, seluruh isolat asal daun bawang merah diduga merupakan bakteri *Pa* karena kemiripan sifat fisiologis dan biokimiawi yang lebih dekat.



Gambar 5. Dendogram yang menunjukkan hubungan kemiripan antara 8 isolat bakteri patogenik asal daun bawang merah dengan strain acuan *Pantoea ananatis* menurut Perez-y-Terron *et al.* (2009), Azad *et al.* (2000), Mergaert *et al.*(1993) dan Coplin & Kado (2001) yang dikonstruksi berdasarkan karakteristik fenotipik (biokimiawi dan fisiologis) menggunakan algoritme UPGMA



## KESIMPULAN

Berdasarkan karakteristik morfologi koloni dan sel bakteri, fisiologi dan biokimiawi, patogen yang bertanggung

jawab terhadap timbulnya penyakit hawar daun pada bawang merah dan bawang wakegi di sentra produksi di Indonesia cenderung teridentifikasi sebagai *P.ananatis*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alarcon, C., J.Castro, F.Munoz, P.Arce-Johnson, &J.Delgado. 1998. *Protein(s) from the gram-positive bacterium Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis induces a hypersensitive response in plants*. Bacteriology 88 (4): 306 -310
- Alippi, A. M. & Lopez, A. C. 2010. *First report of leaf spot disease of maize caused by Pantoea ananatis in Argentina*. Plant Disease 94 (4): 487
- Azad, H. R., Holmes, G. J., & Cooksey, D. A. 2000. *A new leaf blotch disease of sudangrass caused by Pantoea ananas and Pantoea stewartii*. Plant Disease, 84(9):973-979.
- Cappuccino, J.G. & Sherman, N. 2005. *Microbiology: A Laboratory Manual* 7th ed. Pearson Education, Inc., Publishing as Benjamin Cumming, San Francisco, CA 94111, USA
- Coplin, D. L. & C. I. Kado. 2001. *Pantoea*. In: Schaad, N. W., J. B. Jones, & W. Chun. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition. APS Press. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota.
- Coutinho, T. A. & Venter, S. N. 2009. *Pantoea ananatis: an unconventional plant pathogen*. Molecular Plant Pathology, 10: 325–335.
- Duriat, A. S., Ganaeni, N., Widjaya, E. S., Gunawan, O. S., Kirana, R., Gaswanto, R., Wulandari, A. W., Sulastrini, I., Ratnawati, M. L., J. M. van der Wolf & van der Zouwen, P. S.2004. *A survey on seed borne disease in tomato, pepper and shallot in 2004*. Plant Research International AA Wagebingen, the Netherlands.
- Duveiller, E., Bragard, C., Rudolph, K. & Fucikovsky, L. 1997. *General concepts and methodes for the identification of pathogenic bacteria of wheat*. In : Duveiller, E., L. Fucikovsky and K. Rudolph. *The Bacterial Diseases of Wheat Concepts and Methods of Disease Management*, CIMMYT, Mexico.
- Eric A. Carr, E. A., Zaid, A. M., Bonasera, J. M., Lorbeer, J. W. & Beer, S. V. 2013. *Infection of onion leaves by Pantoea ananatis leads to bulb infection*. Plant diseases, 94 (7): 916.1 - 916.2
- Janse, J. D. 2005. *Phytopathology: Principles and Practice*. CABI Publishing, Cambridge, USA
- Kadota, I., Uehara, K., Shinohara, H. & Nishiyama, K. 2000. *Bacterial blight of welsh onion : a new disease caused by Xanthomonas axonopodis pv. allii pv. nov.* The Journal of General Plant Pathology, 66: 310 – 315.
- Mergaert, J., L. Verdonck & K. Kersters. 1993. *Transfer of Erwinia ananatis (synonym, Erwinia uredovora) and Erwinia stewartii to the genus Pantoea emend as Pantoeaananas (Serrano, 1928) comb. Nov. and Pantoea stewartii (Smith 1989) comb. Nov., respectively, and decription of Pantoea stewartii subsp. indologenes*. Int. J. Syst Bacteriology, 43: 162 – 173

- Mondal, K. K., Mani, C., Singh, J., Kim, J. G. & Mudgett, M. B. 2011. *A new leaf blight of rice caused by Pantoea ananatis in India*. Plant Disease 95 (12): 1582
- Mortensen, C. N., Ole, S. Lund, Adriko, J., Kubiriba, J., Mbega, E. R., Mabagala, R.B., Bila, J., & Mondjane, A.M. 2011. *PCR diagnosis of Xanthomonas campestris pv. musacearum*. Technical Bulletin. Research Outputs from Enreca project Life-731. Denmark.
- Mukherjee, K. L. 2010. *Medical Laboratory Technology: A Procedure Manual for Routine Diagnostic Test*. 2nd Edition. Tata McGraw-Hill, New Delhi
- Ogunjobi, A. A., Fagade, O.E. & Dixon, A.G.O. 2010. *Physiological studies on Xanthomonas axonopodis pv manihotis (Xam) strains isolated in Nigeria*. European Journal of Biological Sciences 2 (4): 84-90
- Pelczar, M.J. & E.C.S. Chan. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi 1*. Penerjemah: R.S. Hadioetomo dkk. Elements of Microbiology. UI Press. Jakarta. 525-560.
- Pérez-y-Terrón, R., M. C. Villegas, A. Cuellar, J. Muñoz-Rojas, M. Castañeda-Lucio, I. Hernández-Lucas, R. Bustillos-Cristales, L. Bautista-Sosa, J. A. Munive, R. Caicedo-Rivas and L. E. Fuentes-Ramírez. 2009. *Detection of Pantoea ananatis, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico*. Australasian Plant Disease Notes. 4: 96 –99
- Roumagnac, P., Gagnevin, L., Gardan, L., Sutra, L., Manceau, C., Dickstein, E. R., Jones, J. B., Rott, P. & Pruvost, O. 2004. *Polyphasic characterization of Xanthomonas isolated from onion, garlic and welsh onion (Allium spp.) and their relatedness to different Xanthomonas species*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 15 – 24.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. & Lacy, G. H. 2001. *Xanthomonas*. In: *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third Edition N. W. Schaad, J. B. Jones and W. Chun, APS Press, 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, MN, 55121-2097, USA.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition. APS Press. St. Paul Minnesota. Pathogenic Bacteria. Third Edition. APS Press. St. Paul Minnesota.
- Schumann & D'Arcy. 2010. *Essential Plant Pathology*. Second Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Schwartz, H F & Otto, K. 2000. *First report of a leaf blight and bulb decay of onion by Pantoea ananatis in Colorado*. Plant Disease, 84 (7): 808
- Schwartz, H. F. & Gent, D. H. 2005. *Diseases : Xanthomonas Leaf Blight of Onion*. Gardening Series No. 2.951. Colorado State University, USA.
- Schwartz, H. F. & S. K. Mohan. 2008. *Compendium of onion and garlic diseases*. APS Press, The American Phytopathological Society, USA.
- Schwartz, H. F., Otto, K. L. & Gent, D. H. 2003. *Relation of temperature and rainfall to development of Xanthomonas and Pantoea leaf blights of onion in Colorado*. Plant Disease 87: 11 – 14
- Schwartz, H. F., Otto, K. L. & Gent, D. H. 2003. *Relation of temperature and rainfall to development of Xanthomonas and Pantoea leaf blights of onion in Colorado*. Plant Disease 87: 11 – 14
- Shegro, A., Labuschagne, M. T., van Biljon, A. & Srhargie, N. G. 2013. *Assessment of genetic diversity in sorghum accessions using amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis*. African Journal of Biotechnology, 12 (11): 1178-1188

- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Suwanto, A. 1995. *Bacterial fingerprinting in the investigation of hospital infection*. P. 24 – 30. In: Proceeding of Asean-Japan Seminar and Workshop on Hospital Infection. Y. Ngeow and Y. Hiramatsu (Eds). Kuala Lumpur, Malaysia.
- Walcott, R. R., Gitaitis, R. D., Castro, A. C., Sanders, F. H. & Diaz-Perez, J. C. 2002. *Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis* causal agent of center rot*. Plant Disease 86: 106 – 111.
- Yousef, A. E. 2008. *Detection of Bacterial Pathogens in Different Matrices: Current Practices and Challenges*. In: *Principles of Bacterial Detection*. Zourob, M., S. Elwary dan A. Turner. Springer Science+Business Media, LLC. Canada. Zaid, A. M., Bonasera, J. M. & Beer, S. V. 2012. *OEM— A new medium for rapid isolation of onion- pathogenic and onion- associated bacteria*. Journal of Microbiological Methods 91 : 520 – 526
- Zaid, A. M., Bonasera, J. M. & Beer, S. V. 2012. *OEM—A new medium for rapid isolation of onion- pathogenic and onion-associated bacteria*. Journal of Microbiological Methods 91: 520–526