

DETEKSI BAKTERI *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* PADA BENIH TOMAT KOMERSIAL YANG BEREDAR DI INDONESIA

(Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato Seeds Commercially Distributed in Indonesia)

Aswaldi Anwar, Satriyas Ilyas, dan Sudarsono

**Lab Biologi Molekuler Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura (AGRO-HORT),
Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga,
Jl. Meranti, Bogor 16680.**

E-mail: agrspsipb@indo.net.id; Fax. 0251-629347

ABSTRACT

The existence of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm), the pathogen causing bacterial canker, on 22 lots of tomato seeds distributed commercially in Indonesia was evaluated. Isolation of suspected Cmm colonies were conducted by agar dilution plating on semi-selective SCM medium followed by confirmation of colony identity on YDC medium. Identity of suspected Cmm colony was confirmed using IF test, pathogenicity test on tomato seedlings, hypersensitivity test on leaf of Mirabilis jalapa and Nicotiana tabacum, ELISA, and Cmm specific DNA amplification by PCR. After seed extraction and evaluation of the extract on semi-selective SCM medium and confirmation by IF test, at least six tomato seed lots were contaminated with Cmm. After more confirmation using pathogenicity and hypersensitivity test, ELISA, and PCR amplification, at least three seed lots were confirmed positively to carry Cmm.

Keywords : *Cmm*, bacterial canker, seedborne pathogen, tomato seeds

INTISARI

Keberadaan bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), sebagai penyebab penyakit kanker bakteri, pada 22 lot benih tomat komersial yang beredar di Indonesia telah dievaluasi. Isolasi koloni bakteri yang diduga *Cmm* dilakukan dengan agar dilution plating pada medium semi selektif SCM, diikuti dengan konfirmasi identitas koloni dalam media YDC. Identitas koloni *Cmm* juga dikonfirmasi dengan IF test, uji patogenesis pada bibit tomat, uji hipersensitivitas pada daun tanaman *Mirabilis jalapa* dan *Nicotiana tabacum*, ELISA, serta amplifikasi fragmen DNA spesifik *Cmm* dengan PCR. Setelah diekstraksi dan dievaluasi dalam medium semi-selektif SCM serta dikonfirmasi dengan IF test, paling sedikit enam lot benih tomat yang diuji diduga membawa *Cmm*. Setelah dikonfirmasi dengan uji patogenesis, hipersensitivitas, ELISA, dan amplifikasi PCR, minimal tiga lot benih yang berdasarkan IF Test diduga positif membawa *Cmm* dapat dipastikan telah terkontaminasi *Cmm*.

Kata kunci : *Cmm*, kanker bakteri, patogen terbawa biji, biji tomat

PENGANTAR

Penyakit kanker bakteri pada tomat pertama kali dilaporkan pada tahun 1909 di Michigan, Amerika Serikat (Hayward & Waterson 1964, Jones *et al.*, 1993). Selanjutnya berbagai informasi tentang penyakit kanker bakteri terus dilaporkan diidentifikasi dari berbagai negara dan saat ini diketahui telah tersebar di hampir seluruh penjuru dunia (Crop Protection Compendium 2002). Secara resmi bakteri *Cmm* dinyatakan belum ada di Indonesia sampai dengan tahun 2002 (Pusat Karantina Pertanian 2002).

Gejala serangan *Cmm* yang parah terjadi terutama dalam kondisi cuaca panas, dengan kisaran suhu antara 26°-28°C (Hayward & Waterson 1964). Gejala awal infeksi *Cmm* pada tomat adalah adanya bercak dan layu pada helaian daun pada posisi yang terbawah dari tanaman tomat. Helaian daun yang layu menggulung ke atas dan ke arah dalam, menjadi coklat dan mengering, tetapi tangkai daun tetap segar dan daunnya tidak gugur (Jones *et al.*, 1993). Gejala layu menjalar dari satu daun ke daun di atasnya secara unilateral hingga akhirnya merusak seluruh daun (Agrios 1988). Infeksi *Cmm* telah menyebabkan kerugian yang besar di berbagai negara produsen tomat (Hayward & Waterson 1964, Neergard 1977), yaitu dapat mencapai 50%-80% (Chang *et al.*, 1992).

Infeksi primer *Cmm* terjadi akibat penyebaran patogen dari permukaan benih ke bagian kotiledon atau daun sedangkan penyebaran infeksi di lapang berasal dari penetrasi bakteri melalui akar, batang, daun dan buah yang terluka, melalui air irigasi atau air hujan. Setelah berada dalam jaringan tanaman, *Cmm* memasuki sistem pembuluh, bergerak dan memperbanyak diri di jaringan xylem, menyebar menuju ke jaringan phloem, jaringan kambium dan jaringan korteks dimana *Cmm* menyebabkan terjadinya gejala kanker bakteri (Agrios 1988).

Perdagangan benih sayuran komersial di Indonesia akhir-akhir ini telah mengalami kemajuan pesat dan benih sayuran impor juga telah banyak digunakan petani. Masuknya benih secara ilegal dari berbagai negara melalui pertukaran plasma nutfah tanpa melalui prosedur karantina yang benar juga semakin meningkat. Hal tersebut membawa resiko masuknya patogen penyebab penyakit yang terbawa benih (*seedborne*), termasuk *Cmm* yang sebelumnya diduga belum ada di Indonesia. Mengingat perangkat pengujian kesehatan benih dan penerapan peraturan karantina yang masih belum efektif dikhawatirkan *Cmm* telah masuk dan tersebar di Indonesia melalui benih tomat impor tanpa melalui prosedur karantina yang benar.

Karena benih terinfeksi *Cmm* merupakan sumber inokulum utama penyakit kanker bakteri sedangkan perdagangan benih dan masuknya plasma nutfah benih tomat tanpa melalui prosedur karantina yang benar semakin meningkat maka perlu dievaluasi kemungkinan telah masuknya bakteri *Cmm* diantara benih tomat yang beredar di Indonesia. Dalam penelitian sebelumnya telah dikembangkan tahapan metode deteksi bakteri *Cmm* pada benih tomat yang efektif untuk diterapkan di Indonesia, yang meliputi *agar dilution plating*, *IF test*, amplifikasi DNA spesifik *Cmm* dengan *polymerase chain reaction (PCR)*, uji hipersensitivitas, dan uji patogenisitas (Anwar *et al.*, 2004).

Dalam penelitian ini, berbagai metode tersebut digunakan untuk mengevaluasi keberadaan bakteri *Cmm* diantara benih tomat komersial di Indonesia, mengisolasi koloni bakteri yang diduga *Cmm* dari benih tomat dengan *agar dilution plating* pada medium semi-selektif, konfirmasi identitas koloni bakteri dengan *IF test*, uji patogenisitas pada bibit tomat, *ELISA*, uji hipersensitivitas dengan daun bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa*) dan tembakau (*Nicotiana tabacum*), dan amplifikasi DNA spesifik *Cmm* dengan *PCR*.

BAHAN DAN METODE

Sumber Benih dan Tempat Pelaksanaan.

Benih yang digunakan berasal dari produsen utama benih tomat komersial di Indonesia dan benih impor dari pasar yang terdiri atas 22 lot benih. Pengujian terhadap enam lot benih dilakukan di Plant Pathology Lab, Cluster Seed and Reproduction Strategy, Plant Research International (PRI), Wageningen, Belanda dan pengujian untuk 16 lot benih yang lain dilakukan di Seed Health Lab and Quality Control, PT East West Seed Indonesia (EWSI), desa Benteng, Cempaka, Purwakarta, Jawa Barat. Sebelum digunakan, lot benih disimpan dalam kantong kedap udara dan ditempatkan di ruang berpendingin pada suhu 4°C.

Ekstraksi dan Isolasi Koloni Bakteri yang Diduga *Cmm*. Ekstraksi *Cmm* dari lot benih dilakukan dengan *stomacher* (Lab Blender Model 400 Mark II) atau dengan *seed grinder* (Ultra Turrax, Model T 25 Basic) dengan kecepatan putaran 11.000 rpm. Sebanyak 2000 benih (6-7 g) dimasukkan ke dalam tiga lapis kantong plastik (20 cm x 25 cm, dengan ketebalan 0.15 mm) berisi 40 ml larutan penyangga *phosphate buffer tween* (PBT). Setelah diinkubasi selama 15 menit pada suhu 4°C, kantong plastik berisi benih dimasukkan ke dalam *stomacher* dan benih diekstraksi selama 15 menit. Untuk ekstraksi dengan *seed grinder*, 2000 benih tomat dan 40 ml larutan penyangga PBT dimasukkan ke dalam wadah plastik dengan volume 250 ml, diinkubasi selama 15 menit pada suhu 4°C, dan dihomogenisasi dengan *seed grinder* selama 30 detik. Untuk setiap lot benih, ekstraksi *Cmm* dari contoh benih dilakukan dua kali.

Suspensi hasil ekstraksi dipindahkan ke dalam tabung ependorf steril, diencerkan 10 atau 100 kali menggunakan larutan penyangga *phosphate buffer saline* (PBS) 0.01M, dan diberi label sesuai dengan perlakuan pengenceran. Hasil ekstraksi (100 µl) dengan

atau tanpa pengenceran ditebarkan merata pada cawan petri berisi medium semi-selektif *salt carbonate medium* (SCM, Fatmi & Schaad 1988) menggunakan *glass rod* steril. Kultur diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 27°C dan diamati setiap hari selama dua minggu. Dalam media SCM, koloni *Cmm* berbentuk agak cembung, iregular, mukoid dengan fleks internal warna hitam atau abu-abu yang bulat dengan halo dan berair (Fatmi & Schaad 1988). Koloni yang diduga sebagai *Cmm* dikonfirmasi dan dimurnikan dengan membuat *single koloni plate* pada medium *yeast dextrose carbonate* (YDC) dan *tryptone salt agar* (TSA). Koloni *Cmm* pada medium YDC mempunyai ciri-ciri mukoid, konveks dan berwarna kuning cerah hingga kuning gelap. Suspensi bakteri *Cmm* isolat no. 542 dengan konsentrasi 10^4 , 10^3 , atau 10^2 cfu/ml digunakan sebagai pembanding untuk identifikasi koloni yang diduga *Cmm* dari ekstrak benih contoh.

Identifikasi Isolat yang Diduga *Cmm* dengan IF Test. Koloni bakteri yang telah ditumbuhkan pada medium YDC dalam ruang bersuhu 23°C selama 48 jam disuspensikan ke dalam larutan penyangga PBS 0.01 M hingga berwarna putih susu ($\pm 10^8$ cfu/ml) dan diencerkan secara bertahap hingga 10.000 kali dengan larutan penyangga PBS 0.01 M dan digunakan dalam *IF test*. Sebanyak 5 µl suspensi bakteri yang diuji dipipet dan dipindahkan ke *slide object glass* dan dikeringkan diatas pemanas (*hot plate*) pada kisaran suhu 40°-50°C selama satu jam. Fiksasi dilakukan dengan melewati *slide* diatas pemanas Bunsen selama beberapa detik.

Pada masing-masing *slide* ditambahkan 5 µl antiserum spesifik yang diproduksi menggunakan *Cmm* isolat 542 (antiserum no. 9845E-H1 dari PRI, Wageningen, Belanda), ditempatkan dalam wadah yang lembab dan dalam kondisi gelap pada suhu ruang selama 30 menit. *Slide* dicuci dua kali, masing-masing

dengan larutan penyangga PBS 0.001 M selama 5 menit, dan dikeringkan dengan aliran udara panas menggunakan pengering rambut (*hair drier*) selama 15 menit.

Pada masing-masing *slide* yang telah kering ditambahkan konjugat FITC sebanyak 5 μ l, diinkubasikan dalam wadah yang lembab dan dalam kondisi gelap pada suhu ruang selama 30 menit, dicuci dua kali dengan larutan penyangga PBS 0.001 M dan satu kali dengan aquadest masing-masing selama 5 menit, dan dikeringkan dengan aliran udara panas selama 15 menit. Setelah ditetesi dengan larutan penyangga gliserol fosfat, *slide* ditutup dengan *cover slip* dan pinggirannya diolesi dengan cat kuku (*nail polish*). Pengamatan keberadaan sel *coryneform* dari bakteri *Cmm* yang memberikan efek fluoresens hijau cerah (Franken *et al.*, 1993) dilakukan di bawah mikroskop fluoresens dengan pembesaran 1000x.

Identifikasi Isolat yang Diduga Cmm dengan uji Patogenisitas. Uji patogenisitas dilakukan pada bibit tomat Money Maker dan Bonny Best berumur 2-3 minggu. Inokulasi dilakukan dengan memotong epikotil bibit tomat, 1 cm diatas kotiledon dengan gunting yang sebelumnya dicelupkan ke dalam suspensi isolat yang diuji. Inokulasi juga dilakukan dengan jalan menyuntikkan suspensi bakteri pada epikotil bibit tomat, 1 cm diatas kotiledon. Bibit tomat yang telah diinokulasi ditempatkan di ruang inkubasi bersuhu 23°C dengan penyinaran lampu TL (40 watt) selama 12 jam dan kelembaban udara 50%-85%. Setelah dua minggu dalam ruang inkubasi, bibit tomat dipindahkan ke rumah kaca bersuhu 27-41°C, penyinaran 12 jam dan kelembaban udara 90%. Pengamatan yang dilakukan meliputi gejala layu pada daun dan batang, gejala kanker pada batang, dan gejala yang muncul pada jaringan pengangkut dan kambium. Pengamatan dimulai sehari sesudah inokulasi dan dilanjutkan hingga 30 hari.

Identifikasi Isolat yang Diduga Cmm dengan Uji Hipersensitivitas. Bakteri yang diduga *Cmm* ditumbuhkan dalam medium YDC selama 48 jam dan koloni bakteri yang tumbuh disuspensikan dalam air steril dengan konsentrasi 10⁸ cfu/ml. Suspensi bakteri (2 μ l) disuntikkan dengan hati-hati menggunakan jarum suntik steril ke lapisan interseluler daun *M. jalapa* berumur 3 minggu dan *N. tabacum* berumur 1 bulan. Daun yang disuntik dengan air steril (2 μ l) digunakan sebagai pembanding. Tanaman indikator yang telah diinokulasi ditempatkan di ruang inkubasi bersuhu 23°C dengan penyinaran lampu TL selama 12 jam dan kelembaban udara 50%-85%. Setelah pengamatan terhadap munculnya gejala nekrosis pada daun dilakukan setelah dua hari.

Identifikasi Isolat yang Diduga Cmm dengan ELISA. Identitas bakteri yang diduga *Cmm* dari benih tomat juga dilakukan dengan ELISA menggunakan metode yang dilaporkan Alvarez & Chen (2002), menggunakan antibodi monoklonal MAB103-142. Secara ringkas ELISA dilakukan dengan mengisi plat ELISA dengan 100 μ l ekstrak benih yang diuji, 100 μ l larutan penyangga (kontrol negatif) atau suspensi *Cmm* 542 (kontrol positif). Plat yang telah diisi contoh tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, dikosongkan kembali, dan dibilas enam kali dengan aquadest. Setelah dibilas, plat diisi dengan larutan penghambat (*blocking solution*), diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit, dan dikosongkan dengan memukul-mukulkan plat pada posisi terbalik diatas kertas penghisap. Selanjutnya, ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan dua tetes konjugat ensim, diinkubasikan selama 10 menit, dikosongkan dan dibilas enam kali dengan aquadest. Setelah penambahan *blocking solution* dan inkubasi selama satu menit, sumuran dikosongkan kembali dengan memukul-mukulkan plat pada posisi terbalik diatas kertas penghisap, ditambahkan 200 μ l larutan TMB ke dalam masing-masing

sumuran, diinkubasi selama 5 menit dan diamati perubahan warna yang terjadi pada masing-masing sumuran berisi contoh yang diuji. Sumuran dengan warna tetap bening atau sedikit kebiruan sebagaimana kontrol negatif mengindikasikan hasil negatif sedangkan warna biru yang jelas sebagaimana kontrol positif mengindikasikan hasil positif.

Identifikasi Isolat yang Diduga *Cmm* dengan PCR. Bakteri yang diduga *Cmm* ditumbuhkan pada medium YDC dan diinkubasikan dalam ruangan bersuhu 23°C selama 48 jam. Contoh koloni yang tumbuh disuspensikan dalam air steril dan 5 µl suspensi bakteri dicampur dengan 50 µl NaOH (0.05 M) dan dilisis dengan pemanasan dalam air mendidih selama 15 menit. Hasil lisis (5 µl) ditambahkan ke dalam 45 µl campuran reaksi yang terdiri atas 1x larutan penyangga (1.5 mM MgCl₂), dNTP (200 µM, Boehringer Mannheim), pasangan primer spesifik *Cmm* CM3/CM4 dan enzim AmpliTaq DNA polimerase (2.5 U).

Pasangan primer yang digunakan mempunyai urutan nukleotida sebagai berikut: primer CM3: 5'-CCT CGT GAG TGC CGG GAA CGT ATC -3' dan primer CM4: 5'-CCA CGG TGG TTG ATG CTC GCG

AGA T -3'. Amplifikasi dengan PCR dilakukan dengan tahapan disosiasi templat DNA pada suhu 94°C selama 1.5 menit, penempelan primer (*primer annealing*) pada suhu 60°C selama 1 menit dan pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 1.5 menit. Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dengan menggunakan kondisi tersebut. Hasil amplifikasi DNA yang didapat dielektroforesis dalam 1% gel agarosa dengan menggunakan larutan penyangga TAE. Potongan DNA hasil amplifikasi yang didapat dengan pasangan primer CM3/CM4 mempunyai ukuran 645 pasang basa.

HASIL

Ekstraksi dan Isolasi Isolat yang Diduga *Cmm* dari Lot Benih Tomat. Hasil ekstraksi dan isolasi *Cmm* menunjukkan enam dari 22 lot benih tomat yang diuji diduga terkontaminasi oleh bakteri *Cmm*. Koloni bakteri yang diduga sebagai *Cmm* berhasil diisolasi dari 6 lot benih dengan menggunakan metode *agar dilution plating* pada medium semi-selektif SCM dengan densitas 10 cfu/ml hingga 125 cfu/ml (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil ekstraksi dan isolasi bakteri yang diduga *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) dari lot benih tomat dan hasil identifikasi menggunakan *IF test* dan uji patogenisitas.

Lot benih	Isolat dalam media SCM		Σ isolat yang diidentifikasi positif <i>Cmm</i> :		
	Cfu/ml	Σ isolat	Medium YDC	IF test	Patogenisitas
Tol-02	45	9	7	6	1
Tol-03	125	14	11	6	0
Tol-11	30	3	2	2	0
Tol-15	20	4	3	1	0
Tol-17	55	4	2	2	1
Tol-20	10	2	2	2	1
Total		36	27	19	3

Setelah dimurnikan dalam media SCM, jumlah isolat bakteri yang diduga *Cmm* dari masing-masing lot benih berkisar antara 2 – 14 isolat per lot benih (total 27 isolat). Identifikasi lebih lanjut dalam media YDC berhasil mengeliminasi sejumlah isolat sehingga akhirnya hanya tersisa 27 yang diduga *Cmm* (Tabel 1). Contoh tahapan hasil isolasi dan konfirmasi isolat bakteri dalam media SCM, YDC dan TSA disajikan pada Gambar 1.a Karakteristik morfologi koloni dari isolat bakteri terpilih yang diduga *Cmm* dalam media YDC dapat dilihat pada Tabel 2.

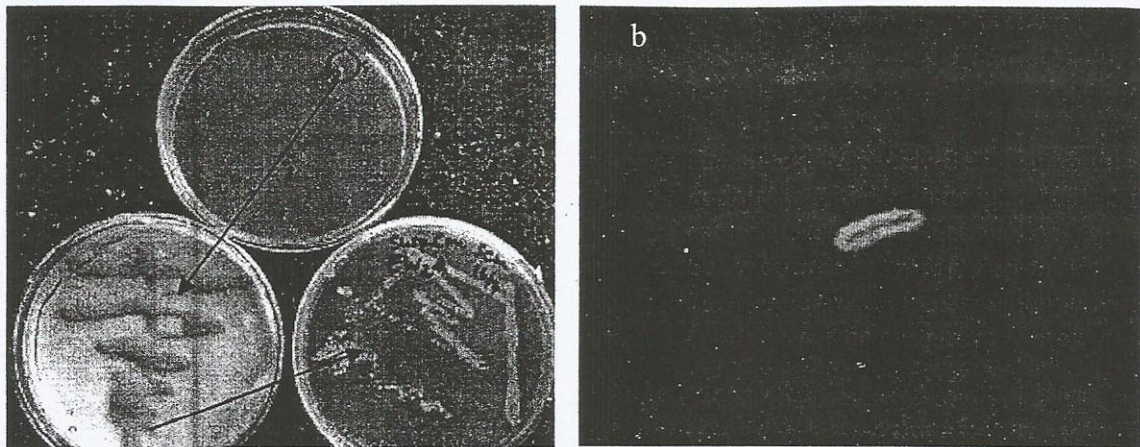
Identifikasi Isolat yang Diduga *Cmm* dengan *IF test* dan Uji Patogenisitas. Dari hasil *IF test* terhadap 27 isolat yang diduga *Cmm* berdasarkan morfologi koloni dalam media YDC berhasil diidentifikasi 20 isolat sebagai positif *Cmm* berdasarkan reaksinya terhadap antibodi spesifik *Cmm* dan bentuk sel bakterinya (Tabel 1). Contoh hasil positif dari *IF test* terhadap koloni bakteri yang diduga *Cmm* disajikan pada Gambar 1.b.

Isolat bakteri yang diidentifikasi positif *Cmm* berdasarkan *IF test*, dalam media YDC

Tabel 2. Morfologi koloni isolat bakteri terpilih yang diduga *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) dari lot benih tomat dan hasil identifikasi bakteri menggunakan *IF test*, uji patogenisitas, dan amplifikasi DNA spesifik *Cmm* menggunakan PCR.

No. isolat	Morfologi koloni pada medium YDC	Identifikasi isolat sebagai <i>Cmm</i> :		
		IF test	Patogenisitas	PCR
Tol-02-S2	Mukoid kuning	+	-	-
Tol-02-S9	Mukoid kuning	+	+	+
Tol-03-S13	Mukoid kuning	+	-	-
Tol-11-S25	Mukoid kuning*	+	-	Td
Tol-17-S32	Mukoid kuning**	+	+	+
Tol-17-S35	Mukoid kuning**	+	+	Td
Tol-02-S1	Mukoid kuning, agak tua	+	-	-
Tol-02-S3	Mukoid kuning, agak tua	+	-	-
Tol-02-S4	Mukoid kuning, agak tua	+	-	-
Tol-02-S6	Mukoid kuning, agak tua	+	-	-
Tol-03-S17	Mukoid kuning, agak tua	+	-	-
Tol-03-S20	Mukoid kuning, agak tua	+	-	-
Tol-11-S24	Mukoid kuning, agak tua*	+	-	Td
Tol-15-S28	Mukoid kuning, agak tua**	+	-	Td
Tol-17-S34	Mukoid kuning, agak tua*	+	-	Td
Tol-03-S22	Mukoid kuning, agak basah	+	-	-
Tol-20-S36	Mukoid kuning, agak kering*	+	-	Td
Tol-03-S10	Mukoid kuning, pucat	+	-	-
Tol-03-S11	Mukoid kuning, agak kehijauan	+	-	-
Tol-02-S5	Mukoid kuning tua	-	-	-
Tol-03-S16	Mukoid kuning, basah	-	-	-
Tol-03-S12	Mukoid kuning, agak kering	-	-	-
Tol-17-S33	Mukoid kuning kehijauan, basah	-	-	-

Keterangan: Hasil uji hipersensitivitas (*) = negatif dan (**) = positif. (+) atau (-) = hasil uji positif atau negatif. Td= tidak diuji.



Gambar 1. Koloni bakteri yang diduga *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) dari benih tomat dalam media SCM, YDC, dan TSA (a) serta sel bakteri yang positif *Cmm* berdasarkan *IF test* (b). Gambar bakteri *Cmm* (b) diambil dengan pembesaran 1000x.

mempunyai morfologi koloni mukoid kuning, mukoid kuning-agak tua, mukoid kuning-agak basah, mukoid kuning-agak kering, mukoid kuning-pucat, atau mukoid kuning-agak kehijauan. Isolat bakteri dengan morfologi koloni mukoid kuning tua, mukoid kuning-basah (berair), mukoid kuning-agak kering, mukoid kuning kehijauan-basah umumnya diidentifikasi negatif dengan *IF test* menggunakan antibodi spesifik *Cmm* (Tabel 2).

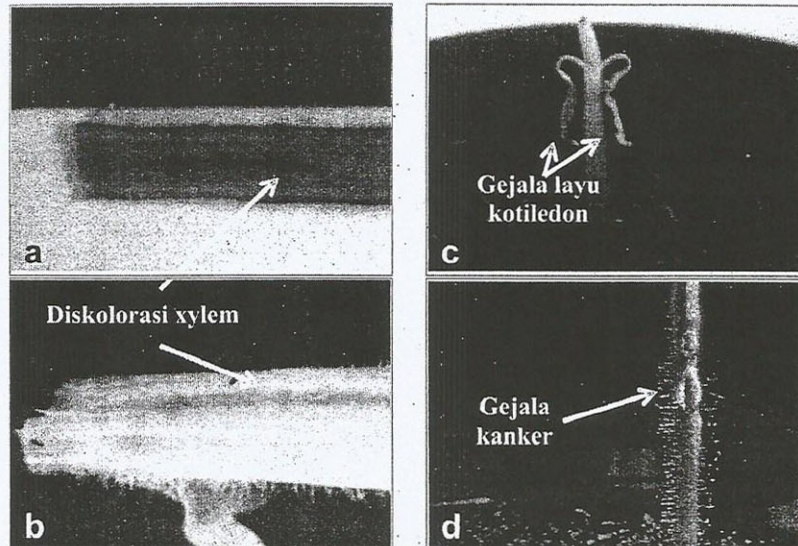
Tidak semua isolat bakteri yang diidentifikasi positif *Cmm* dengan *IF test* menyebabkan gejala infeksi spesifik *Cmm* ketika diinokulasikan ke bibit tomat (Tabel 1). Dari 20 isolat bakteri terpilih, hanya tiga isolat (Tol-02-S9, Tol-17-S32, dan Tol-17-S35) yang memberikan hasil positif dalam uji patogenitas menggunakan bibit tomat Bony Best (Tabel 2). Gejala infeksi isolat Tol-02-S9, Tol-17-S32, dan Tol-17-S35 dalam uji patogenitas meliputi gejala layu pada kotiledon (Gambar 2.a dan 2.b), diskolorasi jaringan pengangkut (Gambar 2.c) dan kanker pada batang tomat (Gambar 2.d).

Identifikasi Isolat yang Diduga *Cmm* dengan Uji Hipersensitivitas dan ELISA. Sebagian isolat yang terbukti positif berdasarkan *IF test* selanjutnya juga dilakukan

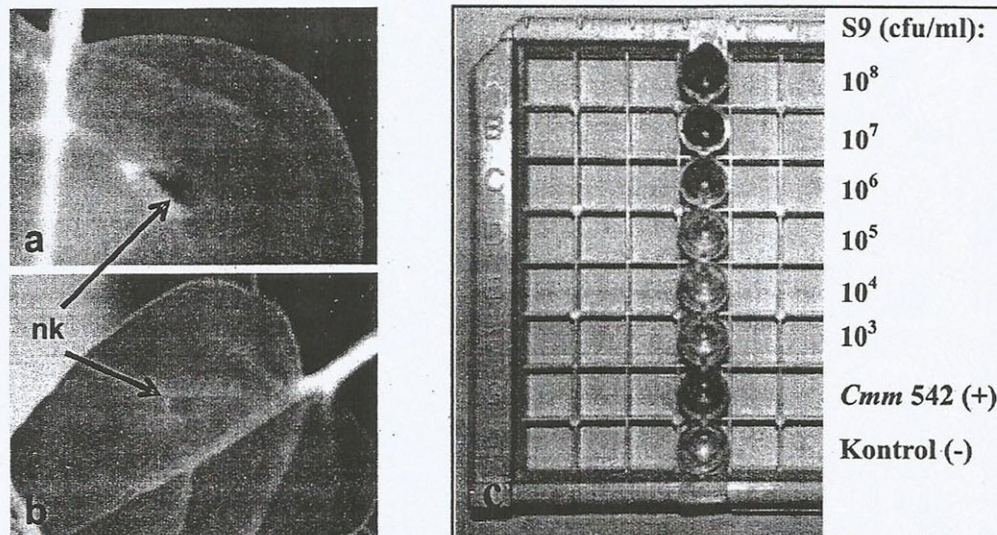
uji hipersensitivitas dan ELISA. Dari tujuh isolat bakteri yang terbukti positif berdasarkan *IF test*, hanya tiga isolat (Tol-17-S32, Tol-17-S35, Tol-15-S28) yang mampu menginduksi hipersensitivitas pada daun *N. tabacum* dan *M. jalapa*. Empat isolat bakteri yang lain memberikan hasil negatif untuk uji hipersensitivitas. Contoh hasil uji hipersensitivitas pada daun *N. tabacum* dan *M. jalapa* dapat dilihat pada Gambar 3.a dan 3.b. Daun *N. tabacum* dan *M. jalapa* yang diinokulasi dengan isolat Tol-17-S32 dan Tol-17-S35 telah menunjukkan gejala awal nekrosis enam jam dan telah mengering 24 jam setelah inokulasi.

Hanya isolat Tol-02-S9 yang diuji dengan ELISA menggunakan antibodi monoklonal MAB 103-142 yang spesifik terhadap *Cmm*. Hasil ELISA mengkonfirmasi hasil *IF test* yang membuktikan isolat Tol-12-S9 merupakan isolat *Cmm*. Hasil ELISA untuk isolat Tol-12-S9 dapat dilihat pada Gambar 3.c.

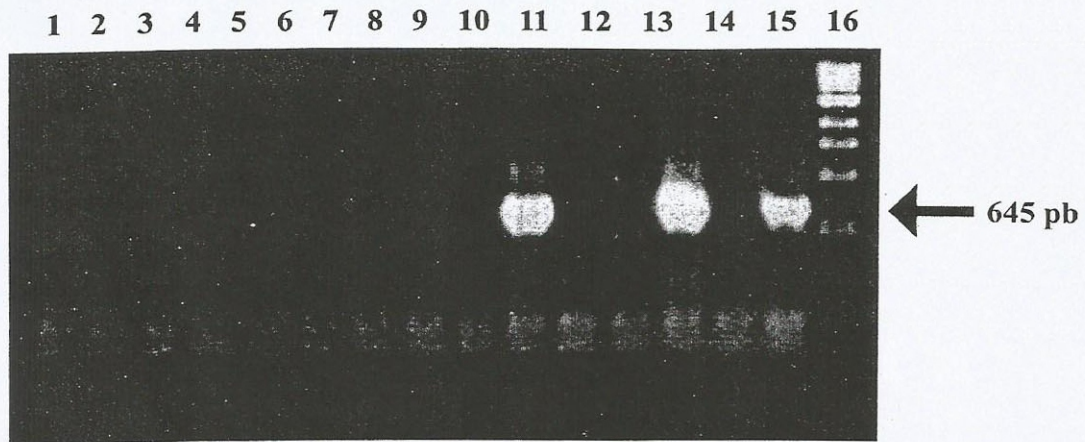
Identifikasi Isolat yang Diduga *Cmm* dengan PCR. Hasil amplifikasi potongan DNA spesifik *Cmm* dengan PCR terhadap 12 isolat yang diidentifikasi positif dengan *IF test* dan sebagian besar diidentifikasi negatif dengan uji



Gambar 2. Gejala infeksi isolat bakteri yang diidentifikasi positif *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). (a) dan (b) gejala diskolorasi pada jaringan xylem bibit tomat, (c) gejala layu pada kotiledon dalam uji patogenisitas dengan memotong bibit tomat menggunakan gunting yang dicelup suspensi bakteri, dan (d) gejala kanker pada batang tomat akibat infeksi bakteri yang diidentifikasi positif *Cmm*.



Gambar 3. Uji hipersensitivitas menggunakan tanaman indikator (a) bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa*), atau (b) tembakau (*Nicotiana tabacum*), dan (c) hasil uji ELISA isolat Tol-02-S9 yang diidentifikasi positif *Cmm*. (nk) = gejala nekrosis dalam uji hipersensitivitas.



Gambar 4. Amplifikasi DNA spesifik *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) dengan PCR menggunakan pasangan primer CM3/CM4 dan templat DNA dari isolat bakteri yang diduga positif *Cmm*. Amplifikasi menggunakan primer CM3/CM4 menghasilkan potongan DNA dengan ukuran 645 pasang basa. Lajur 1-8, 10-12, dan 14 merupakan isolat bakteri yang diduga *Cmm* dari lot benih Tol-02 dan Tol-03; lajur 9 merupakan kontrol negatif – tanpa templat DNA; lajur 13 dan 15 merupakan kontrol positif masing-masing dengan templat DNA dari *Cmm* isolat no. 2545-69 dan no. 542; dan lajur 16 merupakan referensi ukuran DNA (1 kb DNA ladder, New England Biolabs).

patogenisitas disajikan pada Gambar 4. Dengan kondisi amplifikasi yang dalam penelitian ini, DNA dari isolat *Cmm* 2545-69 dan *Cmm* 542 berhasil diamplifikasi menggunakan pasangan primer C3/C4 dan menghasilkan potongan DNA 645 pb sesuai yang diharapkan. Kecuali isolat Yol-02-S9, DNA dari isolat bakteri yang diuji tidak ada yang menghasilkan produk amplifikasi menggunakan pasangan primer C3/C4. Penggunaan templat DNA dari isolat Tol-02-S9 untuk PCR menghasilkan potongan DNA hasil amplifikasi sebesar 645 pb seperti isolat referensi (Gambar 4) yang membuktikan bahwa isolat Tol-02-S9 merupakan isolat *Cmm*.

PEMBAHASAN

Enam dari 22 lot benih komersial yang beredar di Indonesia dicurigai membawa bakteri *Cmm*. Hampir 80% koloni bakteri yang dicurigai sebagai *Cmm* dikonfirmasi positif dengan *IF test*. Dalam penelitian sebelumnya, Franken *et al.* (1993) menggunakan kombinasi

pre-skrining dengan *IF test*, isolasi dalam medium semi selektif SCM, konfirmasi identitas koloni dalam media YDC, dan diikuti dengan uji patogenisitas untuk analisis keberadaan *Cmm* pada benih tomat.

Dalam penelitian ini, tahapan analisis dimodifikasi agar sesuai dengan kondisi laboratorium di Indonesia. Keberadaan bakteri yang diduga *Cmm* diisolasi dari benih tomat menggunakan medium semi-selektif SCM diikuti konfirmasi identitas koloni dalam medium YDC. Identitas isolat yang diduga *Cmm* selanjutnya dikonfirmasi dengan *IF test*, uji hipersensitifitas, dan patogenisitas. Penggunaan *IF test* pada tahapan konfirmasi dalam penelitian ini dan bukan pada tahapan pre-skrining seperti yang dilaporkan Franken *et al.* (1993) dapat menghemat pemakaian antiserum dan FITC yang diperlukan. Meskipun *IF test* terbukti efektif untuk mengidentifikasi isolat *Cmm*, harga antiserum, substrat FITC, dan ketersediaan mikroskop fluoresens dapat menjadi kendala penggunaan tahapan analisis

keberadaan *Cmm* pada lot benih tomat yang disarankan. Sebagai alternatif, konfirmasi identitas bakteri juga dapat dilakukan dengan ELISA atau amplifikasi DNA spesifik *Cmm* dengan PCR.

Kelemahan lain dari *IF test* adalah kemungkinan terjadinya reaksi silang (*cross reaction*) dari antibodi yang digunakan terhadap bakteri lain dan ketidak-mampuan *IF test* untuk membedakan sel bakteri yang hidup atau yang mati, dan yang virulen atau yang avirulen (van Vaerenberg & Chauveau 1987, Franken *et al.*, 1993). Dalam penelitian ini, isolat bakteri yang dievaluasi secara bertahap telah diisolasi dan ditumbuhkan dalam media selektif SCM dan YDC sehingga dalam keadaan hidup, tetapi tetap tidak dapat dibedakan antara yang virulen dengan yang avirulen.

Pembuktian identitas isolat bakteri dengan PCR menggunakan pasangan primer CM-3/CM-4 dan dengan ELISA mengindikasikan isolat Lot-02-S9 sebagai isolat *Cmm*. Pengujian dengan PCR dan ELISA telah terbukti sensitif dan cepat serta dapat dipertanggung-jawabkan untuk mendeteksi *Cmm* dari lot benih tomat (Santos *et al.*, 1997, Louws *et al.*, 1989, Dreier *et al.*, 1995, Alvarez *et al.*, 1993).

Hasil pengujian yang dilakukan dalam percobaan ini memastikan bakteri *Cmm* penyebab penyakit kanker bakteri pada tomat telah ditemukan diantara benih tomat komersial yang diperjual belikan di Indonesia. Keberadaan *Cmm* diantara benih komersial tersebut perlu mendapat perhatian yang serius mengingat benih yang terkontaminasi *Cmm* merupakan inokulum primer penyebaran penyakit kanker bakteri pada tomat. Hal ini juga mengindikasikan penyebaran *Cmm* di lapangan dan ditingkat petani kemungkinan besar telah terjadi dan timbulnya ledakan (*outbreak*) penyakit kanker bakteri pada pertanaman tomat di tingkat petani menjadi sangat besar.

Kisaran suhu optimum pertumbuhan *Cmm* di lapangan berkisar antara 26°-28° C,

sehingga berjangkitnya penyakit kanker bakteri pada tomat akibat penyebaran *Cmm* di Indonesia sangat mungkin terjadi. Tanaman tomat di Indonesia umumnya ditanam di dataran menengah dan dataran tinggi dengan kisaran suhu lingkungan antara 26°-28° C. Tidak seperti di daerah sub-tropika dengan musim dingin yang dapat mengurangi populasi patogen di lapang, kondisi iklim di Indonesia memberikan kesempatan berkembangnya *Cmm* sepanjang tahun di lapang. Kondisi yang lebih parah dapat terjadi karena gejala penyakit kanker bakteri kemungkinan belum dikenali di lapangan oleh petani tomat sehingga tindakan pencegahan untuk membatasi perkembangan penyakit tidak dilakukan.

Hausbeck *et al.* (2000) melaporkan terjadinya *outbreak* penyakit kanker bakteri di barat daya USA dan beberapa provinsi di Kanada akibat penggunaan benih terkontaminasi *Cmm*. Di Michigan, USA, serangan *Cmm* menyebabkan kerugian hasil hingga US \$ 300 ribu per tahun (Klag 1997). Di Anatolia, Turki, serangan penyakit kanker bakteri pada tanaman tomat sebelumnya tidak pernah terjadi. Akibat introduksi benih tomat cv. Target yang dicurigai terkontaminasi *Cmm* pada tahun 2001 menyebabkan terjadinya insiden serangan penyakit kanker bakteri hingga 100% di daerah tersebut (Sahin *et al.*, 2002).

Kasus masuknya patogen tertentu ke suatu negara yang sebelumnya tidak ditemukan keberadaannya dapat merupakan konsekuensi dari perdagangan benih antar negara (McGee 1997) atau pertukaran plasma nutfah untuk perakitan varietas tomat baru tanpa disertai prosedur karantina yang efektif. Penerapan prosedur karantina yang tidak efektif dan kurangnya kepedulian berbagai pihak terkait dalam aktivitas perdagangan dan pertukaran plasma nutfah diyakini merupakan penyebab masuknya *Cmm* ke Indonesia yang sampai dengan tahun 2002 dilaporkan belum ada di Indonesia dan tergolong sebagai organisme

pengganggu tumbuhan karantina (OPTK) (Pusat Karantina Pertanian 2002). Perkembangan industri benih di Indonesia yang akhir-akhir ini sedang sedang berkembang dapat menghadapi kendala jika penyebaran *Cmm* di lapang tidak ditangani dengan baik. Berbagai negara Uni Eropa menerapkan peraturan *zero tolerance* untuk keberadaan *Cmm* dalam benih komersial yang diperdagangkan (European Union 1995). Penyebaran *Cmm* di Indonesia dapat menghambat perkembangan ekspor berbagai produk industri benih di Indonesia ke berbagai negara di Eropa dan akan membawa dampak yang sangat merugikan.

Berbagai langkah yang dapat dilakukan untuk mencegah penyebaran lebih lanjut *Cmm* di Indonesia adalah dengan melokalisasi penyebaran *Cmm* melalui survei lapangan sehingga lokasi pertanaman tomat yang telah terinfeksi *Cmm* dapat dipetakan. Patogen *Cmm* dapat menyebar melalui tanah dan sisa tanaman serta dapat bertahan hingga 26 bulan (Fatmi & Schaad 2002) di lingkungan yang telah terinfeksi sehingga sulit dikendalikan. Karena varietas tomat yang resisten terhadap infeksi *Cmm* sejauh ini belum tersedia dan pengendalian penyakit menggunakan pestisida dilaporkan tidak efektif (Dreier *et al.*, 1995, Francis *et al.*, 2001, Werner *et al.*, 2002), pencegahan penyebaran *Cmm* lewat benih menggunakan berbagai perlakuan benih (*seed treatment*) merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan. Berbagai metode *seed treatment* untuk menghilangkan *Cmm* dari benih tomat terinfeksi telah diuji dalam penelitian lanjutan dan akan dilaporkan dalam tulisan yang lain.

KESIMPULAN

Setelah diekstraksi dan dievaluasi dalam medium semi-selektif SCM serta dikonfirmasi dengan *IF test*, paling sedikit enam lot benih tomat yang diuji diduga membawa *Cmm*.

Setelah dikondirmasi dengan uji patogenisitas, hipersensitivitas, ELISA, dan amplifikasi PCR, minimal tiga lot benih yang berdasarkan *IF Test* diduga positif membawa *Cmm* dapat dipastikan telah terkontaminasi *Cmm*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada International Agriculture Centre dan Plant Research International, Wageningen, Belanda serta PT East West Seed Indonesia (PT EWSI), Purwakarta, Indonesia yang telah memberikan bantuan dana dan memfasilitasi penelitian ini; kepada Dr Jan van der Wolf dan Mrs Patricia van der Zouwen atas bantuan teknis dan saran-sarannya selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G.N. 1988. *Plant Pathology*. Academic Press, New York.
- Alvarez, A., M. Derie, A. Benedict, & R. Gabrielson. 1993. Characteristics of a monoclonal antibody to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathol* 83:1405.
- Alvarez, A. & L. Chen. 2002. *Bacterial canker of tomato*. Prosiding. 2nd INDOSEED-BIOBREES Workshop, Bogor 7-11 Oktober 2002.
- Anwar, A., S. Ilyas & Sudarsono. 2005. Evaluasi metode isolasi dan identifikasi bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* pada benih tomat. *Stigma* Agustus 2005.
- Chang, R.J., S.M. Ries, & J.K. Pataky. 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathol.* 82:553-560.

- Crop Protection Compendium. 2002. Distribution map for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (bacterial canker of tomato). [Http://www.cabicompedium.org/cpc/datasheet.asp](http://www.cabicompedium.org/cpc/datasheet.asp) [27-10-2002].
- [Deptan] Departemen Pertanian. 2002. Budidaya Tomat. Dirjen Bina Produksi Hortikultura, Direktorat Tanaman Sayuran, Hias, & Aneka Tanaman. Jakarta.
- Dreier, J., A. Bermpohl, & R. Eichenlaub. 1995. Southern hybridization & PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathol* 85:462-468.
- European Union. 1995. Commission Directive 95/4/EC amendment of 21 February 1995 to European Community Plant Health Directive (77/93/EEC). *Official J of the European Communities* L 44:56-60.
- Fatmi, M. & N.W. Schaad. 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathol* 78:121-126.
- Fatmi, M. & N.W. Schaad. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stem under natural field conditions in California, Ohio & Marocco. *Plant Pathol* 51:149-154.
- Francis, D.M., E. Kabelka, J. Bell, B. Franchino, & D. StClair. 2001. Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) & its progeny derived from crosses to *L. Esculentum*. *Plant Dis* 85:1171-1176.
- Franken, A.A.J.M., G.C. Kamminga, W. Snijder, P.S. van der Zouwen, & Y.E. Birnbaum. 1993. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by immunofluorescence microscopy & dilution plating. *Netherlands J Plant Pathol* 99:125-137.
- Hausbeck, M.K., J. Bell, C. Medina-Mora, Podolsky, & D.W. Fulbright. 2000. Effects of bactericides on population sizes & spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse & on disease development & crop yield in the field. *Phytopathol* 90:38-44.
- Hayward, A.C. & J.M. Waterson. 1964. *Corynebacterium michiganense*. *Commonwealth Mycological Institute* No. 19.
- Jones, J.B., J.P. Jones, R.E. Stall, & T.A. Zitter. 1993. *Compendium of Tomato Diseases*. APS Press. St Paul, Minnesota.
- Klag, N.G. 1997. Seed quarantine system in the United States. In McGee D.C. (ed.) *Plant Pathogens & the Worldwide Movements of Seeds*. APS Press. St Paul, Minnesota. p. 55-56.
- Louws, F.J., J. Bell, C.M. Medina-Mora, C.D. Smart, D. Opgenorth, C.A. Ishimaru, M.K. Hausbeck, F.J. de Bruijn, & D.W. Fulbright. 1998. Rep-PCR-mediated genomic finger printing: a rapid & effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathol* 88:862-868.
- McGee, D.C.. 1997. Relevance of seed pathology research priorities to worldwide movement of seed. In McGee D.C. (ed.) *Plant Pathogens and the the Worldwide Movements of Seeds*. APS Press. St Paul, Minnesota. p. 1-16.
- Neergard, P. 1977. *Seed Pathology*. John Wiley & Sons, New York.

- Pusat Karantina Pertanian. 2002. Daftar Organisme Pengganggu Tumbuhan yang dilaporkan belum terdapat di wilayah Republik Indonesia. [Http://www.deptan.go.id/CAQ/index.htm](http://www.deptan.go.id/CAQ/index.htm) [9-6-2002].
- Sahin, F., H. Uslu, R. Kotan, & M.F. Donmez. 2002. Bacterial canker, caused by *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, on tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. *Plant Pathol* 51:399.
- Santos M.S., L. Cruz, P. Norskov, & O.F. Rasmussen. 1997. A rapid & sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Sci Technol* 25:581-584.
- Van Vaerenbergh, J.P.C. & J.F. Chauveau. 1987. Detection of *Corynebacterium michiganense* in tomato seed-lots. *Bull OEPP/EPPO* 17:131-138.
- Werner, N.A., D.W. Fulbright, Podolsky, J. Bell, & M.K. Hausbeck, 2002. Limiting populations & spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. *Plant Dis* 86:535-542.