

Teknik Inokulasi Buatan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Penyebab Penyakit Busuk Cincin Bakteri, pada Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Luciana Djaya^{1*}, Ineu Sulastrini², dan Iin Rusita³

¹ Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung-Sumedang Km 21, Jatinangor 40600

²Balai Penelitian Tanaman Sayuran, Lembang

³Alumni Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran

*Alamat korespondensi: luciana.djaya@unpad.ac.id

ABSTRACT

Inoculation Techniques of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, the Cause of Bacterial Ring Rot Disease, on Potato (*Solanum tuberosum* L.).

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*, the cause of bacterial ring rot disease on potatoes, has been detected in potato fields in Pangalengan. To anticipate the spread of the pathogen, researches on the disease epidemiology are urgent to be carried out. Artificial inoculation techniques will be useful in the epidemiological studies. The objective of this research was to evaluate some inoculation techniques, which are simple, cheap and fast in causing disease symptoms. The experiment was carried out at the laboratory and glasshouse of Balai Penelitian Tanaman Sayuran (Balitsa), Lembang. The experiment was arranged in the randomized block design with five treatments of inoculation technique and five replications. The treatments were (a) soaking wounded seed tubers in pathogen suspension, (b) soaking not wounded seed tubers in pathogen suspension, (c) pathogen suspension was injected into leaf axil, (d) pathogen suspension was injected into seed tubers, and (e) pathogen suspension was poured into the planting holes. The results showed that stabbing and soaking tubers in pathogen suspension caused the shortest incubation period (17 days after inoculation) and the highest disease incidence (60%).

Keywords : *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Bacterial ring rot, Potatoes, Inoculation techniques

ABSTRAK

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (*Cms*), penyebab penyakit busuk cincin bakteri pada tanaman kentang, telah terdeteksi keberadaannya pada pertanaman kentang di Pangalengan. Dalam upaya mencegah penyebaran penyakit busuk cincin bakteri di Indonesia, perlu adanya studi epidemiologi patogen tersebut. Pada penelitian epidemiologi akan diperlukan cara menginokulasi tanaman secara buatan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan teknik inokulasi buatan yang dapat menyebabkan periode inkubasi yang lebih singkat dan persentase kejadian penyakit busuk cincin bakteri paling tinggi pada tanaman kentang. Percobaan dilaksanakan di rumah kaca dan laboratorium penyakit Balai Penelitian Tanaman Sayuran (Balitsa), Lembang. Percobaan dirancang secara rancangan acak kelompok dengan lima perlakuan teknik inokulasi *Cms* dan lima ulangan, yaitu inokulasi dengan (a) merendam ubi benih yang telah dilukai dalam suspensi bakteri, (b) merendam ubi benih tanpa dilukai dalam suspensi bakteri, (c) suspensi bakteri ditusukkan pada ketiak daun tanaman kentang, (d) suspensi bakteri ditusukkan pada ubi benih, dan (e) suspensi bakteri disiramkan pada lubang tanam. Masing-masing ulangan terdiri dari lima tanaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari lima teknik inokulasi buatan yang dilakukan, inokulasi dengan melukai ubi benih dan merendamnya dalam suspensi patogen menghasilkan

periode inkubasi tersingkat, yaitu 17 hari setelah inokulasi, dan persentase kejadian penyakit tertinggi yaitu sebesar 60%.

Kata Kunci : *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Busuk cincin bakteri, Kentang, Inokulasi buatan

PENDAHULUAN

Di Indonesia, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (disingkat *Cms*), penyebab penyakit busuk cincin bakteri pada tanaman kentang termasuk kategori OPTK A2, artinya patogen tersebut terdapat di wilayah Indonesia namun masih terbatas pada wilayah tertentu saja. Di Pangalengan telah ditemukan beberapa sampel tanaman yang terinfeksi oleh *Cms* (Suganda dkk., 2009; Djaya, 2010). Demikian pula hasil survey Sulastrini dkk. (2012) di Sulawesi Selatan, yang mendeteksi gejala penyakit busuk cincin bakteri pada tanaman kentang. Penyakit busuk cincin bakteri adalah penyakit utama pada tanaman kentang di Eropa. Penyakit tersebut diduga masuk ke Indonesia melalui kegiatan impor benih kentang dari Jerman dan Belanda. Di negara-negara Eropa, penyakit ini telah mewabah dan tersebar, serta menimbulkan kerugian yang cukup besar. Kerugian hasil panen kentang yang disebabkan penyakit ini dapat mencapai 50%, bahkan pada industri benih kerugian dapat mencapai 100% (OEPP/EPPO, 2006).

Bakteri *Cms* dapat tersebar melalui ubi benih kentang yang terinfeksi. Patogen ini tidak dapat melakukan penetrasi pada kulit ubi, namun membutuhkan lubang alami untuk masuk dan menyerang jaringan vaskular tanaman kentang (Van der Wolf *et al.*, 2005). Bakteri *Cms* juga dapat bertahan pada ubi kentang dalam beberapa generasi dengan jangka waktu yang lama, serta pada wadah penyimpanan kentang, dinding bangunan gedung, serta alat-alat pertanian yang digunakan, sehingga dapat menjadi sumber inokulum (OEPP/EPPO, 2006).

Dalam upaya pencegahan penyebaran patogen ini, perlu adanya studi epidemiologi bakteri *Cms*. Wakman (2006) menyebutkan bahwa komponen penting dalam penelitian epidemiologi antara lain adalah dengan cara menginokulasi tanaman secara buatan. Penelitian mengenai inokulasi buatan pada tanaman inang perlu dilakukan agar dapat diketahui cara inokulasi buatan yang tepat dalam menghasilkan periode inkubasi yang lebih cepat serta persentase kejadian penyakit lebih tinggi.

BAHAN DAN METODE

Percobaan dilaksanakan di rumah kaca dan laboratorium penyakit tumbuhan Balai Penelitian Tanaman Sayuran (Balitsa), di Lembang, Kabupaten Bandung Barat pada ketinggian tempat 1102 mdpl.

Alat yang digunakan adalah ose, tusuk gigi, batang L, gelas ukur, tabung reaksi, *autoclave*, *Laminar Air Flow*, *polybag*, alat semprot, sekop, ajir, papan nama, dan alat tulis. Bahan yang digunakan adalah *aquadest*, media NA dan NCP88, ELISA kit for *Cms* (Agdia), benih kentang varietas Granola (berasal dari Balai Penelitian Tanaman Sayuran), tanah dan pupuk kandang steril, urea, dan isolat bakteri *Cms*.

Metode yang digunakan adalah metode percobaan rancangan acak kelompok. Terdapat lima perlakuan yang diulang sebanyak lima kali, dan setiap ulangan terdiri atas lima tanaman. Pada setiap perlakuan terdapat lima tanaman kontrol yang digunakan sebagai pembanding, dengan perlakuan sama namun inokulasi hanya dengan aquades steril tanpa bakteri *Cms*. Adapun cara inokulasi bakteri pada ubi benih kentang yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- merendam ubi benih yang telah dilukai dalam suspensi bakteri
- merendam ubi benih tanpa dilukai dalam suspensi bakteri
- menusukkan suspensi bakteri pada ketiak daun tanaman kentang
- menusukkan suspensi bakteri pada ubi benih kentang
- suspensi bakteri disiramkan pada lubang tanam.

Isolasi Bakteri

Bakteri diisolasi dari sampel ubi kentang yang menunjukkan gejala penyakit busuk cincin bakteri pada media NCP 88 (de la Cruz, *et al.*, 1992). Media NCP-88 merupakan media agar semiselektif untuk mengisolasi *Cms*. Untuk memastikan bahwa isolat yang didapat adalah bakteri *Cms*, dilakukan uji ELISA, menggunakan Agdia ELISA kit for *Cms* (Agdia Inc. 2009). Selanjutnya, isolat bakteri *Cms* dibiakkan pada media NA.

Persiapan Suspensi Bakteri

Biakan bakteri yang telah diperbanyak pada media NA, dipanen dengan cara mengikis biakan tersebut menggunakan batang L dan dicampur dengan 30 ml aquades steril. Setelah dihomogenkan, kemudian dihitung kerapatannya dengan pengenceran berseri dan *plating* pada media NA. Kerapatan bakteri dalam suspensi yang digunakan untuk inokulasi yaitu 10^8 cfu/ml.

Persiapan Media Tanam

Media tanam yang digunakan adalah tanah dari Lembang (jenis tanah andisol, pH 5,5-7) dengan karakteristik tanah berwarna hitam, lempung berdebu, dan lempung dengan konsistensi gembur. Media tanam ditambah pupuk kandang yang berasal dari kotoran sapi dan urea. Seluruh media kemudian disterilisasi dengan cara dikukus selama 3 jam pada suhu 100-120°C dengan menggunakan mesin broiler.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala Penyakit Busuk Cincin Bakteri

Gejala penyakit busuk cincin bakteri pada tanaman kentang adalah daun menggulung dan layu, dimulai dari daun yang lebih tua/sebelah bawah (Baer & Gudmestad, 2001). Van der Wolf *et al.* (2005) melaporkan bahwa gejala busuk cincin bakteri yang biasa muncul pada tanaman kentang adalah daun layu pada beberapa batang saja dan berwarna kuning, menggulung ke atas, tulang daun berwarna pucat, kemudian daun menjadi berwarna cokelat dan akhirnya mati. Pada hasil penelitian ini, tanaman yang diinokulasi menunjukkan gejala yang dapat diamati, diantaranya berupa kelayuan pada daun yang lebih tua, daun menggulung ke atas, warna daun semakin kusam dan berwarna kekuningan hingga nampak nekrosis sampai akhirnya tanaman mati. Seluruh tanaman kontrol pada setiap perlakuan tidak ada yang menunjukkan gejala penyakit. Hal ini menunjukkan bahwa gejala penyakit yang tampak tersebut adalah disebabkan oleh perlakuan inokulasi dengan bakteri *Cms*.

Pengamatan pada ubi dilakukan setelah tanaman dipanen. Pada ubi, gejala serangan *Cms* dapat terlihat bila ubi dibelah. Bila diamati dari bagian permukaan atau luar, kebanyakan ubi tidak menunjukkan gejala kerusakan. Pada bagian vaskular ubi, terlihat gejala busuk berupa bulatan yang melingkar seperti cincin. Bagian vaskular tersebut nampak berubah menjadi kecoklatan dan

mengeluarkan lendir berwarna putih. Menurut Holger *et al.* (1999), enzim-enzim ekstraseluler yang dikeluarkan oleh bakteri *Cms*, seperti enzim selulosa, pektinase dan amilase dapat mendegradasi dinding sel tumbuhan dan menyebabkan pembusukan ubi dengan merusak pembuluh xilem dan sel-sel parenkim yang berada di sekitarnya.

Periode Inkubasi Penyakit Busuk Cincin Bakteri

Menurut Van der Wolf *et al.* (2005) secara alami, gejala penyakit busuk cincin bakteri biasanya akan muncul pada umur tanaman 7 minggu setelah tanam. Hasil pengamatan pada penelitian ini menunjukkan bahwa macam-macam perlakuan teknik inokulasi buatan yang dilakukan pada ubi dan tanaman kentang menghasilkan periode inkubasi penyakit yang bervariasi (Tabel 1). Periode inkubasi tersingkat terjadi pada perlakuan A, yaitu ubi yang dilukai dan direndam dalam suspensi patogen. Perlakuan dengan melukai dan kemudian merendam ubi dalam suspensi bakteri patogen, menyebabkan patogen lebih mudah dan cepat menginfeksi bagian vaskular ubi, sehingga gejala lebih cepat terlihat. Menurut Van der Wolf *et al.* (2005), salah satu faktor yang membuat ubi kentang mudah terserang bakteri adalah luka yang terdapat pada ubi tersebut, yang memudahkan patogen masuk ke dalam jaringan ubi. Persentasi kejadian penyakit pada perlakuan A juga tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya.

Perlakuan C, memasukkan isolat pada ketiak daun, menghasilkan periode inkubasi yang relatif agak panjang, namun waktu dalam menunjukkan gejala relatif seragam pada seluruh ulangan, gejala layu yang muncul terlihat hampir bersamaan pada beberapa tanaman. Pada saat berada di xilem batang, bakteri *Cms* dapat berkembang biak dengan baik dan menyumbat xilem dengan *exopolysaccharide*, sehingga menghambat aliran air menuju daun dan menyebabkan kelayuan (Holger *et al.*, 1999). Hasil pengamatan ini berbeda dengan hasil penelitian Natasha (2013), di mana cara memasukkan isolat *Cms* pada ketiak daun tanaman terong sebagai tanaman indikator, tidak menyebabkan gejala layu seperti yang diharapkan. Periode inkubasi terpanjang terjadi pada perlakuan B, yaitu ubi tidak dilukai direndam dalam suspensi patogen, sehingga kemungkinan patogen untuk melakukan penetrasi dan berkembang menjadi lebih sulit. Menurut Van der Wolf *et al.* (2005), *Cms* tidak dapat melakukan penetrasi pada kulit ubi, namun membutuhkan lubang alami untuk masuk dan menyerang vaskular tanaman kentang.

Masa inkubasi dipengaruhi oleh umur tanaman, populasi bakteri, virulensi inokulum dan faktor lingkungan (Agrios, 1997). Dalam percobaan ini semua faktor yang memengaruhi masa inkubasi

dibuat relatif sama, sehingga perbedaan yang terjadi merupakan hasil interaksi tanaman kentang dan perlakuan cara inokulasi.

Tabel 1. Periode inkubasi penyakit busuk cincin bakteri.

No	Perlakuan	Kisaran Hari (Hari Setelah Inokulasi)	Rata-Rata Periode Inkubasi (Hari Setelah Inokulasi)
1	A	17 – 32	26,6
2	B	19 – 40	32,1
3	C	19 – 23	20,37
4	D	19- 39	26,62
5	E	-	-

Keterangan :

- A : ubi dilukai dan direndam dalam suspensi patogen
- B : ubi tidak dilukai direndam dalam suspensi patogen
- C : menusuk ketiak daun dan diinokulasi isolat patogen
- D : ubi ditusuk dan diinokulasi dengan isolat patogen
- E : suspensi patogen disiramkan pada lubang tanam

Kejadian Penyakit Busuk Cincin Bakteri pada Tanaman Kentang

Macam teknik inokulasi yang dilakukan pada ubi dan tanaman kentang menyebabkan perbedaan jumlah tanaman yang menunjukkan gejala dan perbedaan persentase kejadian penyakit (Tabel 2). Kejadian penyakit pada perlakuan merendam ubi yang telah dilukai dalam suspensi patogen (perlakuan A) paling tinggi (60%) dan berbeda dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Hal ini dapat terjadi karena secara alami, patogen ini menginfeksi ubi kentang dan bermultiplikasi pada jaringan vaskular di ubi (EPPO, 2011), dengan adanya perendaman dan pelukaan pada bagian vaskular ubi yang akan ditanam, maka patogen dapat masuk lebih mudah ke dalam jaringan ubi dan bermultiplikasi lebih cepat, serta berpeluang lebih besar melakukan infeksi pada ubi dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Tabel 2. Jumlah tanaman bergejala dan kejadian penyakit busuk cincin bakteri.

No	Perlakuan	Jumlah Tanaman Bergejala	Kejadian Penyakit (%)
1	A	15 a	60 a
2	B	7 b	28 b
3	C	8 b	30 b
4	D	8 b	32 b
5	E	0 c	0 c

Keterangan: Huruf yang berbeda pada satu kolom menunjukkan hasil yang berbeda nyata berdasarkan Uji jarak Berganda Duncan taraf 5%.

Tabel 3. Jumlah ubi dengan gejala penyakit.

No	Perlakuan	Jumlah Ubi Dengan Gejala Penyakit
1	A	7 a
2	B	6 a
3	C	7 a
4	D	9 a
5	E	3 a

Keterangan: Huruf yang sama pada satu kolom menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Jarak Berganda Duncan taraf 5%.

Perlakuan dengan menyiramkan suspensi patogen pada lubang tanam (Perlakuan E) tidak menghasilkan tanaman bergejala seperti halnya

tanaman kontrol, sehingga inokulasi dengan menyiramkan suspensi patogen pada media tanam tidak efektif untuk dilakukan pada percobaan

dengan inokulasi buatan. Hal tersebut dikarenakan *Cms* bukanlah patogen tular tanah (Pankova *et al.*, 2007), sehingga apabila inokulasi hanya dilakukan pada media tanam, patogen tidak dapat menginfeksi ubi dan menimbulkan gejala, kecuali terdapat luka pada ubi.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa jumlah ubi yang menunjukkan gejala terinfeksi *Cms* pada semua perlakuan tidak berbeda (Tabel 3). Ubi yang terinfeksi dapat juga dihasilkan dari tanaman yang tidak menunjukkan gejala. Pada perlakuan E tidak terdapat tanaman yang menunjukkan gejala penyakit, namun terdapat beberapa ubi yang menunjukkan gejala terinfeksi *Cms*, meskipun dalam jumlah yang lebih sedikit. Hal tersebut dapat dikarenakan adanya luka pada ubi benih yang dapat menyebabkan patogen menginfeksi ubi. Namun dapat pula karena infeksi laten yang menyebabkan tanaman tidak menunjukkan gejala penyakit secara visual, namun menghasilkan ubi yang terinfestasi *Cms*. Brown *et al.* (2012) mengemukakan, perlu adanya kewaspadaan terhadap tanaman dan ubi yang tidak menimbulkan gejala penyakit, karena dapat terjadi kemungkinan infeksi laten pada ubi, yang selanjutnya akan menyebabkan penyakit pada waktu ubi dijadikan benih dan ditanam. Hal tersebut dapat dikarenakan pada saat ubi kentang yang terinfestasi oleh patogen ditanam, bakteri dapat berkembang biak secara cepat pada tanaman, sehingga mencapai akar dan ubi lain yang terbentuk kemudian (Nelson, 1984).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Setiap perlakuan inokulasi memberikan pengaruh yang berbeda terhadap periode inkubasi dan kejadian penyakit busuk cincin bakteri pada tanaman kentang. Perlakuan dengan melukai kemudian merendam ubi dalam suspensi bakteri *Cms* menghasilkan periode inkubasi tersingkat, yaitu selama 17 hari, dan persentase kejadian penyakit tertinggi, yaitu sebesar 60%.

Saran

Kepada peneliti yang akan melakukan penelitian dengan melakukan inokulasi buatan pada tanaman kentang, dapat dengan menggunakan teknik inokulasi perendaman ubi benih yang dilukai dalam suspensi bakteri *Cms*, agar tanaman lebih cepat menimbulkan gejala.

DAFTAR PUSTAKA

- Agdia Inc. 2009. Agdia Data Sheet for *CMS* Reagent for detecting *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Agdia Inc., 30380 Country Road 6, Elkhart, Indiana 46514 USA. Pp. 1-6.
- Agrios, GN. 2005. Plant Pathology. Edisi ke-5. Florida: Academic press. Hal 160-175
- Asrul. 2006. Teknik Inokulasi Bakteri Patogen pada Beberapa Tanaman. J. AgriSains. Vol :7, 25-29
- Baer, D and NC Gudmestad. 2001. Bacterial ring rot. In: Stevenson, WR, R Loria, GD Franc & Weingartner, DP (Eds.). *Compendium of Potato Diseases*. 2nd ed. Am. Phytopathol. Soc. St. Paul. MN. Pp. 9-10.
- Brown, SC, W Champbell, S Jeffrey. 2012. Bacterial Ring Rot in Alaska Potato Crops. University Of Alasaka Fairbanks. Review. 1-2
- De la Cruz, AR, MV Wiese, and NW Schaad. 1992. A semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from potato tissues. Review of American Phytopathological 76:830-834.
- Djaya, L. 2010. Deteksi *Clavibacter michiganensis* pv. *sepedonicus*, Penyebab Penyakit Busuk Cincin Bakteri, pada Kentang di Jawa Barat dan Eksplorasi Bakteri Antagonisnya. Abstrak thesis. Program Studi Magister Biologi SITH. Bogor
- EPPO. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Bulletin OEPP/EPPO. Volume 41
- Holger, J. B Rainer, B Annette, A Jutta, and E Rudolf. 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. Environmental Microbiology. 1: 113-118.
- Natasha, AS. 2013. Tanaman Indikator untuk Diagnosa Bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* Penyebab Penyakit Busuk Cincin Bakteri pada Tanaman Kentang. Skripsi. Universitas Padjadjaran. Hal 32-36
- Nelson, GA. 1984. Survival of *Corynebacterium sepedonicum* in potato stems and on surfaces held at freezing and above-freezing temperatures. American Potato Journal 62, 23-28.

- OEPP/EPPO. 2006. Diagnostic *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Bulletin OEPP/EPPO 36, 99-109
- Pankova, I, V Krejzar, J Čepl, V Kudela. 2007. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in daughter tubers of volunteer potato plants. Plant Protect. Sci Journal. 43 (4): 127-134
- Suganda, T, W Setiawati, dan I Sulastrini. 2009. Epidemiologi dan Pengendalian Terintegrasi Penyakit Busuk Cincin (*Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus*) pada Tanaman Kentang di Indonesia. Abstrak penelitian LPPM UNPAD. Bandung
- Sulastrini, I, A Winindya, A Susanto. 2012. Evaluasi sebaran penyakit busuk cincin (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) di sentra produksi kentang Sulawesi. Laporan Akhir. Balai Penelitian Tanaman Sayuran. Lembang. Hal 8-9
- Van der Wolf, JM, JG Elphinstone, DE Stead, M Metzler, P Muller, A Hukkanen, and R Karjalainen. 2005. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. Plant Research International B.V., Wageningen. Report 95, 3-4
- Wakman, W. 2006. Epidemiologi dan Komponen Teknologi Pengendalian Organisme Pengganggu Tanaman pada Beberapa Famili Solanaceae. Laporan Penelitian. Balai Penelitian Tanaman Serealia (BALITSEREAL). Makasar. Hal 2-3.