

ARTIKEL PENELITIAN

Survey keberadaan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) pada benih tomat yang diproduksi secara komersial di Indonesia¹

Oleh:
Aswaldi Anwar²

Abstract

The presence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), the pathogen causing bacterial canker on 15 commercial tomato seed lots distributed in Indonesia was evaluated. Extraction and isolation of suspected *Cmm* colonies were conducted by agar dilution plating on SCM or D2ANX media followed by colony purification and identification on YDC and TSA media. Identity of suspected *Cmm* colony was confirmed by hypersensitivity test using *Mirabilis jalapa* and *Nicotiana tabacum* leaves, and pathogenicity test on tomato seedlings.

Results of the experiments showed at least four tomato seed lots out of 15 lots evaluated were suspected to carry *Cmm* and at least two seed lots were positively identified to carry *Cmm* on the seeds. All of the infected seed lots (lot no. 10, lot no. 13) were produced in Java during 2000-2002.

Key-words: bacterial canker, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* seed borne pathogen, tomato.

PENDAHULUAN

Dalam upaya peningkatan produksi tomat dalam negeri, penggunaan benih impor telah berlangsung puluhan tahun. Semenjak akhir tahun 80-an telah diimpor pula benih tomat untuk keperluan perakitan varietas tomat unggul. Konsekuensi dari impor benih tomat yang telah berlangsung selama ini dan pertukaran plasma nutfah untuk perakitan varietas-varietas baru tersebut adalah semakin besarnya kemungkinan terbawanya patogen bersama benih-benih tersebut, karena benih merupakan wahana yang sangat

¹⁾ Dibiayai Oleh Dana Penelitian Dosen Muda (BBI) Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional No Kontrak : 092/P4T/DPPM/ DM/III2004

²⁾ Staf Pengajar Jurusan BDP Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang

cocok bagi patogen untuk menyebar melintasi batasan alaminya (Neergaard 1977; Agrios 1988).

Salah satu penyakit berbahaya pada tomat adalah penyakit kanker bakteri yang disebabkan bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). Penyakit kanker bakteri pada tomat pertama kali dilaporkan pada tahun 1909 di Michigan, Amerika Serikat (Hayward & Waterston 1964; Jones *et al.* 1993). Selanjutnya berbagai informasi tentang penyakit kanker bakteri terus dilaporkan keberadaannya di berbagai negara dan saat ini 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).

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 (*seed-borne*), 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 ini, metode isolasi koloni bakteri yang diduga *Cmm* pada

benih tomat dilakukan dengan *agar dilution plating* pada medium selektif SCM dan D2ANX diikuti dengan konfirmasi identitas koloni bakteri pada medium YDC, uji KOH 3% untuk menentukan bakteri yang diisolasi tergolong gram positif atau gram negatif dan uji hipersensitivitas dengan daun *Mirabilis jalapa* dan *Nicotiana tabacum* serta uji patogenisitas pada bibit tomat berumur tiga minggu setelah tanam (3 MST).

Penelitian ini bertujuan untuk memastikan keberadaan bakteri *Cmm*, penyebab penyakit kanker bakteri pada benih tomat komersial yang diproduksi di Indonesia.

Metode Penelitian

Tempat, waktu dan bahan penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi dan Laboratorium Kesehatan Benih, selama 7 bulan, Januari sampai Agustus 2004. Sumber benih tomat untuk keperluan survei ini berasal dari produsen utama benih tomat komersial di Indonesia yang dapat diperoleh secara bebas di pasar. Total lot benih yang diuji dalam percobaan ini adalah 15 lot.

Ekstraksi dan Isolasi Bakteri *Cmm* dari Benih Lot Benih Tomat

Metode ekstraksi yang dipakai adalah dengan menggerus benih menggunakan "*seed grinder*" Ultra-Turrax T 25 Basic Produksi Jerman. Dari setiap lot benih ditimbang sebanyak 2000 benih (sekitar 6-7 g) dengan ulangan dua kali. Benih tersebut dimasukkan ke dalam wadah botol air mineral bekas ukuran 0.25 L dan ditambahkan 40 ml buffer PBT dan disimpan dalam kulkas selama 15 menit. Kemudian benih digerus dengan "*seed grinder*" selama lebih kurang 30 detik.

Suspensi hasil ekstraksi dipindahkan ke dalam tabung eppendorf steril dan diberi label tanpa pengenceran (0 dilution). Kemudian dilakukan pengenceran 10^{-1} dan 10^{-2} dengan menambahkan buffer PBS. Untuk mendapatkan suspensi 10^{-1} , sebanyak 100 ml

hasil ekstraksi dipipet ke dalam tabung berisi 900 ml PBS dan dari suspensi ini dipipet lagi sebanyak 100 ml ke dalam tabung berisi 900 ml PBS, didapatkan suspensi 10^{-2} .

Medium semi selektif yang digunakan untuk mengisolasi bakteri *Cmm* dari ekstrak benih tomat yang diuji adalah SCM (Fatmi & Schaad (1988) dan D₂ANX (Alvarez *et al.* 1993). Masing-masing suspensi hasil ekstraksi (10^0 , 10^{-1} dan 10^{-2}) dipipet sebanyak 100 μ l ke medium tersebut dan disebar dengan rata menggunakan *glass rod* steril dan cawan petriya ditutup dengan rapat. Masing-masing perlakuan dilakukan secara duplo. Cawan petri berisi isolat tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu 23-27 °C dan diamati selama dua minggu. Pekerjaan yang sama juga dilakukan untuk pembanding (*reference*), yaitu isolat *Cmm* 542 pada kisaran 10^4 , 10^3 dan 10^2 cfu/ml.

Pengamatan dilakukan dengan jalan menghitung jumlah koloni *Cmm* yang terbentuk pada masing-masing cawan petri. Sebagai pedoman, morfologi koloni *Cmm* umur 10 hari pada medium SCM adalah berbentuk agak cembung, irregular, mukoid dengan flek internal berwarna hitam (Bolkan *et al.* 1996, Fatmi & Schaad 1988) dan atau abu-abu, bulat dengan halo dan berair. Sebagai pedoman diperhatikan morfologi isolat *Cmm* 542 sebagai referens. Pada medium D2ANX koloni *Cmm* berbentuk bundar, mukoid dengan warna kuning pucat (Alvarez *et al.* 1993). Jumlah koloni yang terbentuk (CFU) = \sum koloni/cawan x 10 x faktor pengenceran. Untuk konfirmasi, isolat yang diduga (*suspected*) sebagai *Cmm* dibiakkan pada medium YDC, sekaligus untuk mengisolasi bakteri yang diharapkan. Morfologi koloni *Cmm* pada YDC adalah *mucoïd*, *convex* dan berwarna kuning cerah sampai kuning gelap (*dark yellow*). Isolat-isolat yang dicurigai ini dipurifikasi ke medium TSA (40 g TSA per L).

Untuk membuktikan isolat bakteri yang diperoleh adalah gram positif, maka dilakukan pengujian gram. Uji gram yang dilakukan menggunakan KOH 3%. Isolat yang dicurigai

ditumbuhkan pada medium YDC, setelah 1 x 24 jam dengan menggunakan loop steril diambil massa bakteri tersebut dan diuji dengan KOH 3%. Apabila terjadi glutinasi (membentuk seperti gel) dan sewaktu loop ditarik massa bakteri ikut tertarik maka isolat adalah gram negatif. Bila terjadi hal sebaliknya berarti isolat tersebut gram positif dan dapat dicurigai sebagai *Cmm*. Isolat bakteri yang dipastikan tergolong gram positif dilanjutkan pengujiannya dengan uji hipersensitivitas dan uji patogenisitas.

Identifikasi Isolat Bakteri yang Dicurigai Sebagai *Cmm* dengan Uji Hipersensitivitas dan Uji Patogenisitas

Koloni bakteri yang dipastikan gram positif pada uji dengan KOH, ditumbuhkan dalam medium YDC selama 24-48 jam sebelum dilakukan uji hipersensitivitas dan uji patogenisitas. Bakteri yang tumbuh disuspensikan dalam air steril sehingga didapatkan konsentrasi 10^8 cfu/ml yang ditentukan dengan metode turbidimetrik (Hadioetomo 1990). Untuk uji hipersensitivitas, suspensi bakteri (2 μ l) disuntikkan dengan hati-hati menggunakan jarum suntik steril ke lapisan interseluler daun. Air steril (2 μ l) yang disuntikkan ke lapisan interseluler daun digunakan sebagai pembanding. Sedangkan untuk uji patogenisitas dilakukan dengan dua cara yaitu dengan menggantung batang 1 cm di atas kotiledon dengan gunting yang sebelumnya dicelupkan pada suspensi bakteri yang diuji atau dengan jalan menyuntikkan suspensi bakteri ke jaringan pembuluh bibit tomat berumur 3 minggu setelah tanam.

Pengamatan untuk uji hipersensitivitas adalah munculnya gejala nekrosis pada daun yang diinjeksi. Lamanya pengamatan adalah 3 x 24 jam. Pengujian ini sekaligus untuk mempelajari virulensi dari isolat *Cmm* yang berhasil diisolasi. Sedangkan untuk uji patogenisitas adalah waktu munculnya gejala infeksi *Cmm* yang ditandai dengan layunya daun secara unilateral, gejala kanker pada batang, atau diskolorasi pada

jaringan pembuluh (*vascular tissue*). Pengamatan munculnya gejala dilakukan selama satu bulan.

Hasil dan Pembahasan

Hasil evaluasi terhadap 15 lot benih tomat yang beredar di Indonesia mengindikasikan, empat lot benih, yakni lot no. 05, lot no. 09, lot no. 10 dan lot no. 13 menghasilkan koloni bakteri yang cocok dengan morfologi *Cmm* pada medium SCM yang dikemukakan oleh Fatmi & Schaad (1988) atau pada medium D2ANX (Alvarez *et al.* 1993). Jumlah koloni yang dicurigai sebagai *Cmm* pada kedua medium semi selektif yang diuji berkisar antara 0.1×10^2 cfu/ml sampai 0.8×10^2 cfu/ml (Tabel 1). Sementara dari 11 lot benih lain tidak ditemukan adanya koloni bakteri yang dicurigai sebagai *Cmm*.

Tabel 1. Jumlah koloni bakteri yang dicurigai sebagai *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pada medium SCM dan D2ANX

Lot benih	Jumlah koloni (cfu/ml) bakteri yang dicurigai sebagai <i>Cmm</i> pada	
	Medium D2ANX	Medium SCM
Lot no. 05	0.1×10^2	0.1×10^2
Lot no. 09	-	0.2×10^2
Lot no. 10	0.3×10^2	0.8×10^2
Lot no. 13	-	0.2×10^2

Cmm termasuk bakteri gram positif yang relatif sukar diidentifikasi. Morfologi koloninya pada media tumbuh, baik yang semi selektif maupun tidak adalah mukoid, dengan warna dan bentuk yang sangat bergantung pada media. Pada medium D₂ANX yang menurut Alvarez *et al.* (1993) warnanya kuning pucat (*pale yellow*), ternyata hasil pengamatan dalam percobaan ini menunjukkan bahwa warna *pale yellow s/d dark*

yellow perlu dicurigai. Pada medium SCM, menurut Fatmi dan Schaad (1988) koloni *Cmm* adalah bundar, mukoid dengan warna bercak abu-abu sampai hitam (*speckled gray-to-black*). Dari pengamatan yang dilakukan, morfologi irregular atau sedikit bundar warna abu-abu sampai hitam dengan halo yang terkadang sedikit abu-abu gelap pantas juga dicurigai sebagai *Cmm*.

Jumlah koloni yang dipindahkan dari lot no. 05 sebanyak 2 koloni, dari lot no. 09 adalah 2 koloni, dari lot no. 10 adalah 11 koloni dan dari lot no. 13 sebanyak 2 koloni. Dengan demikian didapatkan 11 isolat bakteri yang diduga *Cmm*. Tidak semua koloni yang dipindahkan tersebut menunjukkan morfologi yang sesuai dengan kriteria *Cmm* pada medium YDC. Namun hasil uji gram yang dilakukan menunjukkan semua isolat yang dicurigai tersebut adalah gram positif (Tabel 2).

Sebelas isolat bakteri yang dicurigai sebagai *Cmm* dan terbukti gram positif diujikan pada daun *Nicotiana tabacum* dan *Mirabilis jalapa*. Hasil pengujian menunjukkan hanya tiga isolat yang menyebabkan munculnya gejala nekrosis pada daun (Tabel 2). Hasil ini mengindikasikan bahwa isolat yang digunakan tersebut adalah bakteri *Cmm*. Seperti yang dilaporkan oleh Gitaitis (1990) gejala nekrosis pada daun *M. jalapa* akan muncul setelah 36-48 jam setelah perlakuan dengan suspensi isolat *Cmm*. Dalam percobaan ini didapatkan waktu muncul gejala yang lebih cepat yaitu 6 jam untuk gejala awal dan 24 jam untuk gejala nekrosis total. Kemungkinan terjadinya perbedaan ini antara lain adalah kondisi lingkungan pengujian yang berbeda atau virulensi bakteri yang diuji berbeda.

Tabel 2. Morfologi koloni isolat bakteri terpilih yang diduga *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) dari lot benih tomat pada medium YDC, konfirmasi dengan uji gram dan hasil identifikasi bakteri menggunakan uji hipersensitivitas dan uji patogenisitas

No. isolat	Morfologi koloni pada medium YDC	Identifikasi isolat sebagai <i>Cmm</i> : pada		
		Uji gram	Uji Hipersensitivitas	Uji Patogenisitas
Is-05-k1	Mukoid kuning agak pucat	+	-	-
Is-05-k2	Mukoid kuning agak tua	+	-	-
Is-09-k3	Mukoid kuning agak pucat	+	-	-
Is-10-k4	Mukoid kuning	+	-	-
Is-10-k5	Mukoid kuning	+	+	++
Is-10-k6	Mukoid kuning agak pucat	+	-	-
Is-10-k7	Mukoid kuning	+	+	-
Is-10-k8	Mukoid kuning, agak tua	+	-	-
Is-10-k9	Mukoid kuning, agak pucat	+	-	-
Is-13-k10	Mukoid kuning	+	+	++
Is-13-k11	Mukoid kuning, agak tua	+	-	-

+) diduga sebagai *Cmm*, -) bukan *Cmm*, ++) positif *Cmm*

Pengujian yang sangat menentukan dalam proses identifikasi bakteri adalah uji patogenisitas (Lelliott & Stead 1987). Isolat yang mampu menyebabkan munculnya gejala penyakit pada tanaman inang dipastikan sebagai bakteri patogen. Hasil uji patogenisitas yang dilakukan terhadap 11 isolat bakteri gram positif yang dicurigai sebagai *Cmm* menunjukkan hanya dua isolat yang menimbulkan gejala pada tanaman tomat yang diuji (Tabel 2). Kedua isolat tersebut berasal dari lot no. 10 dan lot no. 13.

Gejala yang ditimbulkan oleh kedua isolat tersebut juga berbeda diantara keduanya dan juga berbeda dengan referens (*Cmm* 542).

Perbedaan virulensi merupakan hal yang biasa terjadi, seperti diterangkan oleh van Vaerenbergh & Chauveau (1987). Perbedaan virulensi yang tidak dapat terdeteksi pada uji-uji yang lain dapat diverifikasi dengan uji patogenisitas atau uji hipersensitivitas. Hasil percobaan ini mengindikasikan isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari lot benih tomat yang diuji adalah bakteri *Cmm* tapi virulensinya berbeda dengan isolat referens yang berasal dari Eropa.

Semua pengujian tersebut diatas mengindikasikan bahwa bakteri *Cmm*, penyebab penyakit kanker bakteri pada tomat telah ditemukan diantara benih tomat yang diproduksi di Indonesia. Keberadaan *Cmm* di antara benih tomat 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.

Perkembangan industri benih di Indonesia yang tengah berkembang dengan cukup pesat satu dasawarsa ini, 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 tomat 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 melokalisir penyebaran *Cmm* melalui survei lapangan sehingga lokasi pertanaman tomat yang sudah 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 dan Werner *et al.* 2002), pencegahan penyebaran *Cmm* lewat benih menggunakan berbagai metode perlakuan benih (*seed treatment*) merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan.

Kesimpulan dan Saran

Dari rangkaian kegiatan yang telah dilaksanakan dapat diambil kesimpulan bahwa ada indikasi benih tomat yang diproduksi di Indonesia telah tertular dengan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) namun virulensi isolat yang diperoleh lebih lemah dibandingkan isolat referens (*Cmm* 542).

Daftar Pustaka

- Agrios GN. 1988. Plant Pathology. Ed ke-3. New York: Academic Press.
- Alvarez A, Derie M, Benedict A, Gabrielson R. 1993. Characteristics of a monoclonal antibody to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (Abstr.) Phytopathol. 83: 1405.
- Bolkan HA, Waters CM, Fatmi M. 1996. ISTA Handbook on Seed Health Testing, working sheet no. 67. Bacterial canker.
- Crop Protection Compendium. 2002. Distribution map for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (bacterial canker of tomato). <http://www.cabicompendium.org/cpc/datasheet.asp?> Akses tanggal 20 Januari 2004.
- Dreier J, Bempohl A, Eichenlaub R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopatogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathol. 85:462-468.

- European Union. 1995. Commission Directive 95/4/EC amendment of 21 February 1995 to the European Community Plant Health Directive (77/93/EEC). Official Journal of the European Communities L 44, 56-60.
- Fatmi M, Schaad NW. 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. *Phytopathol.* 78: 121-126.
- _____. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology* 51: 149-154.
- Francis DM, Kabelka E, Bell J, Franchino B, St. Clair D. 2001. Resistance to bacterial canker in Tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease* 85: 1171-1176.
- Gitaitis RD. 1990. Induction of a Hypersensitivelike Reaction in Four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 74, no.1: 58-60.
- Hadioetomo RS. 1990. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek, Teknik dan prosedur dasar laboratorium. PT. Gramedia, Jakarta
- Hayward, AC, Waterston JM. 1964. *Corynebacterium michiganense*. Commonwealth Mycological Institute, no. 19.
- Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA. Editors 1993. Compendium of Tomato Diseases. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Lelliott RA & Stead DE. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publication. London.
- Neergaard P. 1977. Seed Pathology. Volume 1. New York: John Wiley & Sons.
- [PKP] Pusat Karantina Pertanian. 2002. Daftar Organisme Pengganggu Tumbuhan yang dilaporkan belum terdapat di wilayah Republik Indonesia. <http://www.deptan.go.id/CAQ/Index.htm>. Akses tanggal 29 Januari 2004.
- Van Vaerenbergh JPC, Chauveau JF. 1987. Detection of *Corynebacterium michiganense* in tomato seed-lots. *Bulletin OEPP/EPPO* 17: 131-138.
- Werner NA, Fulbright DW, Podolsky, Bell J, Hausbeck MK. 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the Greenhouse. *Plant Disease* 86: 535-542.