

# Karakterisasi Bakteri Penyebab Busuk Lunak pada Umbi Porang (*Amorphophallus muelleri*) Menggunakan Primer PCR Spesifik

## (Characterization of Bacterial Soft Rot of Porang (*Amorphophallus muelleri*) Tuber Using Specific PCR Primers)

Ely Lailatul Maghfiroh<sup>1</sup>, Abdul Munif<sup>2\*</sup>, Abdjad Asih Nawangsih<sup>2</sup>, Alina Akhdiya<sup>3</sup>

(Diterima Maret 2022/Disetujui Juli 2022)

### ABSTRAK

Porang merupakan salah satu komoditas ekspor yang pada saat ini sedang digencarkan produksinya oleh Pemerintah Indonesia. Penyakit busuk lunak menjadi salah satu kendala dalam budi daya dan pascapanen yang mengakibatkan penurunan produktivitas serta kualitas porang. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri patogen yang menginfeksi umbi porang serta menentukan karakter morfologi dan molekulernya. Sebanyak 43 isolat bakteri berhasil diisolasi dari umbi porang yang bergejala busuk lunak asal Kabupaten Malang. Sepuluh isolat di antaranya menunjukkan reaksi positif pada uji hipersensitif. Aktivitas amilolitik, pektinolitik, mannanase, dan proteolitik ditunjukkan oleh tiga isolat bakteri, di antaranya B4, B7, dan BLUB15 dengan membentuk zona bening di sekitar titik inokulasi. Hasil uji pembusukan menunjukkan bahwa isolat B4 menghasilkan gejala pembusukan paling parah hingga 97,88% pada umbi kentang dan 37,12% pada katak porang. Sepasang primer PCR ExpccR/ExpccF yang digunakan berhasil mendeteksi isolat B4 sebagai *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) pada pita 550 bp. Di luar dugaan, hasil identifikasi dua isolat lainnya tidak menunjukkan kemiripan dengan bakteri penyebab busuk lunak yang telah dikenal sebelumnya. Dua isolat tersebut menunjukkan kemiripan dengan *Empedobacter* sp. B7 (98,7%) dan *Pseudomonas* sp. BLUB15 (97,6%) hasil analisis gen 16S rRNA. Sejauh ini, berdasarkan literatur yang ada, hasil ini merupakan laporan pertama yang menemukan bakteri fitopatogen penyebab busuk lunak pada umbi porang, di luar genus *Pectobacterium* dan *Dickeya*.

Kata kunci: glukomannan, enzim mannanase, *Pectobacterium*, pembusukan

### ABSTRACT

Porang is one of the export commodities whose production is currently intensive by the Indonesian Government. Soft rot disease is one of the obstacles in cultivation and post-harvest of porang, which results in a decrease in productivity and quality of porang. This study aims to isolate pathogenic bacteria that infect porang tubers and determine their morphological and molecular characters. A total of 43 bacteria were isolated from porang tubers with soft rot symptoms from Malang Regency. Ten isolates of them showed positive reactions in the hypersensitivity test. Amylolytic, pectinolytic, mannanase, and proteolytic activities were shown by three bacterial isolates, including B4, B7, and BLUB15, by forming a clear zone around the inoculation point. The results of the decay test showed that B4 isolate had the most severe signs of decay, up to 97.88% in potato tubers and 37.12% in the porang frog. A pair of ExpccR/ExpccF PCR primers successfully detected B4 isolate as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) in the 550 bp band. Unexpectedly, identifying the other two isolates did not show any similarity to the bacteria that cause soft rot, which was previously known. The two isolates showed similarities to *Empedobacter* sp. B7 (98.7%) and *Pseudomonas* sp. BLUB15 (97.6%) as a result of 16S rRNA gene analysis. So far, based on the existing literature, this is the first report of phytopathogenic bacteria causing soft rot outside the genus *Pectobacterium* and *Dickeya*.

Keywords: decay, glucomannan, mannanase enzyme, *Pectobacterium*

### PENDAHULUAN

Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) merupakan komoditas umbi asli tropis yang memiliki

potensi untuk dikembangkan dalam industri pangan hingga manfaatnya di bidang medis. Umbi porang memiliki kandungan glukomannan yang cukup tinggi berkisar antara 50–70% (Wigoeno *et al.* 2013). Glukomannan sendiri merupakan karbohidrat yang sulit dicerna (*low digester*) yang banyak digunakan sebagai pengemulsi, makanan, dan minuman rendah kalori (Zhang *et al.* 2005). Tepung murni yang diekstraksi dari umbi, umumnya dikenal sebagai konjac glukomannan (KGM), dapat dimanfaatkan sebagai obat anti-obesitas, anti-hiperglikemik, dan anti-hiperkolesterol (Chua *et al.* 2010). Selain itu, olahan tepung porang

<sup>1</sup> Sekolah Pascasarjana, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

<sup>2</sup> Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

<sup>3</sup> Pusat Riset Hortikultura dan Perkebunan, BRIN, Cibinong, 16911

\* Penulis Korespondensi: Email: [abdulmunif@apps.ipb.ac.id](mailto:abdulmunif@apps.ipb.ac.id)

dapat dijadikan sebagai salah satu sumber pangan alternatif pengganti karbohidrat.

Dalam proses budi daya porang, petani menghadapi beberapa masalah, salah satunya adalah penyakit busuk lunak umbi yang disebabkan oleh infeksi bakteri patogen. Patogen ini menyerang bagian umbi, baik pada masa tanam maupun pada saat pascapanen. Penyakit busuk lunak yang menyerang pada masa penyimpanan dapat menurunkan kualitas *chip* porang yang dijadikan sebagai produk ekspor ke beberapa negara, seperti Cina, Taiwan, dan Jepang. Busuk lunak merupakan salah satu penyakit perusak tanaman yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen, salah satunya adalah infeksi bakteri (Lee *et al.* 2021). Mikroorganisme patogen yang umum menyerang umbi adalah *Erwinia carotovora* dan *P. carotovora* pada *A. konjac* (Wu *et al.* 2011), *Dickeya dadantii* pada *A. rivier* (Czajkowski *et al.* 2011), dan *P. stutzeri* pada *A. muelleri* (Aini *et al.* 2020). Bakteri-bakteri inilah yang berpotensi menyebabkan busuk lunak pada umbi porang.

Informasi terkait bakteri patogen penyebab busuk lunak pada umbi porang masih terbatas, terutama di Indonesia. Deteksi dan karakterisasi patogen penyebab busuk lunak masih perlu dikembangkan karena informasi tersebut akan dijadikan sebagai dasar dalam menentukan pengendalian yang tepat dan meningkatkan kualitas umbi. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi bakteri patogen penyebab penyakit busuk lunak pada umbi porang, mengevaluasi kemampuannya dalam menyebabkan pembusukan pada umbi kentang dan katak porang secara *in vitro*, dan mengidentifikasi secara molekuler isolat bakteri patogen potensial.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari–November 2021. Metode penelitian yang dilakukan adalah eksperimen yang dilakukan di Laboratorium Biokimia, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen).

### Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Patogen

Isolasi bakteri patogen dilakukan dengan mengacu pada metode Arfani *et al.* (2018). Sampel umbi diperoleh dari 3 lokasi berbeda, yakni Kebun Percobaan Leuwikopo IPB, Jawa Barat (6°33'46.6"S 106°43'35.7"E), Desa Rejosari (8°16'32.5"S 112°36'04.2"E) dan Desa Tawang Argo (7°49'29.6"S 112°34'43.3"E) Kabupaten Malang. Umbi yang bergejala busuk lunak dicuci dengan air mengalir dan dipotong dengan ukuran 1×0,5×0,2 cm<sup>3</sup>. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan merendam umbi pada larutan NaOCl 1% (2 menit) dan aquades steril 2 kali (masing-masing 1 menit). Potongan umbi yang telah steril dikering-anginkan dengan tisu steril dan ditimbang hingga 25 g. Sampel digerus hingga lembut

dengan menambahkan aquades steril ke dalam mortar. Sebanyak 1 mL ekstrak yang telah halus dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi dengan aquades steril sebanyak 9 mL untuk dilakukan pengenceran bertingkat. Sebanyak 100 µL suspensi bakteri ditumbuhkan pada media *nutrient agar* (NA) dengan pengenceran 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>. Isolat diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang dan diamati perkembangan koloninya.

### Uji Hipersensitif

Uji hipersensitif pada daun tembakau dilakukan mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Klement dan Goodman (1967) dengan modifikasi media perbanyak bakteri menggunakan aquades steril. Isolat bakteri patogen berumur 24 jam disuspensikan pada aquades steril. Sebanyak 1 mL (10<sup>8</sup> cfu/mL) suspensi bakteri yang ditumbuhkan pada aquades steril diinfiltrasikan pada permukaan daun bagian bawah menggunakan jarum suntik steril. Infiltrasi aquades steril pada bagian daun yang lain digunakan sebagai perlakuan kontrol perbandingan. Pengamatan gejala dilakukan selama 7 hari. Adanya nekrosis di wilayah sekitar inokulasi menunjukkan reaksi positif pada uji hipersensitif dan isolat tersebut akan digunakan untuk pengujian selanjutnya.

### Uji Pembusukan

Uji pembusukan dilakukan mengikuti prosedur Azizah (2015) untuk membedakan isolat bakteri yang diisolasi mampu menyebabkan gejala busuk lunak pada umbi kentang dan katak porang. Umbi dan katak dicuci dengan air mengalir dan dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara direndam dengan larutan Nystatin 2% untuk menghindari pertumbuhan cendawan pada permukaan umbi/katak. Umbi/katak dibelah menjadi dua bagian dan ditusuk sedalam 5 mm pada 6 titik menggunakan jarum steril. Koloni bakteri diperbanyak dalam media *luria bertani* (LB) *broth* dan digoyang selama 48 jam. Sebanyak 100 µL (10<sup>8</sup> cfu/ml) isolat bakteri patogen diinokulasikan ke permukaan umbi dan katak sehat dengan cara dilukai dengan sengaja menggunakan jarum suntik. Sebagai perlakuan kontrol, umbi/katak dilukai dan disuntik dengan aquades steril. Pengamatan dilakukan selama 14 hari di dalam cawan steril dan diinkubasi pada suhu ruang. Reaksi positif ditunjukkan oleh kehadiran gejala busuk pada bagian umbi/katak. Keparahan penyakit akibat infeksi patogen pada umbi/katak dapat dilihat dengan menghitung luas serangan (LS) yang dihitung menggunakan persamaan (Firgiyanto *et al.* 2016):

$$LS = \pi r^2$$

Keterangan:

LS = Luas serangan umbi/katak yang bergejala busuk lunak

π = 3,14

r<sup>2</sup> = Jari-jari serangan pada umbi/katak

Persentase luas serangan bakteri patogen dihitung dengan rumus:

Persentase LS (%) = (luas serangan/luas umbi) × 100%.

### Uji Patogenesis

Isolat patogen yang memiliki gejala pembusukan paling parah kemudian diuji patogenesisnya dengan planlet porang. Planlet diperoleh dari Laboratorium Biak Sel dan Jaringan BB BIOGEN yang merupakan hasil sub-kultur berumur 4 minggu. Variasi perlakuan uji patogenesis adalah inokulasi isolat bakteri secara tunggal (B4, B7, dan BLUB15), kombinasi dua isolat (B4+B7, B4+BLUB15, dan B7+BLUB15), dan kontrol dengan aquades steril. Inokulasi bakteri dilakukan dengan metode siram yang mengacu pada Delfiani (2003). Isolat bakteri patogen berumur 24 jam dilarutkan dalam aquades steril dengan kerapatan  $10^8$  cfu/mL. Sebanyak 100 µL inokulum disiramkan di atas permukaan media pada botol kultur dan diratakan ke seluruh permukaan media dengan cara digoyang secara perlahan. Perlakuan kontrol menggunakan aquades steril. Inkubasi dilakukan pada suhu 25–27°C selama 4 minggu. Pengamatan dilakukan berdasarkan muncul tidaknya gejala pada planlet porang dimulai pada 1 hari setelah inokulasi bakteri patogen. Gejala yang timbul dengan metode siram adalah adanya layu pada daun paling bawah dan warna menjadi menguning. Insidensi penyakit (IP) dihitung pada hari ke-28 menggunakan rumus Townsend & Heuberger (1943):

$$IP = \frac{n}{N} \times 100\%$$

Keterangan:

IP = Insidensi penyakit

n = Jumlah planlet yang bergejala

N = Jumlah planlet yang diamati

Tingkat ketahanan planlet yang diujikan dapat diketahui dengan nilai persentase insidensi penyakit (IP) yang dikonversikan ke derajat ketahanan menurut Maharijaya *et al.* (2008); rentan (IP > 75%), agak rentan (50% < IP < 75%), tahan (IP < 25%), agak tahan (25% < IP < 50%).

### Karakterisasi Bakteri

**Morfologi.** Koloni bakteri yang memiliki karakteristik morfologi yang berbeda akan dilakukan pemurnian pada media baru untuk mendapatkan koloni tunggal dan dilakukan identifikasi secara morfologi. Karakter morfologi yang diamati meliputi bentuk sel (*coccus*, *bacilli*), tepi koloni (*entire*, *undulate*), elevasi koloni (*flat*, *convex*, *raised*), bentuk koloni (*circular*, *irregular*, *punctiform*), dan warna koloni yang mengacu pada Cappuccino dan Welsh (2018).

**Uji amilase.** Aktivitas amilolitik pada bakteri diukur dengan mengacu pada prosedur yang dilakukan oleh Silitonga *et al.* (2019). Isolat bakteri patogen berumur 24 jam dibiakkan pada media NA yang diperkaya dengan amilum yang berasal dari tepung tapioka. Komposisi media yang digunakan adalah *nutrient broth*

0,65, agar 2 g, tapioka 0,5 g, dan 50 mL aquades. Pengamatan dilakukan selama 3–4 hari. Isolat bakteri patogen yang menunjukkan aktivitas amilolitik pada media dibuktikan dengan pembentukan zona bening di sekitar isolat bakteri. Visualisasi zona bening pada uji enzim amilase dilakukan dengan meneteskan larutan lugol 10 % (dengan komposisi yodium murni (I<sub>2</sub>) 5%, kalium iodida (KI) 10 %, dan H<sub>2</sub>O 85 %) sebanyak 1–2 tetes di atas media perbanyak.

**Uji Pektinase.** Aktivitas pektinolitik diuji dengan metode yang dilaporkan sebelumnya oleh Widowati *et al.* (2014). Isolat bakteri patogen yang berumur 24 jam diinkubasi pada media NA yang diperkaya dengan pektin (*nutrient broth* 0,65 g, agar 1 g, ekstrak pektin 0,5 g, dan 50 mL aquades). Inkubasi pada suhu ruang dilakukan selama 48 jam. Zona bening akan terbentuk di sekitar koloni bakteri yang mampu memproduksi enzim pektinase.

**Uji Mannanase.** Aktivitas mannanase diuji dengan menumbuhkan isolat bakteri patogen yang berumur 24 jam pada media NA yang diperkaya dengan *locust bean gum* (LBG). Komposisi media yang digunakan adalah sebagai berikut: *nutrient broth* 0,15 g, agar 1 g, *yeast* 0,175 g, *trypton* 0,175 g, *MgSO<sub>4</sub>* 0,175 g, *KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* 0,1225 g, *(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>* 0,0875 g, *NaCl* 0,1 g, LBG 0,325 g, dan 50 mL aquades pada pH 7,0 (Sumardi 2005). Visualisasi zona bening pada uji enzim mannanase dilakukan dengan meneteskan larutan *congo red* 0,1% hingga merata ke seluruh permukaan cawan dan didiamkan sekitar 15 menit, kemudian dibilas dengan larutan *NaCl* 2% (Meryandini *et al.* 2008).

**Uji Protease.** Aktivitas proteolitik diuji dengan menumbuhkan isolat bakteri endofit yang berumur 24 jam pada media NA yang diperkaya dengan susu skim. Komposisi media yang digunakan adalah *nutrient broth* 2,4 g, agar 2 g, 2% susu skim, dan 100 mL aquades. Inkubasi pada suhu ruang dilakukan selama 24–48 jam. Zona bening akan terbentuk di sekitar koloni bakteri yang mampu memproduksi enzim protease (Baehaki & Budiman 2011).

**Identifikasi molekuler.** DNA bakteri diekstraksi mengikuti protokol *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid Biotech Ltd.). DNA 16S rRNA diamplifikasi menggunakan mesin PCR (Bio-Rad T100 PCR *Thermal Cycler*) dengan primer universal 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Amplifikasi 16S rRNA dilakukan pada kondisi sebagaimana dipublikasikan oleh Marchesi *et al.* (1998), yakni pre-denaturasi 95°C selama 4 menit, denaturasi 95°C selama 1 menit, annealing 55°C selama 1 menit, elongasi 72°C selama 1 menit, post-elongasi 72°C selama 10 menit, 30 siklus. Komposisi total reaksi 25 µL mengikuti protokol GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) yang terdiri atas 1 µL primer *forward* dan 1 µL primer *reverse*, 1 µL DNA (100 ng), 9,5 µL ddH<sub>2</sub>O, dan 12,5 µL dengan target 1300 pasang basa (1300 bp). Identifikasi juga dilakukan dengan primer spesifik kelompok bakteri *soft rot* di antaranya *Dickeya* (Dsp) (Laurila *et al.* 2010), *P. atrosepticum* (Pba) (Frechon *et*

al. 1998), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) (Kang et al. 2003), *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb) (Ashmawy et al. 2015) dengan kondisi PCR pada Tabel 1. Amplikon dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia untuk proses sekuensing. Sekuens DNA yang diperoleh dianalisis kesejajarannya menggunakan *Bioedit* dan dibandingkan dengan basis data sekuens DNA 16S rRNA yang terdapat pada *GeneBank* menggunakan program *basic local alignment search tool-nucleotides* (BLAST-N) pada situs *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI). Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan *neighbor-joining method* dengan aplikasi *Mega X*.

**Analisis Data**

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) menggunakan perangkat lunak yang digunakan *Microsoft Excel 2010* dan *R Studio 4.1.1*. Apabila terdapat perbedaan yang nyata pada ANOVA, maka dilanjutkan dengan menggunakan uji Tukey pada tingkat kepercayaan 95%.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Isolasi dan Seleksi Bakteri Penyebab Busuk Lunak pada Umbi Porang**

Sebanyak 43 bakteri diisolasi dari umbi porang dengan gejala busuk lunak dari 3 lokasi yang berbeda. Masing-masing isolat diuji reaksi hipersensitif untuk mengetahui sifat patogeniknya yang diujikan pada daun tembakau. Berdasarkan uji hipersensitif, sepuluh

isolat menunjukkan reaksi positif dengan pembentukan bercak nekrosis berwarna kuning pada titik sekitar inokulasi bakteri. Pembentukan bercak nekrotik pada daun merupakan bentuk pertahanan tanaman terhadap serangan mikroorganisme yang bersifat patogenik. Kematian sel jaringan tanaman merupakan respons lanjutan jaringan daun agar kolonisasi bakteri tidak menyebar. Hal ini sesuai dengan pernyataan Amrulloh et al. (2021) bahwa reaksi hipersensitif mengakibatkan kejadian nekrosis pada daun tembakau. Hal ini merupakan bentuk pertahanan tanaman terhadap serangan mikroorganisme yang bersifat patogen. Isolat bakteri patogen yang bereaksi positif pada uji hipersensitif, diamati karakter morfologinya meliputi bentuk sel dan koloni, warna, tepian, dan elevasi. Hasil pengamatan menunjukkan sepuluh isolat tersebut memiliki bentuk sel dan karakter morfologi yang beragam (Tabel 2).

**Uji Pembusukan Isolat Bakteri Terseleksi**

Sepuluh isolat yang bersifat patogenik pada uji hipersensitif, diujikan pada umbi kentang dan katak porang untuk melihat kemampuannya dalam menyebabkan gejala busuk lunak. Umbi kentang digunakan dalam percobaan ini sebagai perlakuan pembanding dikarenakan umbi kentang memiliki jaringan yang lebih lunak dan sangat rentan terhadap penyakit tanaman kelompok *soft rot*. Sementara itu, katak porang digunakan dalam pengujian dikarenakan memiliki tekstur yang sama dengan umbi porang serta lebih mudah diperoleh. Hasil pengujian menunjukkan tiga isolat mampu menyebabkan gejala busuk lunak pada umbi kentang dan katak porang, yakni B4, B7, dan BLUB15. Persentase luas serangan ketiga isolat

Tabel 1 Kondisi reaksi PCR kelompok bakteri *soft rot* dengan primer spesifik

Tahapan reaksi	Jenis primer dan durasinya			
	Expccf/EXpccR (Pcc)	Df/Dr (Dsp)	Y45/Y46 (Pba)	BR1f/L1r (Pcb)
Pre-denaturasi	94°C, 4 menit	94°C, 5 menit	94°C, 5 menit	94°C, 2 menit
Denaturasi	94°C, 1 menit	94°C, 1 menit	94°C, 30 detik	94°C, 1 menit
Annealing	60°C, 1 menit	62°C, 1 menit	65°C, 45 detik	62°C, 45 detik
Elongasi	72°C, 2 menit	72°C, 2 menit	72°C, 45 detik	72°C, 90 detik
Post-elongasi	72°C, 7 menit	72°C, 2 menit	72°C, 5 menit	72°C, 10 menit
Siklus	30x	35x	40x	25x
Target	550 bp	130 bp	420 bp	332 bp

Keterangan: *Dickeya* sp. (Dsp); *Pectobacterium atrosepticum* (Pba); *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc); *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb); pasang basa (bp).

Tabel 2 Karakter morfologi isolat bakteri patogen penyebab busuk lunak umbi porang

Kode isolat	Bentuk Sel	Warna	Bentuk Koloni	Tepian	Elevasi
B3	<i>coccus</i>	merah	<i>filamentous</i>	<i>filiform</i>	<i>raised</i>
B4	<i>bacili</i>	putih bening	<i>irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>raised</i>
B7	<i>bacili</i>	kuning pucat	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>umbonate</i>
B8	<i>basil</i>	putih	<i>irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>raised</i>
LW02	<i>basil</i>	putih	<i>irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>umbonate</i>
LW04	<i>basil</i>	putih keruh	<i>irregular</i>	<i>lobate</i>	<i>raised</i>
LW06	<i>basil</i>	putih	<i>irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>raised</i>
BLUB12	<i>basil</i>	kuning	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>raised</i>
BLUB13	<i>basil</i>	putih bening	<i>irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>raised</i>
BLUB15	<i>coccus</i>	kuning pucat	<i>irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>umbonate</i>

bakteri patogen dalam menyebabkan pembusukan disajikan pada Tabel 3. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa gejala busuk lunak teramati pada hari ke-14 setelah inokulasi bakteri patogen, dan isolat B4 menunjukkan pengaruh yang nyata pada perlakuan kontrol, baik pada perlakuan umbi kentang (97,8%) dan pada katak porang (37,1%).

Gejala pada umbi kentang diawali dengan perubahan warna menjadi kecokelatan dan kemudian menghitam, tekstur umbi menjadi lunak dan berlendir disertai bau tidak sedap ketika dipotong. Berbeda dari perlakuan kontrol dengan aquades steril, umbi kentang tidak mengalami perubahan, baik dari segi tekstur dan warna (Gambar 1). Hal ini sesuai dengan pernyataan Javandira (2012), yakni pada bagian umbi yang terinfeksi patogen akan berwarna kecokelatan disertai pelunakan pada jaringan dan terdapat lendir berwarna krem. Sementara itu, gejala pada katak porang yang terinfeksi oleh bakteri patogen di antaranya katak

mengalami perubahan warna pada hari ke-2 dari kuning menjadi kecokelatan. Tekstur katak mengalami pelunakan serta mengeluarkan bau busuk pada akhir pengamatan. Warna umbi berubah menjadi coklat kehitaman, kulit umbi yang terserang patogen mudah mengelupas (Gambar 2). Umbi atau katak porang yang bergejala busuk lunak berwarna coklat kehitaman, bertekstur lunak, disertai bau yang tidak sedap (Azizah 2015).

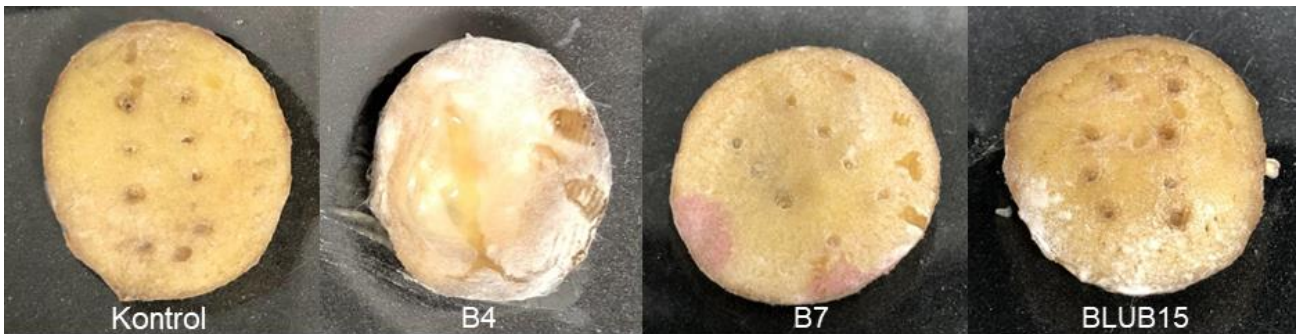
**Uji Patogenesis pada Planlet Porang**

Uji patogenesis pada planlet dilakukan dengan menginokulasikan suspensi bakteri secara tunggal dan kombinasi dua isolat patogen yang bertujuan untuk mengetahui respons planlet porang terhadap variasi inokulasi bakteri. Isolat yang digunakan merupakan isolat B4, B7, dan BLUB15 yang mampu menyebabkan gejala penyakit pada uji pembusukan. Hasil analisis

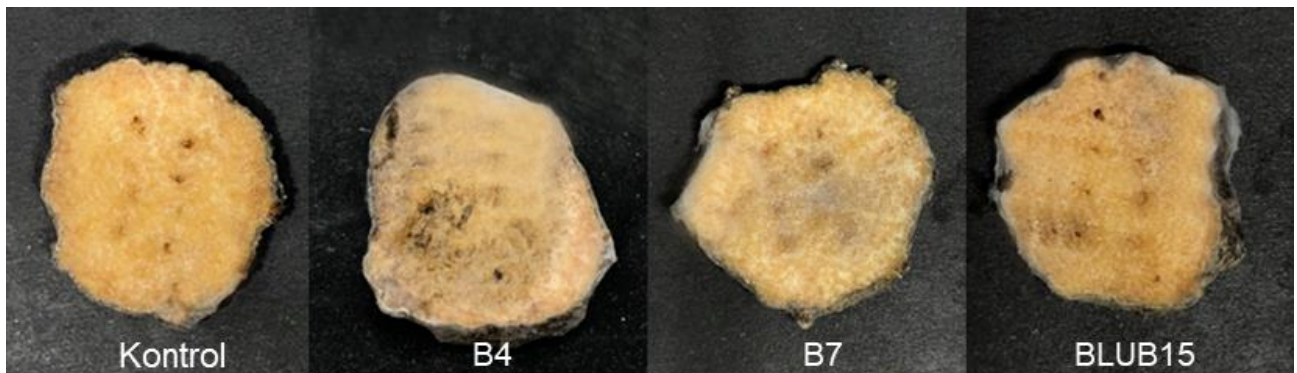
Tabel 3 Luas serangan penyakit busuk lunak pada umbi kentang dan katak porang pada hari ke-14 setelah inokulasi

Perlakuan	LS kentang (%)		LS porang (%)	
	7 HSI	14 HSI	7 HSI	14 HSI
B4	46,2 <sup>a</sup> ± 2,42	97,8 <sup>a</sup> ± 2,12	19,4 <sup>a</sup> ± 5,01	37,1 <sup>a</sup> ± 7,34
B7	9,69 <sup>bc</sup> ± 1,91	20,9 <sup>b</sup> ± 4,51	0,66 <sup>b</sup> ± 0,47	4,79 <sup>b</sup> ± 1,67
BLUB15	20,7 <sup>b</sup> ± 5,70	32,6 <sup>b</sup> ± 5,29	0,69 <sup>b</sup> ± 0,50	1,21 <sup>b</sup> ± 0,41
Kontrol	0,00 <sup>c</sup> ± 0,00	0,00 <sup>c</sup> ± 0,00	0,00 <sup>b</sup> ± 0,00	0,00 <sup>b</sup> ± 0,00

Keterangan: HSI = Hari setelah inokulasi dan LS = Luas serangan.



Gambar 1 Uji pembusukan isolat bakteri patogen pada umbi kentang pada hari ke-14 setelah inokulasi. Isolat B4 menunjukkan perubahan tekstur umbi menjadi lunak dan mudah hancur, disertai bau yang tidak sedap dibandingkan dengan perlakuan kontrol aquades tidak mengalami perubahan baik tekstur maupun bau sejak hari pertama inokulasi bakteri patogen.



Gambar 2 Uji pembusukan isolat bakteri patogen pada katak porang pada hari ke-14 setelah inokulasi. Perlakuan B4 menunjukkan luas serangan paling tinggi dibandingkan perlakuan B7 dan BLUB15. Katak porang mengalami pelunakan pada bagian permukaan disertai bau tidak sedap.

sidik ragam keparahan penyakit perlakuan planlet+B4 menunjukkan perbedaan yang nyata pada perlakuan kontrol (Tabel 4). Kenampakan planlet yang tidak diberi perlakuan bakteri menunjukkan daun dan batang yang sehat serta warna media tampak bersih. Hal ini sebagai indikasi tidak adanya mikroorganisme yang tumbuh di media perbanyak. Pada perlakuan planlet+B4 menunjukkan gejala pada planlet yang diawali dengan adanya perubahan pigmentasi pada daun. Daun planlet yang awalnya hijau tua semakin lama akan berkurang pigmentasi warnanya. Gejala yang terjadi pada batang adalah terjadi perubahan warna menjadi kecokelatan pada 14 HSI. Propagul yang pada awalnya berwarna putih menjadi kecokelatan kemudian menghitam. Gejala akhir pada bagian daun dan batang planlet porang mengalami kelayuan serta berwarna pucat secara keseluruhan (Gambar 3). Hal ini sesuai dengan pernyataan Maharijaya *et al.* (2008) bahwa gejala penyakit dalam pengujian *in vitro* antara lain terdapat perubahan warna pada planlet menjadi pucat atau pudar dan berikutnya tanaman menjadi lemah.

**Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Isolat Bakteri Patogen**

Tiga isolat patogen yang mampu menyebabkan gejala busuk lunak pada umbi kentang dan katak porang dilakukan uji aktivitas enzimatis di antaranya enzim amilase, pektinase, mannanase, dan protease (Tabel 5). Zona bening yang terbentuk pada uji

amilolitik di sekitar titik inokulasi menunjukkan bahwa bakteri tersebut memproduksi enzim amilase yang berhasil menghidrolisis pati menjadi senyawa yang lebih sederhana (Silitonga *et al.* 2019). Pada uji pektinolitik, pektinase dimanfaatkan bakteri patogen sebagai sumber karbon dan energi (Hadiwiyono *et al.* 2013). Ketiga isolat bakteri patogen menunjukkan aktivitas mannanase yang ditandai dengan pembentukan zona tidak ungu di sekitar koloni bakteri. Mannan merupakan polisakarida yang dapat ditemukan pada umbi *Amorphophallus* sp. (Sasongko *et al.* 2015). Bakteri mannanolitik merupakan bakteri yang mampu mendegradasi enzim mannanase dengan cara menguraikan manan dan galaktomanan menjadi manosa dan galaktosa (Johnson 1990). Aktivitas proteolitik juga ditunjukkan oleh ketiga isolat patogen yang ditunjukkan dengan pembentukan zona bening. Enzim protease yang dieksresikan oleh genus *Empedobacter* B7 dan *Pseudomonas* BLUB15 bersifat saling melemahkan kemampuan virulensi patogen pada saat diinokulasikan secara bersamaan. Hal ini dibuktikan dengan hasil uji patogenesis pada planlet porang, di mana perlakuan kombinasi antara dua isolat patogen B7+BLUB15 tidak menyebabkan gejala penyakit pada planlet berumur 28 HSI.

**Karakterisasi Molekuler**

Berdasarkan analisis sekuens gen 16S rRNA, isolat B4 memiliki kekerabatan dengan *Pectobacterium*

Tabel 4 Pengaruh perlakuan bakteri patogen pada insidensi penyakit yang diinokulasikan secara tunggal pada planlet porang pada hari ke-28 setelah inokulasi

Perlakuan	Insidensi penyakit (%)	Tingkat Ketahanan (Maharijaya <i>et al.</i> 2008)
Planlet+Aquades	00.00 <sup>b</sup> ± 00.00	Tahan
Planlet+B4	88.89 <sup>a</sup> ± 11.11	Rentan
Planlet+B7	77.78 <sup>a</sup> ± 11.11	Rentan
Planlet+BLUB15	77.77 <sup>a</sup> ± 22.22	Rentan
Planlet+B4+B7	77.78 <sup>a</sup> ± 11.11	Rentan
Planlet+B4+BLUB15	66.67 <sup>a</sup> ± 00.00	Agak rentan

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama tidak memperlihatkan perbedaan nyata pada uji Tukey taraf 5%.



Gambar 3 Uji patogenesis isolat bakteri patogen terhadap planlet porang (28 HSI)

Tabel 5 Uji kualitatif aktivitas enzimatis isolat bakteri patogen penyebab busuk lunak umbi porang

Kode isolat	Amilase	Pektinase	Mannanase	Protease
B4	+	+	+	+
B7	+	+	+	+
BLUB15	+	+	+	+

Keterangan: + = bereaksi positif.

*carotovorum* subsp. *carotovorum* 95,7% Isolat B4 yang menunjukkan gejala pembusukan paling parah dianalisis dengan 4 jenis primer spesifik kelompok *soft rot* antara lain untuk mendeteksi *Dickeya* (Dsp), *P. atrosepticum* (Pba), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb). Hasil analisis dengan primer spesifik kelompok *soft rot* menunjukkan bahwa isolat B4 memiliki kedekatan dengan Pcc dengan hasil produk 550 bp (Gambar 4). Patogen dari genus *Pectobacterium* sp. yang merupakan agens penyebab utama bakteri busuk lunak adalah *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Wu *et al.* 2011). Spesies *Pectobacterium* merupakan bakteri patogen Gram-negatif yang termasuk dalam famili *Pectobacteriaceae* yang sebelumnya diklasifikasikan dalam genus *Erwinia* (Rosenzweig *et al.* 2016). *Pectobacterium* sp. telah lama dikenal sebagai patogen penyebab penyakit seperti *blackleg*, busuk batang, dan busuk lunak yang menyerang seledri, wortel, tomat, dan komoditas lainnya, baik di lapangan maupun pada saat penyimpanan (Perombelon dan Kelman 1980). Enzim-enzim ekstraseluler protease dan pengurai dinding sel tumbuhan seperti pektat liase, poligalakturonase, dan selulase, merupakan faktor-faktor virulensi fitopatogen yang menyebabkan maserasi jaringan, pembusukan, dan kematian tumbuhan (Barras *et al.* 1994; Bell *et al.* 2004).

Dua isolat patogen lainnya teridentifikasi sebagai *Empedobacter falsenii* B7 (98,8%) dan *Pseudomonas* sp. BLUB15 (97,3%). Konstruksi pohon filogenetik bakteri-bakteri penyebab busuk lunak umbi porang disajikan pada Gambar 5. *E. falsenii* yang sebelumnya dikenal sebagai *Wautersiella falsenii* adalah satu-satunya spesies dari genus tersebut dan dilaporkan sebagai bakteri patogen pada manusia (Zaman *et al.* 2017). Selama ini kedua bakteri tersebut tidak dikenal sebagai bakteri *soft rot*, namun mengingat

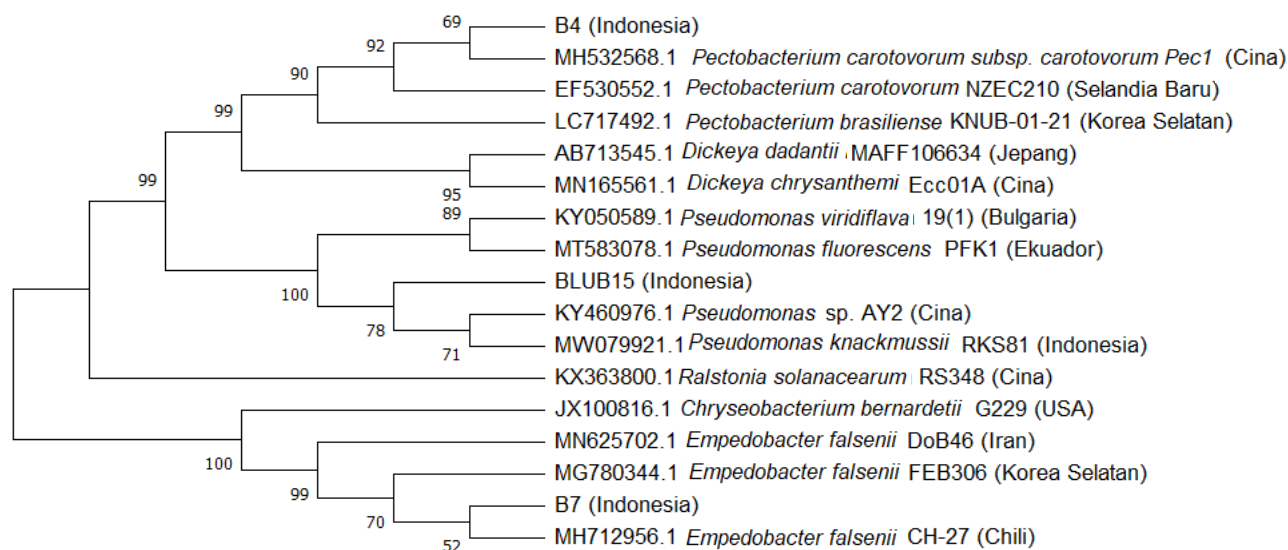
kemampuannya dalam mengekskresikan enzim-enzim pe ndegradasi komponen dinding sel tumbuhan (pektinase), amilase, mannanase, dan protease menjadikannya perlu diwaspadai potensinya sebagai kandidat *new emerging disease* pada porang. Anggota genus *Pseudomonas* yang telah dipublikasikan sebagai penyebab penyakit busuk lunak yaitu *P. allii*. Di Jepang, strain *Pseudomonas* tersebut menyebabkan *soft rot* pada bawang merah dengan gejala umum terbentuknya bercak pada helaian daun dan/atau gejala busuk pada pelepah daun dan umbi (Sawada *et al.* 2021).

## KESIMPULAN

Tiga isolat bakteri patogen yang diisolasi dari umbi porang memiliki potensi dalam menyebabkan penyakit busuk lunak. Berdasarkan uji pembusukan, isolat B4 yang menunjukkan gejala paling parah diketahui sebagai *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) setelah dianalisis dengan primer 16S rRNA dan dikonfirmasi dengan primer spesifik ExpccR/ExpccF pada 550 bp. Pcc B4 memiliki aktivitas enzim di antaranya amilolitik, proteolitik, pektinolitik, dan mannanolitik yang merupakan faktor-faktor penting bakteri fitopatogen dalam mekanisme pelunakan jaringan tanaman.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian yang telah memberikan dana penelitian dan fasilitas dalam proses pengambilan data.



Gambar 5 Pohon filogenetik bakteri penyebab busuk lunak umbi porang (B4,B7, BLUB15) dengan beberapa strain lain di GenBank menggunakan metode Neighbour Joining.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aini AN, Azrianingsih R, Mustofa I. 2020. Identification of potential pathogen bacteria causing tuber rot in porang (*Amorphophallus muelleri* Blume). *Journal of Tropical Life Science*. 10(2): 99–104. <https://doi.org/10.11594/jtls.10.02.02>
- Amrulloh MK, Addy HS, Wahyuni WS. 2021. Karakterisasi fisiologis dan biokimia penyebab penyakit bakteri pembuluh kayu pada tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) di PT Tirta Harapan. *Jurnal Proteksi Tanaman Tropis*. 2(1): 1–7. 9
- Arfani N, Azrianingsih R, Suharjono. 2018. Isolation identification of antagonistic bacterium against pathogens of bacterial tuber rot of *Amorphophallus muelleri*. *Journal of Experimental Life Science*. 8(3): 165–172. <https://doi.org/10.21776/ub.jels.2018.008.03.06>
- Ashmawy N, Mohamed N, Shoeib A, El-Bebany A. 2015. Identification and genetic characterization of *Pectobacterium* spp. and related enterobacteriaceae causing potato soft rot diseases in Egypt. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 9(3): 1847–1858.
- Azizah N. 2015. Isolasi dan karakterisasi bakteri penyebab penyakit busuk lunak pada umbi porang (*Amorphophallus muelleri* Blume [Sarjana]. Universitas Brawijaya. Tersedia pada: <http://repository.ub.ac.id/130130/>
- Barras F, van Gijsegem F, Chatterjee AK. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*. 32(1): 201–234. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.001221>
- Bell KS, Sebahia M, Pritchard L, Holden MTG, Hyman LJ, Holeva MC, Thomson NR, Bentley SD, Churcher LJC, Mungall K, et al. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *PNAS*. 101(30): 11105–11110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402424101>
- Cappuccino JG, Welsh CT. 2018. *Microbiology: A Laboratory Manual, 11th Edition*. Ed ke-11. England (EN): Pearson.
- Chua M, Baldwin TC, Hocking TJ, Chan K. 2010. Traditional uses and potential health benefits of *Amorphophallus konjac* K. Koch ex N.E.Br. *Journal of Ethnopharmacology*. 128(2): 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.021>
- Czajkowski R, Pérombelon MCM, van Veen JA, van der Wolf JM. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*. 60(6): 999–1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>
- Delfiani D. 2003. Evaluasi ketahanan 28 klon kentang (*Solanum Tuberosum*) terhadap penyakit busuk lunak (*Erwinia Carotovora* L.R Jones) secara in vitro [Thesis]. IPB (Bogor Agricultural University). Ed ke-Accepted: 2010-05-07T14:03:14Z. Tersedia pada: <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/15989>
- Firgiyanto R, Aziz SA, Sukma D, Giyanto. 2016. Uji ketahanan anggrek hibrida phalaenopsis terhadap penyakitbusuk lunak yang disebabkan oleh *Dickeya dadantii*. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*. 44(2): 2014–210. <https://doi.org/10.24831/jai.v44i2.13491>
- Frechon D, Exbrayat P, Helias V, Hyman LJ, Jouan B, Llop P, Lopez MM, Payet N, Pérombelon MCM, Toth IK, et al. 1998. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Research*. 41(2): 163–173. <https://doi.org/10.1007/BF02358439>
- Hadiwiyono H, Widyantoro A, Widono S. 2013. Antagonisme *Bacillus* terhadap Infeksi Layu Fusarium pada Bibit Pisang Hasil Kultur Jaringan. *Agrosains : Jurnal Penelitian Agronomi*. 15(1): 21–26. <https://doi.org/10.20961/agsjpa.v15i1.18990>
- Javandira C. 2012. Pengendalian Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*Erwinia carotovora*) dengan Memanfaatkan Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* [Sarjana]. Universitas Brawijaya. Tersedia pada: <http://repository.ub.ac.id/129198/>
- Johnson K. 1990. Exocellular  $\beta$ -mannanases from hemicellulolytic fungi. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 6(2): 209–217. <https://doi.org/10.1007/BF01200943>
- Kang HW, Kwon SW, Go SJ. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology*. 52(2): 127–133. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00822.x>
- Klement Z, Goodman RN. 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 5(1): 17–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.05.090167.000313>
- Laurila J, Hannukkala A, Nykyri J, Pasanen M, Hélias V, Garland L, Pirhonen M. 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology*. 126(2): 249–262. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9537-9>
- Lee S, Vu N-T, Oh E-J, Rahimi-Midani A, Thi T-N, Song Y-R, Hwang I-S, Choi T-J, Oh C-S. 2021. Biocontrol



- of soft rot caused by *Pectobacterium odoriferum* with bacteriophage phiPccP-1 in kimchi cabbage. *Microorganisms*. 9(4): 779. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040779>
- Maharijaya A, Mahmud M, Purwito A. 2008. Uji ketahanan in vitro klon-klon kentang hasil persilangan kentang kultivar atlantic dan granola terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) dan busuk lunak (*Erwinia carotovora*). *Buletin Agronomi*. 36(2): 133–138.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Dymock D, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2): 795–799. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.795-799.1998>
- Meryandini A, Sunarti TC, Naomi A, Mutia F. 2008. Using *Streptomyces Xylanase* to produce xylooligosaccharide from Corncob. *Biotropia*. 15(2): 119–128. <https://doi.org/10.11598/btb.2008.15.2.71>
- Perombelon MCM, Kelman A. 1980. Ecology of the Soft Rot Erwinias. *Annual Review of Phytopathology*. 18(1): 361–387. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.18.090180.002045>
- Rosenzweig N, Steere L, Hammerschmidt R, Kirk W. 2016. Soft rot, blackleg, and aerial stem rot.
- Samanhudi S. 2001. Seleksi In Vitro untuk Mendapatkan Klon Kentang Tahan Terhadap Penyakit Layu Bakteri. *Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture*. 16(1): 1–9.
- Sasongko A, Yopi Y, Rahmani N, Lisdiyanti P, Saepudin E. 2015. Enzymatic Hydrolysis of Mannan from Konjac (*Amorphophallus* sp.) Using Mannanase from *Streptomyces lipmanii* to Produce Manno-oligosaccharides. *Makara Journal of Science* 19(3): 110–116. <https://doi.org/10.7454/mss.v19i3.4850>
- Silitonga LR, Nursyirwani N, Effendi I. 2019. Isolation, identification and sensitivity of amilolytic bacteria from mangrove ecosystem sediment in purnama marine station Dumai on the pathogenic bacteria. *Asian Journal of Aquatic Sciences*. 2(3): 257–266. <https://doi.org/10.31258/ajoa.2.3.257-266>
- Sumardi. 2005. Optimasi produksi enzim  $\beta$ -mananase ekstraseluler dari bakteri *Geobacillus stearothermophilus* L-07. *Jurnal Sains Teknologi*. 11(2): 66–71.
- Sawada H, Fujikawa T, Tsuji M, Satou M. 2021. *Pseudomonas allii* sp. nov., a pathogen causing soft rot of onion in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 71(1).
- Townsend G, Heuberger J, editor. 1943. Methods for estimating losses caused by disease in fungicide experiments. *Plant Disease Report*. 27:340–343.
- Widowati E, Utami R, Nurhartadi E, Andriani M, Wigati AW. 2014. Produksi dan Karakterisasi enzim pektinase oleh bakteri pektinolitik dalam klarifikasi jus jeruk manis (*Citrus cinensis*). *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 3(1): 16–20. <https://doi.org/10.17728/jatp.38>
- Wigoeno YA, Azrianingsih R, Roosdiana A. 2013. Analisis kadar glukomanan pada umbi porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) menggunakan refraksi kondensor. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*. 1(5): 231–235.
- Wu J, Diao Y, Gu Y, Hu Z. 2011. Molecular detection of *Pectobacterium* species causing soft rot of *Amorphophallus konjac*. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 27(3): 613–618. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0496-2>
- Zhang Y, Xie B, Gan X. 2005. Advance in the applications of konjac glucomannan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 60(1): 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.11.003>
- Zaman K, Gupta P, Kaur V, Mohan B, Taneja N. 2017. *Empedobacter falsenii*: A rare non-fermenter causing urinary tract infection in a child with bladder cancer. *SOA-Clinical & Medical Case Reports, Reviews*. 1:002.