

Keanekaragaman Karakter Galur-Galur Bakteri Penyebab Busuk Hitam (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) pada Kubis terhadap Campuran Bahan Aktif Azoksistrobin dan Difenokonazol

Character Diversity of Black Rot Bacterial Strains
(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) on Cabbage against
Mixture of Active Ingredients Azoxystrobin and Diphenconazole

Af'idzatutttama, Abdjad Asih Nawangsih*, Giyanto
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Xanthomonas campestris pv. *campestris* merupakan bakteri penyebab penyakit busuk hitam (*black rot*) pada kubis. Petani masih mengandalkan pestisida sintesis azoksistrobin dan difenokonazol untuk mengendalikan penyakit pada tanaman kubis yang dikhawatirkan akan berdampak pada keanekaragaman *X. campestris* pv. *campestris*. Tujuan penelitian ialah mendapatkan data keanekaragaman secara genetik dan fenotipik isolat bakteri *X. campestris* pv. *campestris*, serta mendapatkan data respons resistensi isolat bakteri tersebut terhadap campuran bahan aktif azoksistrobin dan difenokonazol. Penelitian terdiri atas lima tahapan, yaitu (1) pengambilan sampel pada lahan yang terdapat gejala busuk hitam; (2) isolasi bakteri menggunakan teknik penanaman jaringan; (3) seleksi isolat dengan uji sifat Gram, hipersensitif, hidrolisis pati, dan patogenesitas; (4) identifikasi menggunakan primer spesifik dan universal 16S rRNA; dan (5) analisis keanekaragaman genotipe dengan metode RFLP *in silico* dan keragaman fenotipe dengan mengukur bobot eksopolisakarida. Hasil karakterisasi dan identifikasi secara molekuler diperoleh lima isolat bakteri *X. campestris* pv. *campestris*, yaitu CLT01, CDA08, SDA02, SDA22, dan SDA26. Hasil analisis keanekaragaman genotipe menunjukkan bahwa kelima isolat memiliki keanekaragaman berdasarkan pemotongan fragmen DNA gen 16S rRNA, sedangkan keragaman fenotipe ditunjukkan dengan nilai *inhibition concentration* (IC) yang berbeda-beda. Isolat SDA22 memiliki nilai IC₅₀ paling tinggi dan keanekaragaman secara genetik yang berbeda dibandingkan dengan isolat *X. campestris* pv. *campestris* lainnya. Penggunaan pestisida sintesis azoksistrobin dan difenokonazol secara terus-menerus dalam jangka waktu lama dikhawatirkan berdampak pada patogen seperti *X. campestris* pv. *campestris*. Oleh karena itu, alternatif pengendalian yang lain diperlukan agar tidak terjadi resistensi pada *X. campestris* pv. *campestris*.

Kata kunci: eksopolisakarida, enzim restriksi, *in silico*

ABSTRACT

Xanthomonas campestris pv. *campestris* is a bacterium that causes black rot on cabbage. Farmers still rely on the synthetic pesticides azoxystrobin and difenoconazole to control diseases in cabbage which are feared to have an impact on the diversity of *X. campestris* pv. *campestris*. The objective of the research was to obtain genetic and phenotypic diversity data on *X. campestris* pv. *campestris*, as well as obtaining data on the resistance response of these bacterial isolates to a mixture of the active

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Jalan Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat 16680.
Tel: +62251-8629364, Surel: ryuntania@apps.ipb.ac.id

ingredients azoxystrobin and difenoconazole. The study consisted of five stages (1) sampling on land with black rot symptoms; (2) isolation of bacteria using tissue implant technique; (3) selection of isolates by testing properties of Gram, hypersensitivity, starch hydrolysis, and pathogenicity; (4) identification using specific and universal 16S rRNA primers; and (5) analysis of genotypic diversity by *in silico* RFLP method and phenotypic diversity by measuring EPS weight. The results of molecular characterization and identification obtained five isolates of *X. campestris* pv. *campestris* (CLT01, CDA08, SDA02, SDA22, and SDA26). The results of the analysis of genotypic diversity showed that the five isolates had genetic diversity based on the cutting of the 16S rRNA gene DNA fragment, while phenotypically indicated different Inhibition concentration (IC) values. SDA22 isolate had the highest IC₅₀ value and different genetic diversity compared to other *X. campestris* pv. *campestris*. The use of synthetic pesticides azoxystrobin and difenoconazole continuously for a long time is feared to have an impact on pathogenic microbes such as *X. campestris* pv. *campestris*. So that other control alternatives are needed so that there is no resistance to these pathogenic microbes.

Keywords: exopolysaccharide, *in silico*, restriction enzyme

PENDAHULUAN

Kubis (*Brassica oleracea* var. *capitata*) merupakan salah satu komoditas sayuran yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan banyak diminati oleh masyarakat. Tanaman kubis banyak dibudidayakan di daerah dengan ketinggian 800-1000 m dpl (BPTP2019). Salah satu sentra penghasil kubis di daerah Jawa Barat ialah Kabupaten Cianjur dengan total produksi sebesar 13 748.5 ton per tahun dan menempati urutan ketiga setelah Kabupaten Garut (124 377.7 ton) dan Kabupaten Bandung (66 095.8 ton) (BPS Jawa Barat 2021).

Petani sayuran di Kecamatan Cipanas, Kabupaten Cianjur, Jawa Barat, masih mengandalkan penggunaan pestisida sintetis untuk mengendalikan organisme pengganggu tanaman (OPT) (Darajat 2014). Gusfi (2002) melaporkan bahwa sebagian besar petani responden (95.5%) tanaman sayuran di daerah Cipanas, Jawa Barat, sangat bergantung pada pestisida kimia untuk mencegah dan mengendalikan serangan OPT. Petani meyakini bahwa penggunaan pestisida dapat menurunkan biaya operasional dan menaikkan produksi tanaman sayuran, terutama kubis. Biaya produksi usaha tani tanaman kubis per hektar per musim tanam di Indonesia paling tinggi digunakan untuk pembelian pupuk dan pestisida, serta upah tenaga kerja. Biaya untuk mengendalikan OPT pada kubis per

hektar sebesar 8.52% atau setara dengan nilai Rp 2 836 700.00 (BPS 2018).

Salah satu penyakit penting pada kubis ialah busuk hitam (*black rot*) yang disebabkan oleh *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Gejala khas penyakit busuk hitam pada kubis ialah lesio berwarna kuning yang berbentuk V. Gejala lesio dimulai dari tepi daun kemudian berubah menjadi klorosis pada tulang daun dan akhirnya membusuk dan menghitam (Vicenta dan Holub 2013). Penyakit busuk hitam dilaporkan dapat menyebabkan kerugian sebesar 61% di Desa Kopeng, Kabupaten Semarang (Nugroho 2012).

Pengendalian penyakit di lapang pada tanaman kubis sering menggunakan fungisida. Salah satu fungisida yang diaplikasikan pada tanaman kubis memiliki campuran bahan aktif azoksistrobin dan difenokonazol. Peningkatan penggunaan dosis azoksistrobin dapat menghambat pertumbuhan bakteri organotrofik, aktinomiset, dan cendawan. Penggunaan fungisida yang berbahan aktif azoksistrobin dan difenokonazol pada tanaman kubis secara terus-menerus dikhawatirkan berdampak terhadap bakteri, terutama bakteri patogen (Bacmaga *et al.* 2015). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mendapatkan keanekaragaman secara genetik dan fenotipik isolat bakteri *X. campestris* pv. *campestris* serta mendapatkan responsnya terhadap campuran bahan aktif azoksistrobin dan difenokonazol.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel dan Isolasi *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Sampel daun diambil dari 4 lahan di Kabupaten Cianjur-Jawa Barat, yaitu pada lahan tanaman kubis yang terdapat gejala busuk hitam serta dilakukan pengendalian menggunakan bahan aktif campuran azoksistrobin dan difenokonazol. Sampel diambil dengan teknik *purposive sampling* dan wawancara dengan petani untuk didapatkan identitas sampel. Identitas sampel di antaranya ialah lokasi pengambilan, varietas tanaman, umur tanaman, dan pengendalian yang digunakan.

Isolasi *X. campestris* pv. *campestris* dilakukan dengan metode penanaman jaringan tanaman mengikuti Panjaitan *et al.* (2014). Isolasi dilakukan pada medium *yeast dextrose carbonat agar* (YDCA) dan *nutrient agar* (NA).

Seleksi Bakteri *X. campestris* pv. *campestris*

Uji Gram. Uji Gram dilakukan menggunakan metode KOH 3%. Sebanyak 1 lup bakteri dicampurkan dan diaduk dengan larutan KOH 3% yang sudah diteteskan pada kaca preparat (Schaad *et al.* 2001).

Uji Hidrolisis Pati. Uji hidrolisis pati menggunakan medium *starch hydrolisis* yang terdiri atas pepton, *beef extract*, agar, dan *starch (soluble potato)* (Schaad *et al.* 2001).

Uji Hipersensitivitas. Sebanyak 1 lup isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *nutrient broth* (NB) selama 24 jam. Suspensi bakteri diambil sebanyak 1 mL, kemudian diinfiltrasikan pada bagian bawah daun tembakau menggunakan jarum *syringe*. Isolat yang menghasilkan gejala nekrotik (hasil uji positif) digunakan untuk uji lanjut.

Uji Patogenisitas. Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium NB selama 24 jam. Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara *clip-method*, yakni menggunting atau memotong pinggir daun kubis sekitar 5 cm dengan gunting yang telah dicelupkan dalam suspensi bakteri *X. campestris* pv. *campestris* (Parida 2016). Isolat yang menimbulkan gejala pada daun kubis setelah 7 hari inokulasi digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Identifikasi *X. campestris* pv. *campestris* secara Molekuler

Identifikasi bakteri dilakukan dengan teknik PCR yang diawali dengan ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan metode Sambrook dan Russel (2001). Selanjutnya amplifikasi fragmen DNA dilakukan menggunakan mesin PCR GeneAmp PCR system 9700 dengan sepasang primer spesifik bakteri *X. campestris* pv. *campestris* dan primer universal 16S rRNA. Primer spesifik yang digunakan yaitu (BE1 dan BE2) F (5'-CCGTAGCACTTAGTGCAATG-3') dan R (5'-GCATTTCCATCGGTCACGATTG-3') (Berg *et al.* 2006), sedangkan primer universal yaitu 16S rRNA bakteri 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-ACCTTGTTAGGACTT-3').

Proses PCR menggunakan primer spesifik berlangsung sebanyak 30 siklus dengan target DNA berukuran ± 619 pb. Proses PCR terdiri atas pre-denaturasi pada 94 °C selama 5 menit, denaturasi pada 94 °C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 58 °C selama 1 menit, ekstensi awal pada suhu 72 °C selama 15 detik, dan ekstensi akhir berlangsung selama 10 menit pada suhu 72 °C. Total volume PCR yang digunakan sebanyak 50 µL terdiri atas 4 µL primer 16S (F dan R), 25 µL master mix (MyMaq HS Red Mix 2x), 2 µL DNA templat, dan 19 µL ddH₂O. Proses PCR menggunakan primer universal berlangsung sebanyak 35 siklus yang terdiri atas pre-denaturasi 95 °C selama 5 menit, denaturasi 95 °C selama 30 detik, *annealing* 55 °C selama 30 detik, ekstensi 72 °C selama 1 menit, dan ekstensi akhir 72 °C selama 10 menit (Frank *et al.* 2008).

Hasil amplifikasi DNA dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% pada tegangan 50 volt selama 50 menit. Pita DNA yang tervisualisasi didokumentasikan.

Analisis Keanekaragaman Genotipe *X. campestris* pv. *campestris*

Hasil amplifikasi pada identifikasi molekuler digunakan untuk sekuensing nukleotida. Sekuensing peruntukan basa nukleotida menggunakan gen 16S rRNA untuk analisis keragaman genotipe. Analisis

keragaman genotipe menggunakan dua metode, yaitu analisis filogenetika dan *in silico*.

Analisis Filogenetik Sikuen Gen 16S rRNA. Hasil sekuensing peruntukan basa nukleotida gen 16S rRNA kemudian dibuat pohon filogeni menggunakan aplikasi MEGA X dengan metode *neighbour joining tree*. Sebagai pembanding, diambil sikuen gen 16S rRNA *X. campestris* pv. *campestris* dari negara China, Serbia, Mexico, dan India. Sebagai outgrup, digunakan sikuen dari gen 16S rRNA *Agrobacterium tumefaciens*. Sikuen gen diambil dari data yang terdeposit dalam GenBank.

Analisis RFLP *in Silico*. Hasil peruntukan nukleotida gen 16S rRNA digunakan untuk analisis keanekaragaman genetik secara *in silico*. Keanekaragaman genetik didasarkan pada situs pemotongan menggunakan enzim restriksi pada software pDraw 32. Enzim restriksi yang digunakan ialah *AciI*, *AluI*, *DdeI*, *EcoRI*, dan *RsaI*. Hasil pemotongan enzim restriksi digunakan untuk menentukan pengelompokan isolat *X. campestris* pv. *campestris* dengan metode *nearest neighbour* menggunakan program *multivariate statistical package* (MVSP).

Pengujian Toksisitas Campuran Azoksitrobin dan Difenokonazol terhadap Bakteri *X. campestris* pv. *campestris*

Fungisida yang digunakan ialah AmistarTop (azoksitrobin 200 g L⁻¹ + difenokonazol 125 g L⁻¹) sesuai dosis anjuran, yaitu 1 mL L⁻¹ (X). Pengujian dilakukan pada medium YDCA yang telah dicampur fungisida uji sesuai konsentrasi perlakuan (X, ¼X, ½X, ¾X, 3/2X, 2X). Perlakuan kontrol ialah medium YDCA tanpa fungisida. *X. campestris* pv. *campestris* dibuat suspensi dalam medium NB hingga mencapai kerapatan 10⁷ cfu mL⁻¹. Selanjutnya sebanyak 1 mL suspensi disebar pada medium YDCA sesuai perlakuan dan diinkubasi selama 72 jam. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dihitung populasi dan persen penghambatannya. Persen penghambatan (PP) dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$PP (\%) = \frac{PB \text{ perlakuan} - PB \text{ kontrol}}{PB \text{ kontrol}} \times 100\%, \text{ dengan}$$

PP, persen penghambatan dan PB, populasi bakteri.

Hasil perhitungan persen penghambatan kemudian diolah menggunakan software POLO PC untuk menentukan nilai IC₅₀, IC₉₀, dan IC₉₅.

Uji Produksi Eksopolisakarida (EPS)

Isolat bakteri *X. campestris* pv. *campestris* hasil karakterisasi dianalisis secara fenotipik kandungan EPSnya menggunakan metode Putrie (2013) dengan modifikasi. Sebanyak 1 lup bakteri dimasukkan ke dalam 10 mL medium PSB dan diinkubasi pada inkubator bergoyang selama 24 dan 48 jam. Suspensi bakteri sebanyak 1 mL dipindahkan ke dalam tabung mikro 1.5 mL, kemudian disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Dalam tabung mikro yang baru, sebanyak 950 µL supernatan dicampur etanol 96% dingin sebanyak 2× volume supernatan dan didiamkan selama 24 jam. Supernatan disentrifugasi kembali pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10 000 rpm selama 15 menit. Pelet yang terbentuk dikeringkan dalam oven (55 °C) dan ditimbang bobot kering EPS-nya. Bobot senyawa EPS total yang mengendap di dasar tabung dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Bobot EPS} = \text{Bobot EPS dalam tabung} - \text{Bobot tabung}$$

HASIL

Gejala, Intensitas, dan Pengendalian Penyakit Busuk Hitam di Lapangan

Gejala penyakit busuk hitam pada daun kubis ditandai dengan nekrosis yang dimulai dari pinggir daun dan menyebar ke tengah mengikuti arah vena daun (Gambar 1). Selain itu terdapat lesio kuning yang berbentuk seperti huruf V pada daun sakit.

Hasil pengamatan intensitas penyakit busuk hitam di beberapa lokasi di daerah Cianjur menunjukkan bahwa penyakit ini masih menjadi kendala utama bagi petani. Lahan kubis ditanam secara monokultur dan

tumpangsari dengan bawang daun. Kondisi lahan di sekitar tanaman kubis banyak ditumbuhi gulma. Lahan yang ditumbuhi gulma lebih banyak mengalami gejala yang lebih berat. Hal ini dikarenakan kondisi lahan lebih lembab sehingga gejala cepat berkembang dan menyebar. Petani menggunakan fungisida yang memiliki bahan aktif campuran azoksistrobin dan difenokonazol untuk mengendalikan penyakit. Campuran bahan aktif azoksistrobin dan difenokonazol diaplikasikan petani pada semua lahan lokasi pengambilan sampel. Rata-rata petani mengaplikasikan bahan aktif ini dengan intensitas 2–3 kali dalam seminggu. Selain bahan aktif azoksistrobin



Gambar 1 Gejala busuk hitam pada daun kubis di lokasi pengambilan sampel daerah Cianjur, Jawa Barat.

dan difenokonazol, bahan aktif lain yang diaplikasikan petani, yaitu asibenzolar s-metil dan mankozeb, piraklostrobin, propinep, dan mankozeb (Tabel 1).

Karakteristik Isolat Bakteri *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Hasil isolasi pada 3 lokasi pengambilan sampel didapatkan 62 isolat. Hasil isolasi tersebut terdiri atas 9 isolat CLT, 17 isolat CDA, 36 isolat SDA. Isolat yang tumbuh pada medium YDCA dan NA memiliki koloni berwarna kuning.

Sebanyak 62 isolat diseleksi dengan uji sifat Gram dan didapatkan 24 isolat bersifat Gram negatif. Bakteri Gram negatif dicirikan dengan terbentuknya lendir ketika diangkat menggunakan jarum ose. Berdasarkan uji hidrolisis sebanyak 15 isolat bakteri berhasil membentuk zona bening di sekitar koloni. Reaksi hipersensitif positif ditandai dengan terbentuknya gejala nekrosis pada daun tembakau setelah disuntik dengan isolat bakteri *X. campestris* pv. *campestris* (Gambar 2a). Hasil uji patogenesis menunjukkan bahwa 15 isolat dapat menimbulkan gejala nekrosis daun kubis setelah 7 hari inokulasi (Gambar 2b).

Amplifikasi DNA *X. campestris* pv. *campestris* menggunakan primer spesifik BE 1

Tabel 1 Identitas lokasi sampel daun kubis yang bergejala busuk hitam dan asal isolat *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Lokasi	Varietas	Umur tanaman (bulan)	Pengendalian	Kode isolat
Desa Ciloto, Kec. Cipanas, Cianjur	Gutji	2	- Azoksistrobin & Difenokonazol	CLT01
Desa Cipendewa, Kec. Pacet, Cianjur	Polaris	2.5	- Azoksistrobin & Difenokonazol - Asibenzolar s-metil & Mankozebe - Difenokonazol - Mankozebe	CDA08
Desa Sindangjaya, Kec. Cipanas, Cianjur	Polaris	3	- Azoksistrobin & Difenokonazol - Propinep - Mankozebe	SDA02
Desa Sindangjaya, Kec. Cipanas, Cianjur	Polaris	3	- Azoksistrobin & Difenokonazol - Propinep - Mankozebe	SDA22
Desa Sindangjaya, Kec. Cipanas, Cianjur	Polaris	3	- Azoksistrobin & Difenokonazol - Propinep - Mankozebe	SDA26



Gambar 2 Pengujian isolat bakteri *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. a, Nekrosis daun tembakau pada uji hipersensitivitas dan b, Nekrosis daun kubis pada uji patogenesisitas.

dan BE 2 menunjukkan bahwa terdapat lima isolat bakteri yang teramplifikasi, yaitu CLT01, CDA08, SDA02, SDA22, dan SDA26 (Gambar 3). Sebanyak lima isolat bakteri *X. campestris* pv. *campestris* bersifat Gram negatif, patogen terhadap tanaman, dan hidrolisis positif pada medium yang mengandung pati (Tabel 2). Bakteri *X. campestris* pv. *campestris* pada medium YDCA memiliki koloni berwarna kuning, mengkilap, elevasi cembung, *mucoïd* (berlendir), dan tepian licin (Gambar 4).

Analisis Sikuen dan Filogenetika *X. campestris* pv. *campestris*

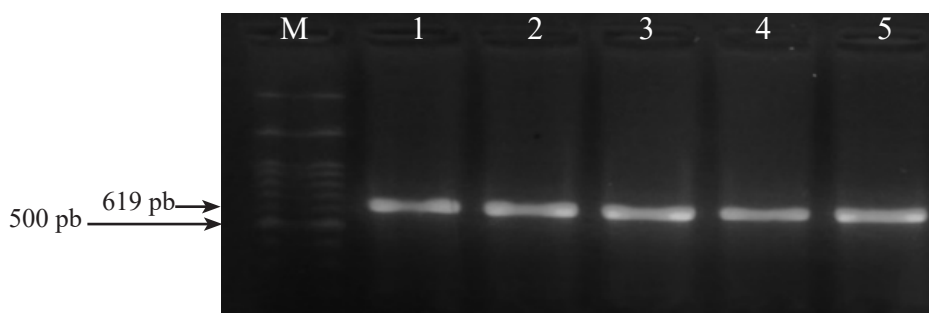
Urutan basa nukleotida hasil sekuensing yang diperoleh kemudian disejajarkan pada data *GeneBank* menggunakan program BLAST pada situs NCBI. Hasil penyejajaran didapatkan 5 isolat yang teridentifikasi sebagai *X. campestris* pv. *campestris*. Isolat *X. campestris* pv. *campestris* memiliki kedekatan dengan isolat *X. campestris* pv. *campestris* dari negara India, China, Serbia, dan Mexico. Homologi lima isolat *X. campestris* pv. *campestris* tersebut memiliki kemiripan lebih dari 99% (Tabel 3).

Analisis filogenetika dengan *neighbour joining tree* menggambarkan kekerabatan isolat *X. campestris* pv. *campestris* yang didapatkan dengan isolat dari negara lain. Isolat CLT01, SDA02, dan SDA22 berkerabat

dekat dengan *X. campestris* pv. *campestris* dari China, sedangkan isolat SDA26 dan CDA08 berkerabat dekat dengan *X. campestris* pv. *campestris* dari Serbia (Gambar 5).

Analisis Keanekaragaman dengan RFLP *in Silico*

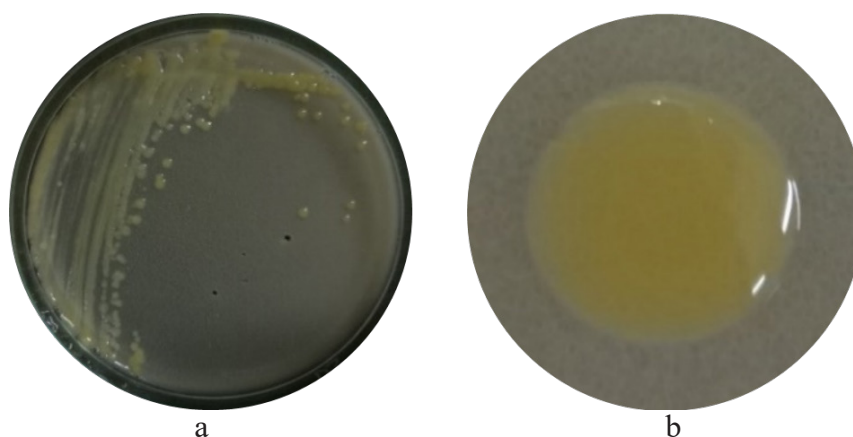
Bakteri dikelompokkan menjadi 3 kelompok berdasarkan profil terhadap situs pemotongan 5 enzim menggunakan program MVSP dengan metode *nearest neighbour*. Berdasarkan situs pemotongan menggunakan enzim restriksi, sebanyak 5 isolat bakteri *X. campestris* pv. *campestris* dan 4 spesies pembandingan yang diambil dari GenBank dikelompokkan menjadi 5 kelompok. Kelompok tersebut adalah kelompok 1 (CLT01), kelompok 2 (SDA22), kelompok 3 (CDA08, SDA26, SDA02), kelompok 4 (*X. campestris* pv. *campestris* Serbia dan China), dan kelompok 5 (*X. campestris* pv. *campestris* Mexico dan India) (Gambar 6). Hasil pengelompokan menggunakan MVSP tidak berbeda jauh jika dibandingkan dengan analisis *neighbour joining tree* berdasarkan sikuen gen 16S rRNA. Semua isolat saling memiliki kedekatan meskipun dengan pengelompokan yang berbeda, karena isolat masih dalam satu cabang. Hasil pemotongan enzim enzim *AluI*, *Acil*, *DdeI*, *EcoRI*, dan *RsaI* dari sikuen gen 16S rRNA ditampilkan pada (Gambar 7).



Gambar 3 Visualisasi fragmen DNA *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* penyebab busuk hitam pada kubis menggunakan primer spesifik BE 1 dan BE 2. M, Marker 100 pb; 1, Isolat CLT01; 2, Isolat CDA08; 3, Isolat SDA02; 4, Isolat CDA22; dan 5, Isolat CDA26.

Tabel 2 Sifat patogenesitas, hipersensitivitas (HR), hidrolisis pati, sifat Gram, dan hasil amplifikasi DNA isolat bakteri *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Kode isolat	Asal isolat	Uji patogenesitas	Uji HR	Uji hidrolisis pati	Uji Gram	PCR
CLT01	Ciloto	+	+	+	negatif	+
CDA08	Cipendewa	+	+	+	negatif	+
SDA02	Sindangjaya	+	+	+	negatif	+
SDA22	Sindangjaya	+	+	+	negatif	+
SDA26	Sindangjaya	+	+	+	negatif	+



Gambar 4 Karakteristik koloni isolat *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* asal tanaman kubis pada medium *yeast dextrose carbonat agar*. a, Gores kuadran dan b, Koloni tunggal isolat.

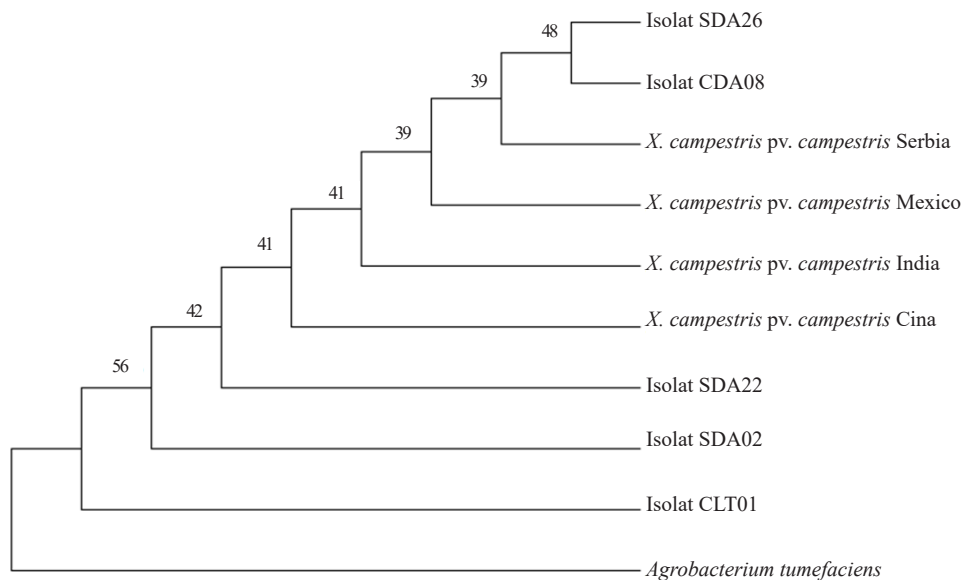
Toksitas Bahan Aktif Fungisida pada Isolat Bakteri *X. campestris* pv. *campestris*

Nilai IC₅₀ senyawa kimia campuran aktif azoksistrobin dan difenokonazol terhadap isolat-isolat *X. campestris* pv. *campestris* beragam (Tabel 4). Isolat SDA22 memiliki nilai IC₅₀ yang paling tinggi dan melebihi dari konsentrasi anjuran, sedangkan isolat CLT01, CDA08, SDA02, dan SDA26 memiliki nilai IC₅₀ kurang dari konsentrasi

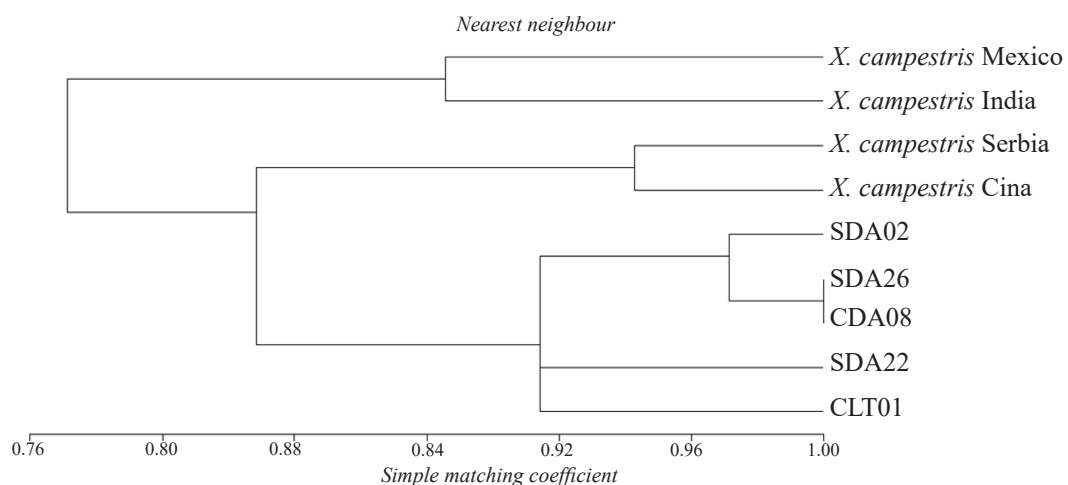
anjuran. Isolat SDA22 memiliki nilai IC₅₀ sebesar 2.67, nilai 2.67 menandakan bahwa untuk membunuh sebesar 50% dari populasi bakteri *X. campestris* pv. *campestris* di lapang diperlukan sebanyak 2.67 mL L⁻¹ bahan aktif. Nilai 2.67 mL L⁻¹ termasuk tinggi karena konsentrasi tersebut sudah melebihi dari konsentrasi anjuran. Konsentrasi anjuran pada label produk sebesar 1 mL L⁻¹ (Tabel 4). Nilai IC₅₀ yang tinggi ini diindikasikan bahwa

Tabel 3 Hasil analisis homologi urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat bakteri dengan database nukleotida di GenBank

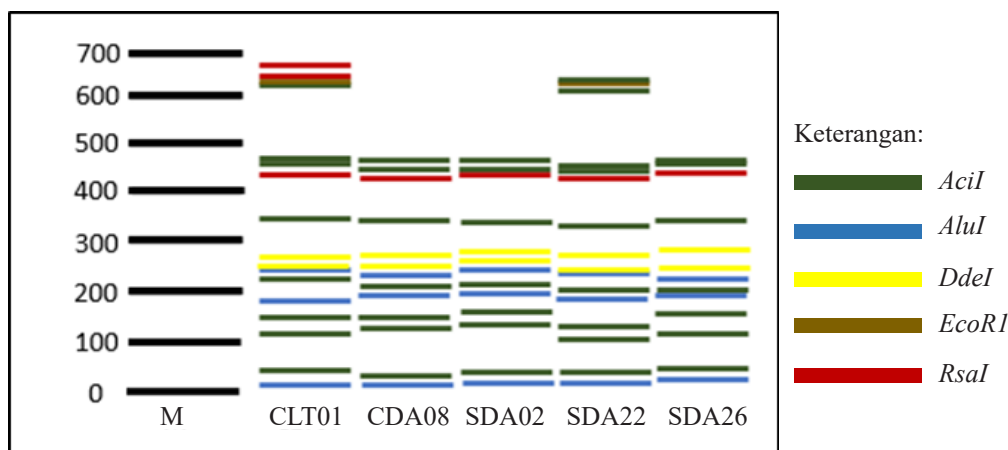
Kode isolat	No akses	Asal negara	Query cover (%)	Spesies	Homologi (%)
CLT01	MG597200.1	India	100	<i>X. campestris</i> galur MSSRF	98.93
CDA08	KP182149.1	China	100	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> galur SHC-1	99.82
SDA02	MN565572.1	Serbia	100	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> galur KS-42	100.00
SDA22	MT645261.1	Mexico	100	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> galur Xcf2-APJR	99.84
SDA26	MN565571.1	Serbia	100	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> galur KLj-1	99.67



Gambar 5 Kontruksi pohon filogenetika *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* asal Cianjur, Jawa Barat dan isolat negara lain dengan metode *neighbour joining tree*.



Gambar 6 Pengelompokan isolat *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* asal Cianjur, Jawa Barat berdasarkan situs pemotongan enzim *AluI*, *Acil*, *DdeI*, *EcoRI*, *RsaI* dari sikuen gen 16S rRNA dengan metode *nearest neighbour* menggunakan MVSP.



Gambar 7 Visualisasi elektroforesis pemotongan fragmen DNA *X. campestris* pv. *campestris* asal Cianjur, Jawa Barat menggunakan 5 enzim restriksi.

Tabel 4 Nilai IC₅₀, IC₉₀, dan IC₉₅ campuran bahan aktif azoksistrobin dan difenokonazol terhadap *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Kode isolat	a ± GB ^a	b ± GB ^b	Inhibition concentration (ml L ⁻¹)		
			IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₉₅
CLT01	0.195 ± 0.058	2.188 ± 0.198	0.814	3.138	4.600
CDA08	1.474 ± 0.112	0.934 ± 0.334	0.027	5.929	37.353
SDA02	0.179 ± 0.090	2.288 ± 0.305	0.836	7.630	16.186
SDA22	-0.654 ± 0.059	1.571 ± 0.221	2.607	17.060	29.059
SDA26	2.483 ± 0.173	2.133 ± 0.449	0.069	0.734	1.644

Keterangan: a, intersep regresi probit; b, kemiringan garis regresi probit; dan GB, galat baku.

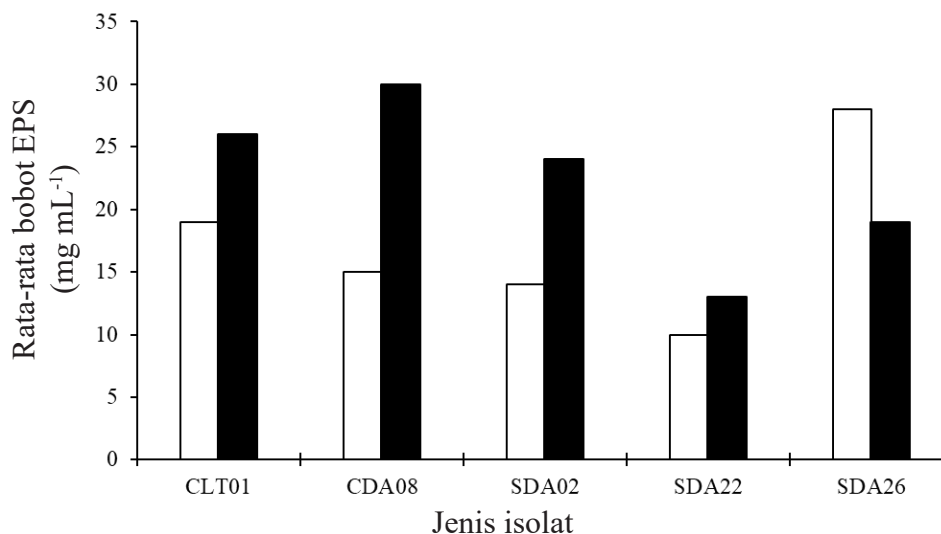
isolat SDA22 sudah mulai tahan atau resisten terhadap bahan aktif tersebut. Berdasarkan informasi dari lahan pengambilan sampel, intensitas penyemprotan bahan aktif di lahan tersebut dilakukan sebanyak 2–3 kali selama seminggu. Jika petani merasa tidak memberikan dampak terhadap gejala penyakit yang ada, konsentrasi penyemprotan bahan aktif sering dinaikkan dari konsentrasi anjuran. Dampak dari perlakuan petani di lapang seperti ini dapat memengaruhi habitat bakteri *X. campestris* pv. *campestris*.

Produksi Senyawa Eksopolisakarida

Rata-rata bobot EPS yang dihasilkan bakteri *X. campestris* pv. *campestris* selama 24 dan 48 jam inkubasi mengalami kenaikan, kecuali isolat SDA26 (Gambar 8). Rata-rata bobot EPS yang berbeda-beda antarisolat ini diperkirakan dipengaruhi oleh tingkat virulensi masing-masing isolat. Senyawa EPS paling banyak dihasilkan oleh isolat CDA08 sedangkan paling sedikit isolat SDA22.

PEMBAHASAN

Busuk hitam pada daun kubis di daerah Cianjur, Jawa Barat yang disebabkan oleh bakteri *X. campestris* pv. *campestris* merupakan masalah endemik dan menjadi kendala utama pada budi daya kubis. Petani kubis di di Kabupaten Cianjur biasa mengendalikan penyakit menggunakan fungisida berbahan aktif campuran azoksistrobin dan difenokonazol. Bahan aktif azoksistrobin dan difenokonazol merupakan fungisida sistemik yang bersifat proteksi, kuratif, dan preventif serta sebagai zat pengatur tumbuh untuk tanaman kubis. Patogen lain yang dapat dikendalikan dengan bahan aktif ini ialah *Plasmodiophora brassicae*, penyebab akar gada (Ditjen PSP 2016). Bartlet *et al.* (2001) melaporkan bahwa azoksistrobin termasuk fungisida sistemik yang memiliki spektrum luas untuk mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh cendawan *Ascomycota*, *Deuteromycota*,



Gambar 8 Bobot eksopolisakarida (EPS) beberapa isolat *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* asal tanaman kubis di Cianjur, Jawa Barat pada medium PSB selama 24 (□) dan 48 (■) jam inkubasi.

Basidiomycota, dan *Oomycota*. Sedangkan difenokonazol merupakan senyawa yang sering digunakan sebagai fungisida untuk mengendalikan penyakit pada tanaman sayur-sayuran seperti busuk akar, embun tepung, dan kudis (EPA 2021). Hasil penelitian menunjukkan bahwa campuran senyawa kimia azoksistrobin dan difenokonazol tidak hanya dapat mengendalikan patogen dari kelompok cendawan, tetapi juga berpengaruh terhadap bakteri *X. campestris* pv. *campestris* di Kabupaten Cianjur.

Hasil identifikasi secara molekuler terhadap isolat-isolat bakteri patogen dari pertanaman kubis yang menunjukkan bercak hawar daun khas *X. campestris* pv. *campestris* di 3 lokasi pertanaman sayuran di Kabupaten Cianjur telah mengonfirmasi keberadaannya di lapangan. Hal ini menunjukkan bahwa *X. campestris* pv. *campestris* telah endemik. Bakteri ini memiliki pertumbuhan yang optimal pada suhu 25–27 °C pada medium NA dan YDCA dengan koloni berwarna kuning dan mengkilap, serta bersifat Gram negatif (Naqvi *et al.* 2013). Bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang tipis sehingga ketika dilarutkan dengan larutan KOH 3% akan lisis terbentuk lendir (Wanger *et al.* 2017). Gejala nekrosis pada daun tembakau merupakan usaha tanaman untuk menghambat pertumbuhan mikrob yang bersifat patogen (Zhue *et al.* 2000).

Hasil analisis secara molekuler menggunakan primer spesifik didapatkan sebanyak lima isolat yang mampu teramplifikasi pada ukuran 619 pb. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Berg *et al.* (2006) yang melakukan uji konfirmasi terhadap gen *hrpF* dari *X. campestris* pv. *campestris*. Bakteri hasil identifikasi secara molekuler kemudian diamati karakter morfologinya berwarna kuning terang, mengkilap, elevasi cembung, dan tepian licin. Sedangkan hasil analisis menggunakan primer universal terkonfirmasi 5 isolat sebagai bakteri *X. campestris* pv. *campestris*.

Berdasarkan FRAC (2018), azoksistrobin bekerja dengan cara menghambat respirasi di mitokondria yang mengganggu sitrokrom pada kompleks bc1. Hasil penelitian ini melaporkan azoksistrobin dapat menghambat proses respirasi bakteri yang ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ isolat SDA22 yang tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Wang *et al.* (2018) melaporkan bahwa azoksistrobin yang diaplikasikan di tanah dapat menghambat populasi bakteri, aktinomiset, aktivitas dehidrogenase, dan proses respirasi mikroba pada tanah. Peningkatan penggunaan dosis azoksistrobin dapat menghambat pertumbuhan bakteri organotrofik, aktinomiset, dan cendawan (Bacmaga *et al.* 2015).

Ozturk dan Aslin (2010) menyatakan bahwa EPS diproduksi oleh bakteri untuk melindungi sel bakteri dari cekaman biotik dan abiotik. Bobot EPS paling tinggi dihasilkan oleh bakteri *X. campestris* pv. *campestris* isolat CDA08 dan paling rendah isolat SDA22. Berdasarkan identitas pengambilan sampel, isolat CDA08 dan SDA22 berada pada lokasi yang berbeda. Isolat CDA08 dilakukan penyemprotan bahan aktif campuran azoksistrobin dan difenokonazol sebanyak 2.5 kali setiap bulan, sedangkan isolat SDA22 sebanyak 3 kali. Intensitas penyemprotan bahan aktif dapat memengaruhi produksi EPS dari bakteri *X. campestris* pv. *campestris*. Bobot EPS berbanding terbalik dengan nilai IC₅₀. Isolat SDA22 memiliki nilai IC₅₀ tinggi, tetapi menghasilkan senyawa EPS yang rendah. Hal ini diduga karena *X. campestris* pv. *campestris* sudah lama beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang mengandung bahan aktif lebih tinggi sehingga *X. campestris* pv. *campestris* tidak memerlukan perlindungan berupa eksopolisakarida untuk mengatasi kondisi lingkungan yang mencekam.

Hasil pengujian dengan campuran azoksistrobin dan difenokonazol terhadap lima isolat *X. campestris* pv. *campestris* memiliki pola keanekaragaman fenotipik yang ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ yang berbeda-beda. Hal ini ditunjukkan juga pada teknik RFLP *in silico* berdasarkan gen 16S rRNA. Lima isolat *X. campestris* pv. *campestris* tersebut memiliki tingkat resistensi terhadap campuran dua bahan aktif tersebut, yang ditunjukkan pada nilai IC₅₀. Isolat yang memiliki nilai IC₅₀ tinggi ialah isolat SDA22, sedangkan nilai IC₅₀ rendah ialah isolat CDA08. Penggunaan campuran bahan aktif azoksistrobin dan difenokonazol dalam budi daya tanaman kubis berpengaruh terhadap keragaman fenotipe dan genotipe *X. campestris* pv. *campestris*. Oleh karena itu, pembatasan penggunaan pestisida kimia dan alternatif metode pengendalian yang lain perlu dibatasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bacmaga M, Kucharski J, Wyszowska J. 2015. Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with azoxystrobin. *Environmental Monitoring and Assessment*. 187:615–630. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4827-5>.
- Bartlett DW, Clough JM, Godfrey CRA, Godwin JR, Hall AA, Heaney SP, Maund SJ. 2001. Understanding the strobilurin fungicides. *Pesticide Outlook*. 12(4):143–148. DOI: <https://doi.org/10.1039/b106300f>.
- Berg T, Tesoriero L, Hailstones DL. 2006. A multiple realtime PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Letters in Applied Microbiology*. 42(6):624–630. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01887.x>.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2018. Struktur Ongkos Usaha Tanaman Kubis Per Hektar Per Musim Tanam di Indonesia. <https://www.bps.go.id> [diakses 03 Nov 2022].
- [BPS Jawa Barat] Badan Pusat Statistik Provinsi Jawa Barat. 2021. Provinsi Jawa Barat dalam angka 2021. <https://jabar.bps.go.id> [diakses 03 Nov 2022].
- [BPTP] Balai Pengkajian Teknologi Pertanian. 2019. Teknologi Budidaya Kubis (*Brassica oleracea* L.) Dataran Rendah. <http://repository.pertanian.go.id> [diakses 28 September 2022].
- [DITJEN PSP] Direktorat Jenderal Prasarana dan Sarana Pertanian. 2016. *Pestisida Pertanian dan Kehutanan*. <https://psp.pertanian.go.id> [diakses 20 September 2022].
- Darajat YM. 2014. Perbandingan pola penggunaan pestisida pada petani sayuran dan petani tanaman hias di Kecamatan Cipanas, Kabupaten Cianjur [skripsi]. Bogor (ID): IPB University.
- [EPA] Environmental Protection Agency. 2021. *Center for Food Safety*. Washington

- DC: Office of Pesticide Programs.
- [FRAC] Fungicide Resistance Action Committee. 2018. FRAC Code List©*2018: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Codenum bering. <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/fr> [diakses 15 Sept 2022].
- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaun JS, Wilson BA, Olsen GJ. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 74(8):2461–2470. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>.
- Gusfi V. 2002. Persepsi petani sayuran di Cipanas terhadap insektisida sintesis dan botani [skripsi]. Bogor (ID): IPB University.
- Naqvi SF, Ul-Haq MI, Khan MA, Tahir MI, Ali Z, Rehman HM. 2013. Morphological and biochemical characterization of *Xanthomonas campestris* (pammel) Dawson pv. *sesami* and its management by bacterial antagonists. *Pakistan Journal of Agricultural Research*. 50(2):229–235.
- Nugroho A. 2012. Eksplorasi bakteriofage virulen terhadap *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* asal Kopeng untuk mengendalikan busuk hitam kubis [skripsi]. Surakarta (ID): Universitas Sebelas Maret.
- Ozturk S, Aslim B. 2010. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. *Environmental Science and Pollution Research*. 17:595–602. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0233-2>.
- Panjaitan D, Suada I, Sritamin M. 2014. Uji keefektifan ekstrak beberapa biji tanaman untuk menghambat pertumbuhan bakteri bercak daun (*Xanthomonas campestris*) pada tanaman tomat. *Agroekoteknologi Tropika*. 3(2):89–96.
- Parida I, Damayanti TA, Giyanto. 2016. Isolasi, seleksi, dan identifikasi bakteri endofit sebagai agens penginduksi ketahanan tanaman padi terhadap penyakit hawar daun bakteri. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 12(6):199–208. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.12.6.199>.
- Putrie RFA, Wahyudi AT, Nawangsih AA, Husen E. 2013. Screening of rhizobacteria for plant growth promotion and their tolerance to drought stress. *Microbiology Indonesia*. 25;7(3):94–104. DOI: <https://doi.org/10.5454/mi.7.3.2>.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Ed ke-3. St. Paul (MN): American Phytopathological Society.
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vicenta JG, Holub EB. 2013. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology*. 14(1):2–18. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x>.
- Wang F, Li X, Zhu L, Du Z, Zhang C, Wang J, Lv D. 2018. Responses of soil microorganisms and enzymatic activities to azoxystrobin in Cambisol. *Journal Environmental Study*. 27(6):2775–2783. DOI: <https://doi.org/10.15244/pjoes/81086>.
- Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. 2017. *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*. Texas (US): Elsevier.
- Zhue Y, Damicone JP, Demezas DH, Bender CL. 2000. Bacterial leaf spot diseases of leafy crucifers in Oklahoma caused by pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Plant Disease*. 84:1008–1014. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.1008>.