

Deteksi Bakteri *Pseudomonas cichorii* Terbawa Benih Sawi Putih Asal Korea Selatan dengan Metode PCR

Detection of *Pseudomonas cichorii* Bacteria Carried by *Chinese Cabbage* Seeds From South Korea Using PCR Method

Nabila Zahra Khairunnisa¹, Safira Rizka Lestari^{1,2*}

¹ Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, UPN “Veteran” Jawa Timur

² Laboratorium Karantina Pertanian Jawa Timur

*email korespondensi: safira.rizka.agro@upnjatim.ac.id

Info Artikel

Diajukan: 21 Mei 2024
 Diterima: 26 Mei 2024
 Diterbitkan: 31 Mei 2024

Abstract

Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* L.) stands as a vital horticultural commodity within the agricultural industry of Indonesia, boasting a significant production rate. The demand for chinese cabbage seeds in Indonesia continues to rise in tandem with the growth of this industry, often met through importation activities. However, seed imports carry the risk of serving as vectors for pathogens, particularly bacteria falling under the category of Quarantine Plant Pests (QPP), such as groups A1 and A2. Hence, early detection of potential pathogens carried by imported seeds is crucial to prevent their spread within Indonesian territory. This study aims to identify bacteria carried by white cabbage seeds imported from South Korea using the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method. The detection focus lies on target bacteria, notably *Pseudomonas cichorii*, which poses a potential threat to chinese cabbage plants. The observational results of this research indicate the absence of the target bacteria *Pseudomonas cichorii* in the samples of white cabbage seeds originating from South Korea.

Keyword:

Bacteria; Pseudomonas cichorii, chinese cabbage seeds; PCR (Polymerase Chain Reaction)

Abstrak

Sawi putih (*Brassica pekinensis* L.) merupakan salah satu komoditas hortikultura yang memiliki peran penting dalam industri pertanian Indonesia dengan tingkat produksi yang signifikan. Kebutuhan akan benih sawi putih di Indonesia terus meningkat seiring dengan pertumbuhan industri ini, dan hal ini seringkali terpenuhi melalui kegiatan impor. Namun, impor benih membawa risiko sebagai pembawa patogen, khususnya bakteri yang termasuk dalam golongan Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina (OPTK) seperti golongan A1 dan A2. Oleh karena itu, penting untuk melakukan deteksi dini terhadap patogen yang mungkin terbawa oleh benih impor guna mencegah penyebarannya di wilayah Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan identifikasi bakteri yang terbawa oleh benih sawi putih yang diimpor dari Korea Selatan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Fokus deteksi adalah pada bakteri target, terutama *Pseudomonas cichorii*, yang merupakan patogen yang berpotensi merugikan bagi tanaman sawi putih. Hasil

pengamatan dari penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya bakteri target *Pseudomonas cichorii* pada sampel benih sawi putih yang berasal dari Korea Selatan.

Kata Kunci:

bakteri; Pseudomonas cichorii; benih sawi putih; PCR (Polymerase Chain Reaction)

PENDAHULUAN

Sawi putih (*Brassica Pekinensis* L.) atau yang dikenal sebagai kubis cina, petsai, dan sawi jantung merupakan salah satu komoditas hortikultura yang disukai oleh masyarakat Indonesia dan berprospek untuk dikembangkan di Indonesia. Masa panen yang singkat dan pasar yang terbuka luas merupakan daya tarik untuk mengusahakan sawi putih. Hal ini dibuktikan dengan produksi sawi putih di Indonesia yang terus meningkat setiap tahun. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2023), produksi tanaman sawi putih di Indonesia pada tahun 2021-2022 cenderung mengalami peningkatan, yang mana produksi tanaman sawi putih tahun 2021 berjumlah 727.467 ton/tahun menjadi 760.608 ton/tahun pada tahun 2022 atau mengalami peningkatan sebesar 4,55%.

Peningkatan produksi yang cukup signifikan membuat kebutuhan akan benih sawi putih di wilayah Indonesia tergolong tinggi, sehingga kebutuhan benih sawi putih dipenuhi melalui upaya impor. Benih yang bermutu dianggap sebagai input paling penting untuk mendapatkan produksi yang optimal karena dapat memberikan keuntungan nilai ekonomi bagi petani. Oleh karena itu, penting untuk memastikan ketersediaan benih sehat dan murni untuk meminimalisir penyakit terbawa benih yang dapat menjadi penyebab kerugian besar, mengingat benih yang sehat memiliki arti bahwa biji yang digunakan sebagai benih harus bebas dari infeksi ataupun kontaminasi patogen.

Adanya impor benih sawi putih membuka peluang masuknya organisme pengganggu tumbuhan (OPT) yang merugikan. Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian (Permentan) No. 25 Tahun 2020, ditetapkan adanya Bakteri terbawa benih sawi putih yaitu *Pseudomonas cichorii* yang perlu diawasi dengan ketat di Indonesia karena termasuk salah satu organisme pengganggu tanaman karantina (OPTK) golongan A2 yang penyebarannya masih terbatas di Jawa, Sumatera, dan Kalimantan. Berdasarkan hal tersebut diperlukan teknik deteksi yang akurat dan cepat untuk mencegah penyebaran patogen terbawa benih sawi putih impor ke daerah yang masih bebas *Pseudomonas cichorii*.

Pseudomonas cichorii termasuk kingdom Bakteria, phylum Proteobacteria, kelas Gamma Proteobacteria, ordo Pseudomonadales, family Pseudomonadaceae, genus *Pseudomonas*, dan spesies *Pseudomonas cichorii*. Patogen ini diidentifikasi sebagai salah satu bakteri gram negatif berbentuk batang yang menghasilkan efektor, toksin, dan siklik lipopeptida untuk menginfeksi berbagai tanaman inang (Ramkumar *et al.*, 2015; Huong *et al.*, 2021). *Pseudomonas cichorii* berukuran 0,8 – 1,3 µm dan berflagella polar satu atau lebih. Bakteri ini pertama kali ditemukan sebagai penyebab penyakit penting pada tanaman krisan di Florida, Amerika Serikat pada tahun 1970, kemudian menyebar ke seluruh dunia dan menginfeksi berbagai jenis tanaman pertanian. Bakteri ini dilaporkan menyebabkan bercak daun pada berbagai jenis tanaman, seperti kedelai di Korea Selatan, okra (*Abelmoschus esculentus*) di Jepang, loofah (*Luffa cylindrical*) di China, dan Gerbera (*Garbera jamesonii*) di Brazil (Marques *et al.*, 2016)

Banyak cara yang dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri patogen tumbuhan, baik secara konvensional seperti pertumbuhan bakteri di media agar hingga cara modern seperti PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR merupakan metode molekuler untuk mendeteksi keberadaan material genetik dari suatu mikroorganisme dengan cara mensintesis dan menggandakan potongan DNA hingga berjuta kali lipat dalam waktu yang relatif singkat (Iliana *et al.*, 2020). Penggandaan tersebut tidak terlepas dari penggunaan enzim dan sepasang primer bersifat spesifik terhadap DNA target yang akan dilipatgandakan. PCR memiliki 4 komponen utama, yaitu DNA cetakan atau template DNA, oligonukleotida primer, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), dan DNA polimerase. Komponen pertama yaitu DNA cetakan atau template DNA memiliki fungsi sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Komponen kedua yaitu oligonukleotida primer adalah sekuen oligonukleotida pendek (15 - 25 basa nukleotida) yang mengawali sintesis rantai DNA. Komponen ketiga yaitu deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP sebagai bahan pensintesis molekul nukleotida. Komponen keempat yaitu DNA polimerase adalah enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA (Joko *et al.*, 2011).

Terdapat beberapa tahap proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yaitu denaturasi, *annealing* (penempelan primer), dan *extention* (pemanjangan primer) (Lorenz *et al.*, 2014). Denaturasi merupakan tahap awal sebelum enzim polimerase bekerja, terjadi pembukaan rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal. *Annealing* merupakan tahap penempelan primer pada rantai tunggal DNA, waktu *annealing* umumnya 30 - 45 detik. Ekstensi merupakan tahap enzim polimerase bekerja dalam perpanjangan sekuens DNA dari ujung 3', suhu yang digunakan pada ekstensi adalah 72°C (Amanda *et al.*, 2019).

Penelitian patogen terbawa benih menggunakan metode PCR sudah banyak dilakukan dan sudah banyak dikembangkan. Namun, untuk penelitian mengenai bakteri *Pseudomonas cichorii* terbawa benih sawi putih impor belum dilaporkan sehingga belum banyak informasi mengenai bakteri *Pseudomonas cichorii* di Indonesia. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengetahui dan mendeteksi bakteri *Pseudomonas cichorii* terbawa benih sawi putih impor asal Korea Selatan menggunakan metode PCR.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian mengenai Deteksi Bakteri *Pseudomonas cichorii* Terbawa Benih Sawi Putih Asal Korea Selatan dengan Metode PCR dilaksanakan pada tanggal 3 Januari 2024 hingga 9 Januari 2024. Proses PCR dilaksanakan di Laboratorium Karantina Tumbuhan Surabaya, Jl. Letjen Suprpto No. 68, Waru, Sidoarjo.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu nampan kecil, mortar, *tube* 1,5 ml, vortex, *filter column*, *collection tube* 2 ml, sentrifuge, *heating/cooling dry box*, mikropipet, mikrotip, *thermal cycler*, dan UV-*Transilluminator*. Sedangkan, bahan yang dibutuhkan adalah sampel media pembawa berupa benih sawi putih, aquades steril, kertas *blotter*, kertas buram, *wrapping*, nitrogen cair, *buffer* GP1, RNase A, *buffer* GP3, *buffer* W1, *wash buffer*, *preheat elution buffer*, primer, *nuclease free water*, *master mix*, *agarose gel*, *gel red*, *loading dye* dan *Tris-Acetat* EDTA (TAE) 1x.

Penyemaian Benih

Penyemaian benih dilakukan dengan menyemai benih pada kertas buram dan kertas blotter yang telah diberi aquades steril pada nampan. Setelah disemai, benih ditutup menggunakan plastik wrap untuk menjaga kelembaban benih dan benih tidak terkontaminasi, kemudian tunggu 3-5 hari hingga benih tumbuh dan dapat dipanen.

Pemanenan Sampel

Pemanenan dilakukan dengan cara memotong kecil-kecil kecambah dari pangkal akar hingga setengah bagian batang.

Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel dilakukan dengan cara menggerus sampel jaringan tanaman menggunakan mortar dengan bantuan nitrogen cair. Proses ekstraksi mengikuti protokol yang disarankan dengan DNA *Extraction Kit* (Geneaid). Setelah jaringan tanaman halus, sampel dimasukkan ke tube lalu ditambahkan *mix buffer* (400 μ l GP1 dan 5 μ l RNase), kemudian divortex. Sampel diinkubasi dalam *heating/cooling dry box* pada suhu 60°C selama 10 menit (*invert* setiap 5 menit). Kemudian sampel ditambahkan 100 μ l *buffer* GP2 dan divortex, kemudian diinkubasi dalam lemari es selama 3 menit. Suspensi dipindahkan ke dalam *filter column* pada 2 ml *collection tube*, lalu disentrifugasi 3000 rpm selama 1 menit. Suspensi dipindahkan ke *tube* baru dan tambahkan 750 μ l *buffer* GP3, kemudian divortex. Suspensi dipindahkan ke ke dalam *GD column* pada 2 ml *collection tube* dan disentrifugasi 15.000xg selama 2 menit. Selanjutnya cairan dalam *collection tube* dibuang dan *GD column* dipindahkan ke *collection tube* 2 ml yang baru, kemudian tambahkan 400 μ l *buffer* W1 dan disentrifugasi 15.000xg selama 1 menit. Cairan dalam *collection tube* dibuang, kemudian *GD column* diletakkan kembali dalam *collection tube* sebelumnya. Sebanyak 600 μ l *wash buffer* ditambahkan ke dalam *GD column*, kemudian disentrifugasi 15.000 rpm selama 3 menit. Kemudian pindahkan *GD column* ke dalam *tube* 1,5 ml dan tambahkan 50 μ l *preheat elution buffer*. Diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit dan disentrifugasi 15.000xg selama 1 menit. Kemudian *tube* yang telah berisi DNA disimpan pada suhu -20°C.

Amplifikasi

Hasil ekstraksi diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer Psc-F: 5'-CTCTCGGAAGTCCTGCAACT-3' dan Psc-R: 5'-CGA TGT AGT TGT TCA GGT TAC G-3'. Reaksi PCR (total volume 51 μ l) menggunakan Kit MyTaq™ HS Red Mix (DNA template 3 μ l, primer forward dan reverse masing-masing sebanyak 1 μ l, HS red mix sebanyak 25 μ l, dan *nuclease free water* sebanyak 21 μ l). Tabung-tabung tersebut ditempatkan pada mesin PCR (*thermal cycler*) pada suhu 95°C selama 60 detik untuk denaturasi awal. Amplifikasi dengan PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan tahapan sebagai berikut: proses denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, proses penempelan (*annealing*) pada suhu 51°C selama 30 detik, dan proses pemanjangan (*extension*) pada suhu 72°C selama 30 detik. Kemudian dilanjutkan dengan *final extension* pada suhu 72°C selama 60 detik.

Elektroforesis

Proses elektroforesis diawali dengan menyiapkan larutan gel agarose 1,2%. Agarose tablet sebanyak 5 kapsul dimasukkan ke dalam botol kaca selanjutnya ditambah TAE 1x sebanyak 210

ml. Setelah itu dipanaskan dengan menggunakan *microwave* hingga larut sempurna. Larutan dituang ke dalam cetakan (*gel tray*). Setelah mengeras, gel diambil dan diletakkan ke dalam bak elektroforesis yang berisi *buffer* TAE 1x. Sebanyak 5 μ l DNA hasil PCR yang telah dicampurkan dengan *loading dye* sebanyak 2 μ l dan *gel red* sebanyak 2 μ l dimasukkan ke dalam masing-masing sumur gel elektroforesis secara berurutan sesuai dengan target yang diuji. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 70 volt selama 30 menit.

Visualisasi DNA

Hasil elektroforesis dilihat dengan UV-*Transilluminator* dan hasilnya difoto dengan kamera digital.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala yang Disebabkan *Pseudomonas cichorii*

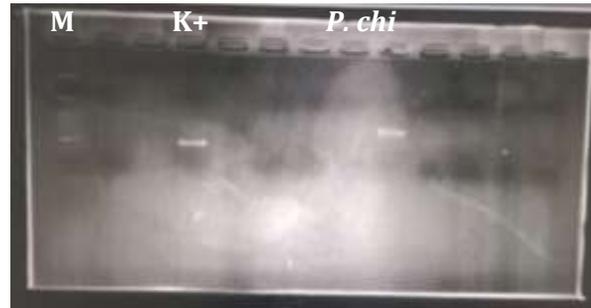
Pseudomonas cichorii yang menyerang tanaman sawi putih dapat menimbulkan bercak yang diikuti oleh pembusukan. Busuk lesi tersebut berubah menjadi hitam dan dikelilingi warna kuning yang menyatu dan berkembang menjadi hawar daun yang meluas dan dapat mempengaruhi seluruh daun, sehingga mengakibatkan kematian tanaman (Arshad *et al.*, 2021). Hal tersebut disebabkan oleh *Pseudomonas cichorii* menginvasi ruang interselular melalui stomata, mengkondensasi heterokromatin dan fragmentasi DNA dalam sel tanaman yang diinvestasi, sehingga jaringan yang terinfeksi menunjukkan gejala hawar (Hikichi *et al.*, 2013). *Pseudomonas cichorii* tumbuh di daerah yang hangat, basah, dan lembab. Patogen ini menyebar dari satu tanaman ke tanaman lain atau dari satu lokasi ke lokasi lain terbawa air, hujan, angin, dan menginfeksi permukaan daun yang basah.

Hasil Visualisasi DNA

Hasil pengujian menggunakan metode PCR ditentukan berdasarkan panjang produk DNA yang dihasilkan dari proses PCR. Panjang produk PCR ditentukan dengan mensejajarkan pita DNA target dengan marker yang memiliki skala penanda panjang DNA. Hasil positif ditentukan dari posisi pita DNA yang sesuai dengan panjang produk yang diharapkan (Suharti *et al.*, 2017).

Hasil deteksi bakteri *Pseudomonas cichorii* menunjukkan hasil negatif (-) yang artinya bahwa benih sawi putih tersebut tidak ditemukan *Pseudomonas cichorii* atau bebas dari bakteri OPTK target *Pseudomonas cichorii*. Hal tersebut dikarenakan dikarenakan tidak terbentuknya pita DNA (Gambar 1). Namun, jika visualisasi DNA positif *Pseudomonas cichorii* akan menunjukkan adanya pita dengan ukuran 237 bp.

Adanya perbedaan intensitas pita DNA yang dihasilkan dalam bentuk *band basepair* (bp), menghasilkan pita yang terang dan tegas dan sebagian besar tidak terbentuk pita. Menurut Sitepu *et al.* (2019), perbedaan intensitas pita DNA dipengaruhi oleh sebaran penempelan primer pada genome, konsentrasi genome, dan konsentrasi genome dalam reaksi. Konsentrasi DNA dan primer juga berpengaruh terhadap produk pita DNA yang dihasilkan (Suharti *et al.*, 2017). Konsentrasi DNA yang terlalu tinggi kemungkinan masih mengandung kontaminan seperti fenol dan metabolit sekunder lainnya, sehingga dapat mengganggu proses penempelan primer pada DNA dan proses amplifikasi selanjutnya. Proses *annealing* atau penempelan primer pada DNA yang komplementer menjadi tidak sempurna sehingga tidak terbentuk penggandaan pita DNA.



Gambar 1. Visualisasi hasil uji *Pseudomonas cichorii* pada Benih Sawi Putih Impor Asal Korea Selatan

KESIMPULAN

Hasil deteksi bakteri *Pseudomonas cichorii* terbawa benih sawi putih asal Korea Selatan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menunjukkan hasil negatif (-) yang ditunjukkan dengan tidak terbentuknya pita DNA pada sumur gel target *Pseudomonas cochorii*. Saran yang dapat dilakukan untuk penelitian selanjutnya adalah menggunakan beberapa sampel benih sawi putih impor untuk mendeteksi *Pseudomonas cichorii* sehingga didapatkan hasil yang lebih beragam dan bervariasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dari awal proses hingga akhir.

DAFTAR PUSTAKA

- Amanda, K., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2019). Optimasi Suhu Annealing Proses PCR Amplifikasi Gen *shv* Bakteri *Escherichia coli* Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 1–6.
- Arshad, S., Nematollahi, S., Rouhrazi, K., & Khezzinejad, N. (2021). Characterization of *Pseudomonas cichorii* Isolated From Tomato and Lettuce In Iran. *Journal of Plant Pathology*, 103(3), 853–861. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00863-9>
- Hikichi, Y., Wali, U. M., Ohnishi, K., & Kiba, A. (2013). Mechanism of Disease Development Caused By A Multihost Plant Bacterium, *Pseudomonas cichorii*, and Its Virulence Diversity. *Journal of General Plant Pathology*, 79(6), 379–389. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0461-7>
- Huong, D. D. T., Rajalingam, N., & Lee, Y. H. (2021). Characterization of Virulence Function of *Pseudomonas cichorii* Avirulence Protein E1 (AvrE1) During Host Plant Infection. *Plant Pathology Journal*, 37(5), 494–501. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.07.2021.0108>
- Iliana, I., Rahmawati, R., Rachmat, A., Mukarlina, M., & Zakaria, L. (2020). DETEKSI *Liberibacter* spp. PADA JERUK SIAM BERGEJALA KLOOROSIS DISERTAI BERCAK HITAM DENGAN Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Protobiont*, 9(1), 102–108. <https://doi.org/10.26418/protobiont.v9i1.42703>
- Joko, T., Kusumandari, N., & Hartono, S. (2011). Optimasi Metode PCR untuk Deteksi *Pectobacterium carotovorum*, Penyebab Penyakit Busuk Lunak Anggrek. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 17(2), 54–59. <https://doi.org/10.22146/jpti.9813>
- Lorenz, S. C., Fischer, M., & Kase, J. A. (2014). Improved PCR-RFLP Method For The Identification

- of *Escherichia coli* Enterohemolysin (ehxa) Subtypes. *Journal of Microbiological Methods*, 100(1), 24–26. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.02.010>
- Marques, E., Borges, R. C. F., & Uesugi, C. H. (2016). Identification and Pathogenicity of *Pseudomonas cichorii* Associated With a Bacterial Blight of Gerbera Tn The Federal District. *Horticultura Brasileira*, 34, 244–248. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620160000200015>
- Ramkumar, G., Lee, S. W., Weon, H. Y., Kim, B. Y., & Lee, Y. H. (2015). First report on the whole genome sequence of *Pseudomonas cichorii* strain JBC1 and comparison with other *Pseudomonas* species. *Plant Pathology*, 64(1), 63–70. <https://doi.org/10.1111/ppa.12259>
- Sitepu, A. F., Bayu, E. S., & Siregar, L. (2019). Analisis Pola Pita Beberapa Genotipe Kurma (*Phoenix dactylifera* L.) Menggunakan Primer RAPD Analysis of PCR Amplification of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Genotypes Based on RAPD Primers. *Jurnal Online Agroekoteknologi*, 7(3), 502–507. <https://doi.org/10.32734/jaet>
- Suharti, T., Joko, T., Arwiyanto, T., & Cunn, A. (2017). Deteksi Bakteri Patogen Terbawa Benih Akor (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. Ex. Benth.). *Jurnal HPT Tropika*, 17(1), 19–36.