

## **Penggunaan Bakteriofag untuk Kit Detektor Patogen Hawar Bakteri Kedelai**

### **The Use of a Bacteriophage for Detector Kit of Bacterial Blight Pathogen on Soybean**

**Nurul Rama Dhany, Hardian Susilo Addy\*, Wiwiek Sri Wahyuni**  
Universitas Jember, Jember 68121

#### **ABSTRAK**

Penyakit hawar bakteri disebabkan oleh *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* merupakan salah satu kendala dalam peningkatan produksi kedelai di Indonesia. Pemanfaatan bakteriofag air irigasi di sekitar pertanaman kedelai dapat dijadikan sebagai indikator keberadaan bakteri patogen tanaman secara tepat. Penelitian ini bertujuan mendapatkan komposisi bahan detektor yang cocok untuk mendeteksi *P. syringae* pv. *glycinea* dengan bakteriofag. Komposisi kit detektor dibuat dari campuran medium *nutrient broth*, *bromothymol blue* 0.1%, 10 g talk, dan 1 g CMC yang dioleskan pada kertas kit. Berdasarkan komposisi tersebut didapat warna hijau pada kertas kit detektor ( $\text{pH} \pm 7$ ). Cara kerja dari kertas kit detektor ditandai dengan perubahan warna pada kit detektor. Setelah kit dicelupkan dalam suspensi bakteri target, ditetesi suspensi bakteriofag, dan diinkubasi selama 24 jam sampai terjadi perubahan warna. Warna kuning menunjukkan adanya aktivitas pertumbuhan bakteri *P. syringae* pv. *glycinea* dan warna biru menunjukkan bakteriofag menghambat pertumbuhan *P. syringae* pv. *glycinea*.

Kata kunci: bakteri patogen, *bromothymol blue*, *plaque assay*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

#### **ABSTRACT**

Bacterial blight disease on soybean caused by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* is an important factor causing yield loss in Indonesia. Bacteriophage isolated from irrigation water around the soybean field can be used as indicator for the presence of phytopathogenic bacteria. The objectives of this research was to obtain suitable composition of detector materials to detect *P. syringae* pv. *glycinea* using bacteriophage. Composition of detector kit contains of nutrient broth medium with 0.1% of bromothymol blue, 10 g talk and 1 g CMC which will be rubbed on to the detector paper and caused green colour development ( $\text{pH} \pm 7$ ) when the paper was dipped on to bacteria suspension, added by a drop of bacteriophage suspension and incubated for 24 hour, the colour will be changed. Yellow color indicated growth activity of *P. syringae* pv. *glycinea* where as blue colour indicated suppression of *P. syringae* pv. *glycinea*.

Key words: bromothymol blue, pathogenic bacteria, *plaque assay*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

---

\*Alamat penulis korespondensi: Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember, Jalan Kalimantan 37 Kampus Tegalboto, Jember 68121  
Tel: 0331-336202, Surel: hsaddy.faperta@unej.ac.id

## PENDAHULUAN

Gejala serangan penyakit hawar bakteri yang disebabkan oleh *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* hampir sama dengan bercak cokelat yang disebabkan oleh *Septoria glycines* (Mantecón 2008), terutama pada fase awal perkembangan penyakit (Frederick *et al.* 2002). Salah satu upaya untuk membedakan gejala tersebut ialah melalui pemanfaatan bakteriofag untuk mendeteksi bakteri patogen tanaman (Singh *et al.* 2013). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteriofag telah dimanfaatkan untuk mendeteksi bakteri patogen seperti yang dilakukan oleh Schofield *et al.* (2013) dalam mendeteksi patogen hawar pada kubis yang disebabkan oleh *P. cannabina* pv. *alisalensis* dan patogen terbawa makanan seperti *Staphylococcus aerus* (Balasubramanian *et al.* 2007), *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*, dan *Vibrio fischerii* (Hagens dan Loessner 2007).

Bakteriofag merupakan virus yang menyerang atau memanfaatkan bakteri yang spesifik sebagai inang. Pemanfaatan bakteriofag untuk deteksi suatu penyakit bakteri sangatlah efektif karena kespesifikan inang dari bakteriofag (Singh *et al.* 2013). Pada siklus hidupnya, bakteriofag dapat mengakibatkan lisis pada bakteri inangnya yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri (Verma *et al.* 2009). Pertumbuhan koloni bakteri pada medium biakan dapat ditunjukkan dengan terjadinya perubahan tingkat kemasaman. *Bromothymol blue* (BTB) merupakan salah satu indikator pH yang dapat digunakan/ditambahkan dalam suatu medium pertumbuhan bakteri yang bersifat asam atau basa (Zaggout 2006).

*Carboxyl methyl cellulose* (CMC) dan talk sebagai komponen formulasi bahan untuk deteksi mikroorganisme telah banyak digunakan karena sifat fisika-kimia bahan tersebut yang mampu menjaga viabilitas mikroorganisme yang terkandung di dalamnya. Kombinasi CMC, talk, medium biakan, dan BTB dalam sebuah formulasi diharapkan menjadi bahan dasar kit detektor bakteri berdasarkan sifat pertumbuhannya.

Oleh karena itu, tujuan penelitian ini ialah mendapatkan komposisi bahan detektor yang cocok untuk mendeteksi *P. syringae* pv. *glycinea* dengan bakteriofag.

## BAHAN DAN METODE

### Bakteri dan Partikel Bakteriofag

*P. syringae* pv. *glycinea* PSGH3 (koleksi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember) secara rutin diperbanyak dan diremajakan pada medium *sodium broth* (NB) pada suhu 28 °C. Partikel bakteriofag fGH3 diperbanyak pada isolat *P. syringae* pv. *glycinea* PSGH3 dalam medium NB pada suhu 28 °C selama 24 jam. Kultur bakteri yang mengandung bakteriofag tersebut disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit, supernatan difiltrasi membran dengan kerapatan pori 0.45 µm dan disimpan pada suhu 4 °C untuk digunakan pada pengujian. Perhitungan partikel bakteriofag dilakukan berdasarkan metode *plaque assay* pada medium *nutrient agar* (NA) untuk mengetahui jumlah partikel bakteriofag (Askora *et al.* 2009).

### Plaque Assay

Metode *plaque assay* dilakukan dengan cara mencampurkan 200 µL suspensi *P. syringae* pv. *glycinea* yang berumur 24 jam dan 100 µL suspensi filtrat yang diduga mengandung bakteriofag dalam 300 µL medium NB cair dan diinkubasikan selama ± 2 jam pada suhu ruang. Sebanyak 400 µL suspensi bakteriofag, *P. syringae* pv. *glycinea*, dan medium cair NB selanjutnya dimasukkan ke dalam medium *top agar* (0.45% medium *nutrient broth* (NB)). Suspensi tersebut dihangatkan sampai suhu hangat kuku (± 50 °C) kemudian dituangkan pada medium NA dalam cawan petri dan diinkubasikan selama 24–48 jam pada suhu ruang (Askora *et al.* 2009). Proses pembentukan *plaque* (zona bening pada kultur bakteri) diamati untuk memastikan keberadaan isolat bakteriofag yang spesifik menginfeksi *P. syringae* pv. *glycinea*.

### Uji Kestabilan Warna Larutan *Bromothymol Blue*

Kestabilan zat warna BTB dalam larutan diukur dengan spektrofotometer (Hitachi U2900/2910) pada panjang gelombang 616 nm dengan interval pengukuran setiap jam hingga 5 jam pada suhu ruang. Konsentrasi BTB yang diukur ialah 0 (kontrol), 0.001, 0.008, 0.01, dan 0.1% dari larutan induk BTB 2% .

### Pemilihan Medium Uji

Pemilihan komposisi medium uji untuk keperluan simulasi perubahan warna dibuat dengan menggunakan medium NA sebagai medium dasar. Sebagai komponen tambahan glukosa 10% (w/v) dan BTB pada konsentrasi hasil seleksi uji kestabilan warna ditambahkan ke dalam medium dasar yang selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada 121 °C selama 20 menit. Medium biakan tersebut dituangkan ke cawan petri dan disimpan pada suhu 4 °C. Simulasi perubahan warna dilakukan dengan cara menumbuhkan satu koloni bakteri *P. syringae* pv. *glycinea* pada medium simulasi dan diamati perubahan warna medium pada 48 jam setelah inkubasi pada suhu 28 °C.

### Uji Deteksi dengan Kertas Detektor

Kertas kit detektor dibuat dengan cara mencampurkan Talc 10 g, CMC 10% dari Talc, larutan NB + BTB 0.1% yang sudah dipanaskan, KOH 3 %, dan diaduk sampai homogen. Selanjutnya kertas Whatman No. 42 dengan ukuran 3 cm × 7 cm dicelupkan ke adonan tersebut. Kertas kit detektor dikeringkan dengan oven pada suhu ± 50 °C.

Setelah kering kertas tersebut dibungkus dengan kertas aluminium, disterilkan menggunakan autoklaf, dan dikeringkan kembali, lalu disimpan di dalam oven pada suhu ± 50 °C.

Deteksi dilakukan dengan cara menyelupkan kertas kit detektor ke dalam suspensi bakteri target (kepadatan  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>), lalu dikeringkan dalam cawan petri steril. Selanjutnya kertas kit tersebut dicelupkan pada larutan bakteriofag fGH3 (1/3 bagian dari ujung kertas kit). Perubahan warna pada kit detektor diamati setelah kit diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28 °C, apabila warna kertas kit berubah menjadi kekuningan, maka hasil deteksi adalah negatif. Jika tidak terjadi perubahan warna pada area celupan larutan bakteriofag, maka hasil pengujian ialah positif.

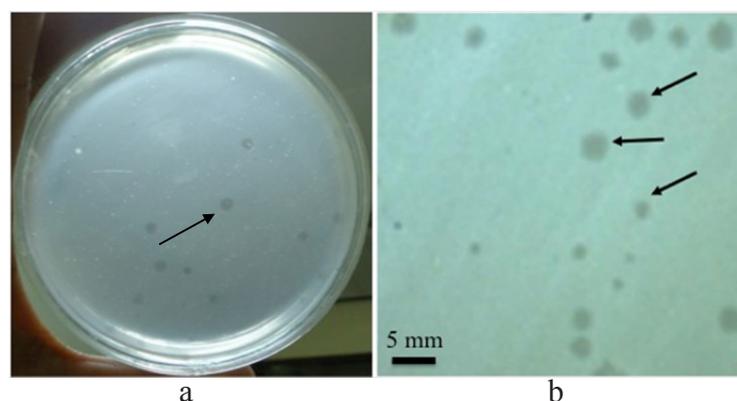
## HASIL

### Bakteriofag

Propagasi bakteriofag pada *P. syringae* PSGH3 menunjukkan bahwa bakteriofag ini bersifat infeksi karena mampu membentuk *plaque* pada medium biakan bakteri dengan diameter *plaque* yang bervariasi (Gambar 1).

### Kestabilan Warna Larutan BTB

Larutan BTB pada konsentrasi yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda dari segi nilai kepadatan optik pada panjang gelombang 616 nm ( $OD_{616}$ ) maupun tingkat kepadatan PD  $OD_{616}$ . Semakin tinggi konsentrasi BTB (0.001–0.1%), warna larutan



Gambar 1 *Plaque assay* ditandai dengan pembentukan zona bening. a, Pada medium *nutrient agar*; b, pada hamparan kultur bakteri 24 jam setelah inkubasi.

semakin biru dan pekat, namun jika konsentrasi ditingkatkan menjadi 1% maka larutan BTB berubah menjadi jingga (Gambar 2). Tingkat absorbansi larutan BTB menunjukkan nilai absorbansi larutan BTB pada konsentrasi 0.1% merupakan nilai absorbansi tertinggi dengan  $OD_{616} = 2.557-3.000$  (Tabel 1).

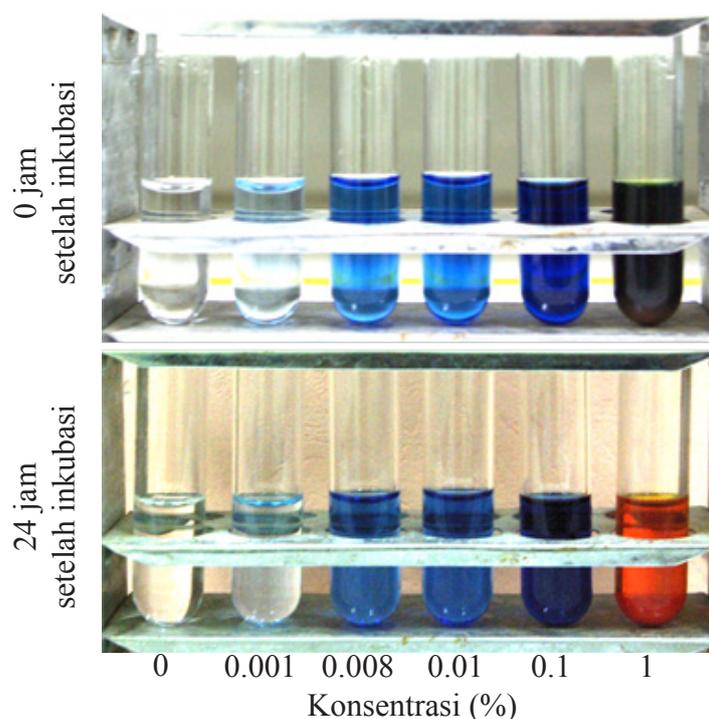
### Perubahan Warna Medium Uji

Berdasarkan hasil uji kestabilan warna, selanjutnya dibuat medium uji dengan penambahan BTB dari berbagai konsentrasi (Kontrol, 0.001, 0.008, 0.01, dan 0.1%). Hasilnya menunjukkan bahwa konsentrasi BTB dalam medium mempengaruhi kepekatan warna hijau pada medium dibandingkan dengan kontrol (Gambar 3). Perubahan warna

menunjukkan bahwa medium uji dengan penambahan BTB pada konsentrasi 0.1% mampu memberikan perubahan warna yang cukup jelas secara visual dibandingkan dengan medium uji lainnya, yaitu hijau menjadi jingga-kekuningan. Bahkan zona perubahan warna pada daerah inokulasi bakteri dapat terukur dengan jelas pada konsentrasi BTB 0.1%, yaitu berkisar 3.5–4.5 mm (Gambar 3).

### Sensitivitas Deteksi *P. syringae* pv. *syringae* Menggunakan Kit Deteksi

Simulasi deteksi pada medium uji dilakukan sebelum pengujian menggunakan kertas kit detektor. Simulasi pada cawan petri menunjukkan bahwa medium yang tidak diinokulasi bakteri target tetap berwarna hijau



Gambar 2 Perubahan warna larutan *bromothymol blue* dalam H<sub>2</sub>O pada berbagai konsentrasi.

Tabel 1 Nilai absorbansi warna larutan *bromothymol blue* yang diamati pada masa inkubasi tertentu

Konsentrasi (%)	Nilai absorbansi (jam setelah inkubasi)					
	0	1	2	3	4	5
0	0	0	0	0	0	0
0.001	0.245	0.117	0.181	0.196	0.184	0.180
0.008	1.317	1.242	1.308	1.222	1.295	1.297
0.010	1.611	1.542	1.611	1.601	1.604	1.594
0.100	2.896	2.775	2.929	2.557	3.000	2.891

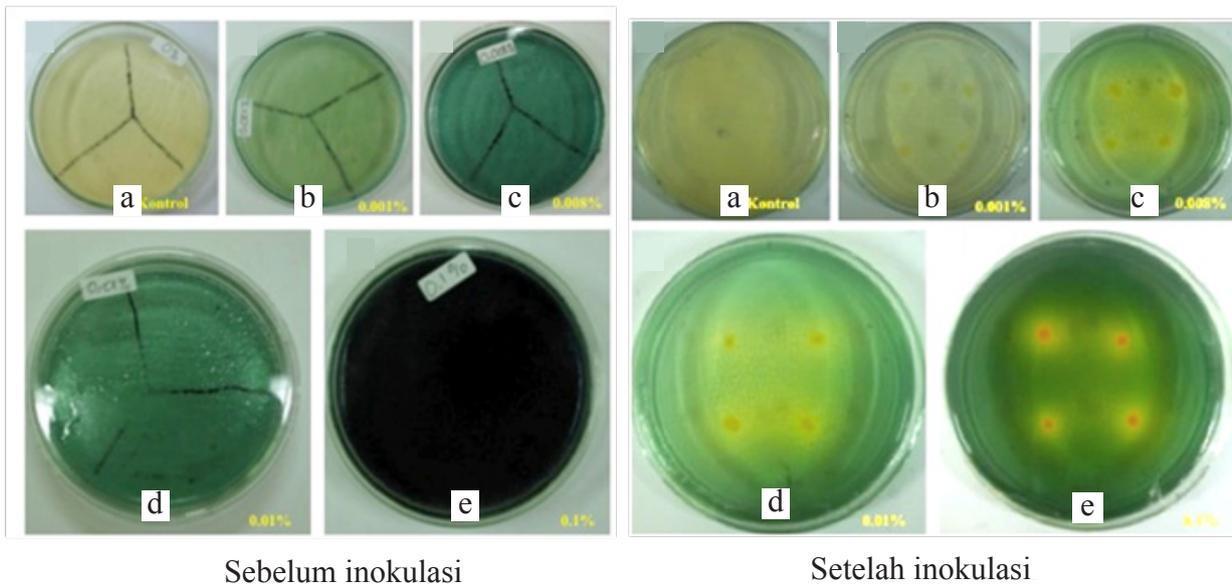
sedangkan medium yang diinokulasi bakteri berubah menjadi jingga-kekuningan. Namun hasil yang berbeda ketika medium yang diinokulasi dengan bakteri ditetesi suspensi bakteriofag. Perubahan warna hanya terjadi di luar area tetesan suspensi bakteriofag (tetap berwarna hijau, atau tidak terjadi perubahan warna) yang diikuti dengan adanya zona bening pada area tetesan suspensi bakteriofag (Gambar 4).

Pengujian pada kertas kit detektor juga menunjukkan hasil yang serupa dengan simulasi deteksi. Perubahan mencolok tampak pada kertas kit detektor yang telah dicelupkan pada suspensi bakteri dan diikuti dengan pencelupan pada suspensi bakteriofag, hanya pada area yang tidak mengandung suspensi

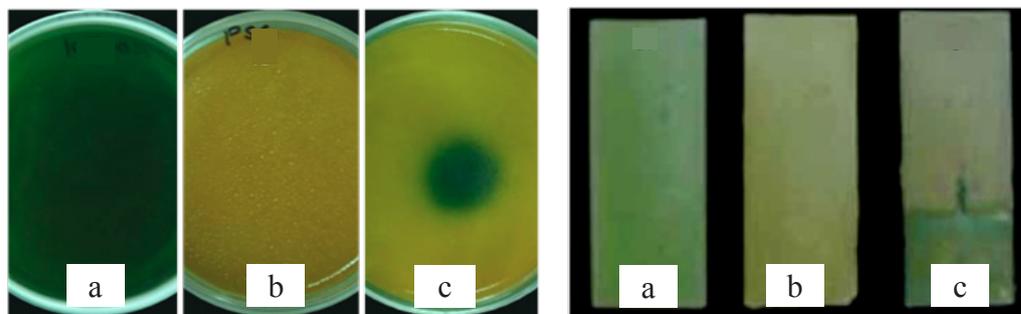
bakteriofag yang berubah menjadi kekuningan seperti halnya kertas kit detektor tanpa perlakuan pencelupan dalam suspensi bakteriofag (Gambar 4).

**PEMBAHASAN**

Infeksi bakteriofag pada bakteri inang umumnya ditandai dengan terbentuknya zona bening pada medium uji. Zona bening ini merupakan zona terhambatnya pertumbuhan koloni bakteri akibat banyaknya bakteri yang lisis. Menurut Verma *et al.* (2009) bakteriofag yang bereplikasi pada sel bakteri inang akan menghasilkan enzim pelisis (endolisin) yang menyebabkan bakteri mengalami lisis. Hal serupa juga dinyatakan



Gambar 3 Variasi warna dan perubahan medium uji yang ditambahi dengan *bromothymol blue* sebelum pengujian dan 48 jam setelah inokulasi dengan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. a, 0%; b, 0.001%; c, 0.008%; d, 0.01% dan; e, 0.1%.



Simulasi deteksi *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* pada cawan petri Deteksi *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* menggunakan Kertas kit detektor

Gambar 4 Hasil pengujian sensitivitas deteksi *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. a, kontrol positif; b, hasil deteksi negatif dan; c, hasil deteksi positif.

oleh Guenther *et al.* (2012) bahwa kematian sel bakteri *S. typhimurium* akibat infeksi bakteriofag FO1-E2 secara *in vitro* ditandai dengan terbentuknya zona bening pada medium uji.

Pada proses pembuatan medium uji, pengujian stabilitas warna larutan BTB menunjukkan kecenderungan bahwa semakin tinggi konsentrasi BTB maka semakin tinggi nilai absorbansi karena tingginya kerapatan partikel BTB dalam larutan. Namun, pada konsentrasi yang semakin tinggi hingga 10% menyebabkan warna larutan menjadi jingga yang menandakan bahwa kondisi larutan menjadi asam. Sabnis (2007) menjelaskan bahwa BTB merupakan bahan yang dapat digunakan sebagai indikator pH dengan kisaran pH 6.0 (ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi kuning) hingga pH 7.6 (ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi biru). Semakin rendah nilai pH larutan maka warna larutan akan semakin kuning hingga jingga. Hal ini juga konsisten dengan pengamatan warna medium uji yang ditambahkan BTB. Penambahan glukosa 10% pada medium uji diharapkan dapat mengatalisis reaksi antara indikator pertumbuhan koloni bakteri dengan perubahan pH pada medium yang dapat terdeteksi dengan mudah menggunakan indikator BTB. Hal ini umum dilakukan pada medium uji yang menggunakan indikator pH sebagai indikasi pertumbuhan koloni bakteri.

Pertumbuhan bakteri dapat dengan mudah diamati dengan cepat pada medium biakan yang mengandung BTB dan sumber karbon termasuk glukosa. Hal serupa juga diamati oleh Lwin *et al.* (2012) pada aktivitas pertumbuhan bakteri pengfiksasi nitrogen dan juga Masnilah *et al.* (2013) terhadap pertumbuhan bakteri *P. syringae*. Perubahan warna pada medium yang mengandung BTB dan glukosa dikarenakan terjadinya penggunaan glukosa yang menyebabkan dihasilkannya CO<sub>2</sub> yang selanjutnya terasorpsi ke dalam medium dalam bentuk asam karbonat yang menyebabkan kondisi medium menjadi masam dan berubahnya warna medium menjadi kuning.

Pembuatan kit detektor merupakan sebuah teknologi deteksi yang diharapkan dapat diaplikasikan dengan mudah dan tepat untuk mendeteksi isolat bakteri khususnya bakteri patogen tumbuhan. Prinsip deteksi yang digunakan pada detektor ini adalah melalui kespesifikan inang bakteri terhadap infeksi bakteriofag. Kematian bakteri ini akan dengan mudah terdeteksi pada medium yang mengandung indikator pH dan sumber karbon sebagaimana yang ditunjukkan pada hasil penelitian, yaitu warna medium uji ataupun kertas kit tidak berubah (tetap berwarna hijau kebiruan).

Komposisi kit yang sesuai untuk identifikasi *P. syringae* pv. *glycinea* ialah 1 g CMC, 10 g talk, 10 mL medium NB yang telah ditambahkan BTB 0.1% dari larutan induk BTB 2%, 150 µL KOH 3%. Campuran ini dikeringkan di dalam oven pada suhu 80 °C selama ± 20 jam. Kit detektor dapat digunakan apabila tersedia suspensi bakteriofag yang cocok terhadap bakteri patogen sehingga deteksi dapat dilakukan secara akurat pada bakteri target.

## DAFTAR PUSTAKA

- Askora A, Kawasaki T, Usami S, Fujie M, Yamada T. 2009. Host recognition and integration of filamentous phage φRSM in the phytopathogen, *Ralstonia solanacearum*. *Virology*. 384(1):69–76. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.007>.
- Balasubramanian S, Sorokulova IB, Vodyanoy VJ, Simonian AL. 2007. Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus*-A surface plasmon resonance spectroscopic study. *Biosensors Bioelectronics*. 22(6):948–955. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.04.003>.
- Frederick RD, Snyder CL, Peterson GL, Bonde MR. 2002. Polymerase chain reaction assay for detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. *Phytopathology*. 92(2):217–227. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.2.217>.

- Guenther S, Herzig O, Fieseler L, Klumpp J, Loessner MJ. 2012. Biocontrol of *Salmonella typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int. J Food Microbiol.* 154:66–72. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.023>.
- Hagens S, Loessner MJ. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76(3):513–519. DOI: [10.1007/s00253-007-1031-8](http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-1031-8).
- Lwin K, Myint M, Tar T, Aung W. 2012. Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid-IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. *Engineering J.* 16(5):137–144. DOI: <http://dx.doi.org/10.4186/ej.2012.16.5.137>.
- Mantecón JD. 2008. Efficacy of chemical and biological strategies for controlling the soybean brown spot (*Septoria glycines*). *Cien Inv Agr.* 35(2):211–214. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202008000200011>.
- Masnilah R, Abadi AL, Astono TH, Aini LQ. 2013. Karakterisasi bakteri penyebab penyakit hawar daun edamame di Jember. *Berkala Ilmiah Pertanian.* 1(1):10–14.
- Sabnis RW. 2007. *Handbook of Acid-Base Indicators.* San Francisco (US): CRC Pr. DOI: <http://dx.doi.org/10.1201/9780849382192>.
- Schofield DA, Bull CT, Rubio I, Wechter WP, Westwater C, Molineux IJ. 2013. “Light-tagged” bacteriophage as a diagnostic tool for the detection of phytopathogens. *Bioengineered.* 4(1):50–54. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/bioe.22159>.
- Singh A, Poshtiban S, Evoy S. 2013. Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. *Sensors.* 13(2):1763–1786. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/s130201763>.
- Verma V, Harjai K, Chhibber S. 2009. Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: a potential therapeutic agent. *Curr Microbiol.* 59(3):274–281. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-009-9430-y>.
- Zaggout FR. 2006. Encapsulation of bromothymol blue pH-indicator into a sol-gel matrix. *J Dispersion Sci Technol.* 27(2):175–178. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01932690500265854>.