

Bakteriofaj: Agen kawalan biologi berpotensi bagi penyakit layu bakteria darah pada pisang

(Bacteriophage: Potential biological control agent for blood disease of banana)

Nur Sulastri Jaffar dan Md Nurul Khalid Koyube

Pengenalan

Populasi manusia dijangka mencecah 9.6 bilion pada tahun 2050 dan ini akan menyebabkan peningkatan ke atas permintaan makanan. Menurut laporan Pertubuhan Bangsa-Bangsa Bersatu (PBB) pada tahun 2013, dianggarkan bahawa bekalan makanan global mungkin perlu ditingkatkan sebanyak 70% bagi memenuhi permintaan ini. Bagi mencapai kadar pertumbuhan seperti itu, dianggarkan bahawa bekalan tanaman perlu ditingkatkan sebanyak 80 – 110%. Oleh yang demikian, salah satu faktor perencat kepada kadar pertumbuhan ini khususnya kesan penyakit tanaman hendaklah dikurangkan. Sekurang-kurangnya 10% kehilangan hasil pertanian adalah diakibatkan oleh penyakit tanaman secara global di seluruh dunia. Patogen utama penyebab penyakit tanaman adalah virus, kulat, bakteria dan nematod. Dianggarkan terdapat lebih daripada 200 spesies bakteria yang patogenik terhadap tumbuhan dan antara kumpulan bakteria patogenik yang dianggap paling penting adalah daripada genera *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Xylella*, *Pectobacterium* dan *Dickeya*. Pengurusan penyakit bakteria ini menjadi cabaran utama dalam pertanian disebabkan oleh sifat kebolehubahan patogen, kebarangkalian tinggi untuk bermutasi atau pemindahan gen dalam patogen ketika berhadapan dengan gen ketahanan atau bakterisida, kadar multiplikasi patogen yang tinggi semasa keadaan optimum untuk perkembangan penyakit dan kekurangan kawalan berasaskan kimia yang efektif.

Kawalan konvensional sedia ada bagi penyakit bawaan bakteria ini lebih tertumpu kepada implementasi operasi dan kaedah dalam mengurangkan jangkitan dengan menghapuskan sumber-sumber bahan tanaman yang dijangkiti, penggunaan bahan racun kimia berasaskan kuprum, penggunaan racun serangga bagi mengawal vektor dan penggunaan antibiotik. Kaedah-kaedah ini khususnya penggunaan racun kimia berasaskan kuprum telah diguna pakai selama hampir 100 tahun dan kesan rintang terhadap bakteria patogenik ini sering dilaporkan termasuklah dalam kalangan spesies bakteria patogenik *Xanthomonas* dan *Pseudomonas*. Penggunaan racun kimia ini juga memberi kesan jangka panjang kepada tahap ketoksikan alam sekitar. Oleh yang demikian, pendekatan secara biologi dilihat sebagai kaedah alternatif yang lebih mesra alam.

Penyelidikan penggunaan bakteriofaj iaitu sejenis virus “pemakan” bakteria, dilihat semakin mendapat perhatian dalam bidang pertanian bagi pengurusan bersepadu penyakit bakteria

secara biologi pada tanaman. Perbandingan dengan penggunaan bahan racun kimia, bakteriofaj kelihatan lebih bersifat mesra alam dan kehadirannya yang hidup secara semula jadi dalam persekitaran membolehkan pendedahan manusia ke atasnya kurang membahayakan. Kecenderungan penggunaan bakteriofaj ini dilihat pada sifatnya yang tidak toksik, mampu mereplikasi secara sendiri, bersifat hos spesifik, berupaya mengatasi kerintangan dan mudah dihasilkan. Penyelidikan terdahulu telah membuktikan keberkesanan penggunaan bakteriofaj dalam pengawalan fitobakteria antaranya termasuklah *Xanthomonas* spp. (penyakit tompok bakteria pada tomato, hawar pada bawang dan kanker limau), *Pseudomonas* spp. (tompok bakteria pada cendawan), *Erwinia* spp. (penyakit reput lembut), *Ralstonia* (penyakit layu pada sayur-sayuran dan buah-buahan) dan *Streptomyces* (keruping pada kentang). Produk faj (produk hasilan daripada virus) telah dijual secara komersial di Amerika Syarikat dan dipasarkan bagi pengawalan penyakit bintik bakteria pada tanaman tomato dan cili. Dalam kajian ini, dua bakteriofaj telah dikenal pasti berpotensi terhadap bakteria *Ralstonia syzygii* iaitu bakteria yang menyebabkan penyakit layu pada pisang melalui bioasai secara in vitro.

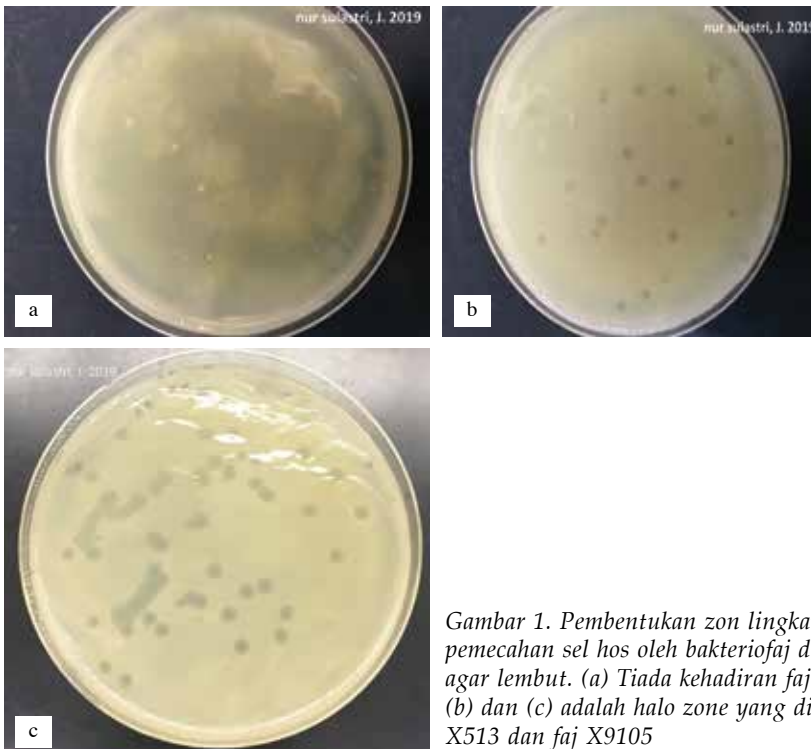
Epidemiologi penyakit layu bakteria darah pada pisang (*Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*)

Penyakit layu bakteria darah pada pisang mempunyai simptom yang sama dengan penyakit Moko. Simptomnya adalah layu yang bermula daripada pucuk apabila daun-daun muda akan menunjukkan simptom kekuningan dan pucat, bergulung, nekrotik dan mengering. Akhirnya, sulur akan menjadi layu dan mati. Buah pisang yang diserang pada peringkat awal tumbesaran akan terencat, masak awal dan reput. Walaupun buah yang dihasilkan kelihatan normal di bahagian luar, tetapi apabila dipotong isinya kelihatan membusuk, berwarna kuning kemerahan dan mereput. Tangkai buah pula berubah warna, bunga jantan iaitu jantung pisang menjadi busuk, berair dan rosak. Tisu vaskular akan kelihatan membusuk kehitaman dan apabila batang pokok dipotong secara merentas, terdapat jalur-jalur merah keperangan dikesan pada tisu vaskular. Sekiranya direndam di dalam air, batang pokok pisang yang dijangkiti akan mengeluarkan cecair putih atau ooze yang kelihatan seperti susu. Pokok yang diserang akhirnya akan layu dan mati. Sebaran boleh berlaku melalui tanah, air dan peralatan pertanian. Serangga yang menghinggapi bunga/jantung pisang juga mampu menyebarkan patogen ini pada jarak jauh seperti *Trigona minangkabau* dan *Erionota thrax*. Kandungan gula yang tinggi pada nektar varieti pisang yang rentan pada penyakit ini seperti pisang Abu atau Nipah menjadi daya penarik kepada kumpulan serangga seperti lebah, kelulut dan lalat untuk menghinggapi dan menyebarkan patogen ini. Hos patogen penyakit layu bakteria darah tidak seluas seperti patogen penyebab penyakit Moko dan Bugtok. Antaranya termasuklah

Heliconia sp. dan *Strelitzia reginae*, *Canna indica*, *Datura stramonium*, *Asclepias currassiva* dan *Solanum nigrum*. Walau bagaimanapun, ia tidak patogenik kepada *Solanum melongena*, *S. lycopersicum*, *Arachis hypogaea*, *Capsicum* sp., *Nicotiana tabacum*, *S. tuberosum* dan *Zingiber officinale*.

Pemencilan dan pengecaman faj berpotensi terhadap *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*

Secara amnya, bakteriofaj wujud secara semula jadi di persekitaran. Walau bagaimanapun, kewujudannya sangat bergantung kepada kewujudan perumah atau hosnya iaitu bakteria kerana bakteriofaj bersifat memerlukan hos untuk membolehkannya hidup dan membiak. Dalam kajian ini, pemencilan bakteriofaj dilakukan menggunakan sampel buah dan batang pisang yang diambil dari ladang yang telah dijangkiti penyakit layu bakteria darah pisang. Sampel yang diperolehi dari Selangor dan Johor ini kemudiannya diproses menggunakan protokol dan kaedah tertentu bagi memencilkan bakteriofaj. Melalui penggunaan kaedah "double-layer plaque assay", iaitu kaedah pemencilan bakteriofaj di atas permukaan agar lembut dengan kehadiran hosnya iaitu bakteria *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*, dua isolat faj dikenal pasti berkeupayaan memecahkan sel hosnya pada permukaan agar lembut. Pemerhatian ini dapat dilihat dengan pembentukan zon lingkaran cerah berbentuk bulat atau *halo zone* (Gambar 1). Inkubasi piring petri yang mengandungi agar lembut ini akan dilakukan bagi tempoh 24 – 36 jam bagi



Gambar 1. Pembentukan zon lingkaran cerah hasil pemecahan sel hos oleh bakteriofaj di atas permukaan agar lembut. (a) Tiada kehadiran faj (piring kawalan), (b) dan (c) adalah halo zone yang dihasilkan oleh faj X513 dan faj X9105

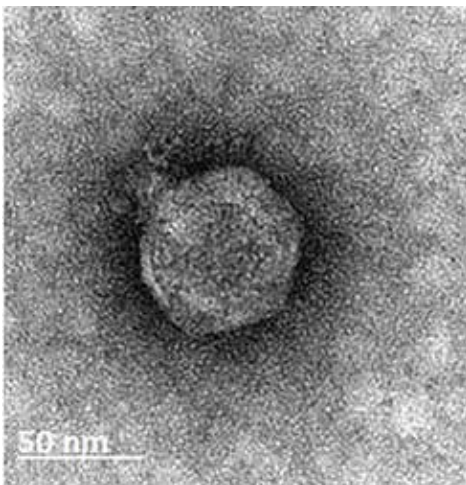
membolehkan pembiakan bakteriofaj berlaku. Dalam keadaan tertentu, bakteriofaj ini mampu memecahkan kesemua sel hosnya dengan pembentukan zon lingkaran cerah pada keseluruhan permukaan agar lembut di atas piring petri. Dua jenis bentuk *halo zone* berbeza yang diperhatikan menunjukkan kehadiran dua isolat faj yang berbeza.

Morfologi bakteriofaj X9105 dan X513 di bawah mikroskop elektron transmisi (TEM)

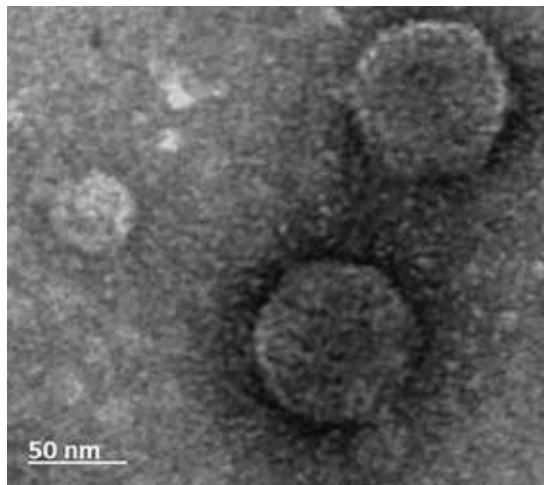
Bakteriofaj tidak boleh dilihat dengan mata kasar dan pengelasan familinya perlu dilakukan melalui pemerhatian morfologi di bawah mikroskop elektron transmisi (TEM). Visualisasi bakteriofaj dilakukan pada saiz pembesaran 100,000 kali ganda. Pemerhatian ini amat penting dalam membantu mengelaskan isolat faj yang diperolehi. Isolat faj X9105 dan X513 yang telah dituliskan memperlihatkan struktur morfologi yang tiada perbezaan antara kedua-duanya. Kedua-dua faj mempunyai struktur kepala ikosahedron dan mempunyai ekor yang pendek dan tidak mengecut (*Gambar 3 dan Gambar 4*). Diameter saiz kepala ialah 52 nm bagi isolat faj X9105 dan 56 nm bagi isolat faj X513. Ciri-ciri morfologi melalui imej mikroskop ini mengelaskan kedua-dua isolat faj ini kepada famili Podoviridae. *Jadual 1* adalah ringkasan bagi ciri-ciri faj X9105 dan faj X513.

Penilaian kesesuaian hos

Bakteriofaj ialah virus yang menyerang dan membiak di dalam sel hos atau perumahnya iaitu bakteria. Sifatnya yang spesifik membolehkan aplikasinya tersasar secara langsung kepada bakteria atau patogen yang hendak dikawal. Ia akan bertindak dengan menyuntik dan memindahkan molekul yang mengandungi maklumat genetiknya ke dalam sel bakteria (hos) dan kemudian memecah dan membunuh sel hos tersebut. Bagi menjamin



Gambar 3. Morfologi faj X513 menggunakan TEM, daripada famili Podoviridae



Gambar 4. Morfologi faj X9105 menggunakan TEM, daripada famili Podoviridae

kelestarian aplikasi faj di dalam pertanian, pembangunan faj koktail yang bersifat multi-hos atau multi-strain lebih disarankan kerana ia boleh membantu mengatasi isu serintangan faj ke atas patogen yang disasar.

Penilaian kesesuaian hos bagi faj X9105 dan X513 dilaksanakan ke atas hos selain *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* iaitu termasuklah *Erwinia mallotivora* (penyakit mati rosot pada betik), *Pectobacterium carotovorum* (penyakit reput lembut pada nangka, kentang), *Dickeya chrysanthemi* (penyakit reput teras pada nanas) dan *Ralstonia solanacearum* (penyakit layu pada tomato). Berdasarkan kepada penilaian tersebut, kedua-dua faj ini tidak menunjukkan tindak balas positif kepada semua bakteria yang diuji selain daripada hosnya kerana tiada pembentukan zon lingkaran cerah pada permukaan agar lembut. Dapatan ujian penilaian kesesuaian hos yang dijalankan adalah seperti dalam *Jadual 2*.

Ujian kestabilan suhu dan pH

Suhu adalah faktor penting untuk kelangsungan hidup faj kerana faktor ini memainkan peranan dalam pelekatan, penembusan dan multiplikasi faj. Oleh itu, penentuan julat suhu yang optimum dan stabil adalah penting kerana faj perlu toleran kepada adaptasi suhu yang tinggi dalam aplikasi faj secara in vivo. Dalam kajian ini, faj X9105 dan X513 menunjukkan infektiviti pada julat suhu 26 – 30 °C dengan suhu optimum infektiviti pada 30 °C (*Rajah 1*). Kesan infektiviti kedua-dua faj ini mula menurun apabila suhu melebihi 30 °C. Pemerhatian ini bertepatan dengan kajian terdahulu yang mencadangkan bahawa pendedahan faj yang berpanjangan pada suhu tinggi dapat mengurangkan keupayaan infektivitinya kepada sel hos. Ini juga mungkin disebabkan oleh keupayaan sel hosnya yang tidak berupaya bereplikasi pada suhu yang tinggi.

Penentuan julat pH yang optimum juga penting untuk penggunaan faj secara in vivo, supaya faj dapat mengekalkan kecekapannya di persekitaran. Keasidan dan kealkalian persekitaran boleh mempengaruhi kestabilan,

Jadual 1. Penerangan morfologi zon lingkaran cerah faj dan visualisasi TEM faj X9105 dan X513

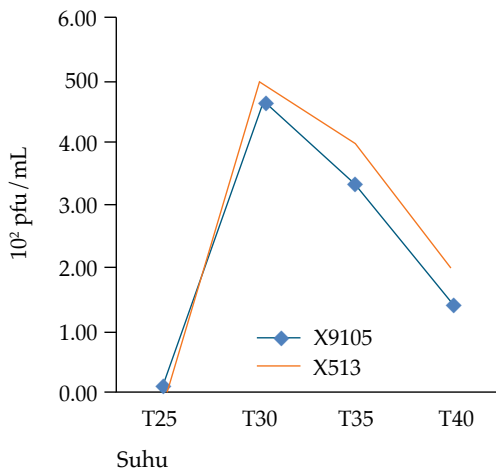
Kod faj	Sumber	Morfologi zon cerah	Morfologi kepala	Morfologi ekor	Anggaran saiz kepala	Famili
X9105	Pseudostem pisang	Cerah dan sedikit berhalo; 1 – 3 mm	Ikosahedron	Pendek, tidak mengecut	52 nm	Podoviridae
X513	Buah pisang	Cerah dan berhalo; 1 – 4 mm	Ikosahedron	Pendek, tidak mengecut	56 nm	Podoviridae

Jadual 2. Penilaian kesesuaian hos faj X9105 dan X513 kepada hos selain hosnya, *R. syzygii* subsp. *celebesensis*

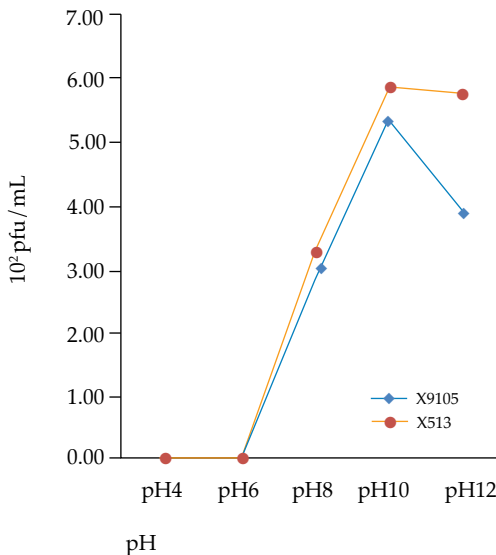
Hos bakteria	Sumber	Bakteriofaj	
		X9105	X513
<i>Ralstonia syzygii</i> subsp. <i>celebesensis</i>	Penyakit layu bakteria darah pisang	+	+
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Penyakit layu pada tomato	-	-
<i>Erwinia mallotivora</i>	Penyakit mati rosot betik	-	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Penyakit reput lembut pada nangka	-	-
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Penyakit reput teras pada nanas	-	-

(+) bertindak balas

(-) tidak bertindak balas



Rajah 1. Penilaian kestabilan suhu faj X9105 dan X513



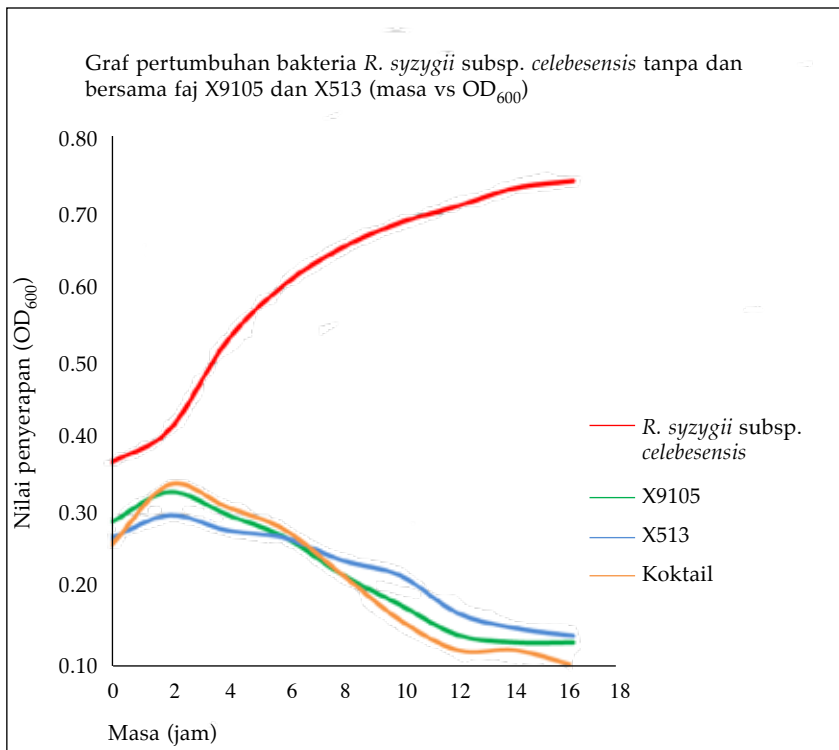
Rajah 2. Penilaian kestabilan dan pH optimum bagi faj X9105 dan X513

pelekatan, infektiviti dan replikasi faj pada peringkat intraselular. Faj X9105 dan X513 mampu bertahan pada pH 7 – 12 dengan pH optimum pada pH10 (Rajah 2). Walau bagaimanapun, kestabilan faj X9105 menurun apabila tahap kealkalian semakin tinggi. Diperhatikan juga, kedua-dua faj ini tidak mampu bereplikasi pada nilai pH yang rendah. Hal ini menunjukkan persekitaran dengan keasidan yang tinggi tidak sesuai untuk kedua-dua faj ini.

Penilaian in vitro faj tunggal dan faj koktail terhadap sel hos

Bagi menilai keberkesanan kesan infektiviti faj secara tunggal dan koktail, faj tunggal X9105, X513 dan koktail X9105 + X513 diuji bersama sel hosnya, *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*. Pemerhatian ini dilakukan melalui gabungan suspensi faj dan hos patogen di dalam medium cecair Casamino acid Peptone-Glucose (CPG) yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C pada kadar MOI (*multiplicity of infection*). Kesan infektiviti dinilai berdasarkan nilai cerapan kekeruhan [*Optical Density* (OD)] medium CPG pada gelombang OD₆₀₀. Nilai direkod setiap dua jam selama 24 jam. Berdasarkan Rajah 3, suspensi bakteria *R. syzygii* subsp. *celebesensis* yang diinfeksi dengan faj X9105, X513 dan koktail X9105 + X513 mula menunjukkan kesan infektiviti selepas tiga jam tempoh inkubasi berbanding dengan suspensi bakteria

R. syzygii subsp. *celebesensis* tanpa faj (kawalan). Nilai OD₆₀₀ yang lebih rendah berbanding dengan kawalan menunjukkan pengurangan atau pemecahan efektif sel hos kesan daripada infektiviti faj. Faj tunggal X513 menunjukkan kesan infektiviti yang lebih cepat berbanding dengan faj X9105 dan koktail X9105 + X513. Walau bagaimanapun, kesan infektiviti faj koktail X9105 + X513 didapati bertahan lebih lama apabila bermula selepas tempoh lapan jam inkubasi. Nilai OD₆₀₀ faj koktail X9105 dan X513 adalah lebih rendah berbanding dengan faj tunggal X9105 dan X513. Keadaan ini berkemungkinan akibat kesan sinergi antara dua faj koktail tersebut. Rembesan enzim yang dihasilkan faj tunggal



Rajah 3. Penilaian *in vitro* faj tunggal dan faj koktail terhadap sel hos, *R. syzygii* subsp. *celebesensis*

boleh membantu faj tunggal yang lain dalam sesuatu koktail faj untuk meningkatkan kebolehan faj tersebut untuk melekat pada reseptor hos yang dijangkiti.

Kesimpulan

Pemencilan dua faj yang diperoleh daripada sampel tanah dan pisang yang dijangkiti penyakit layu bakteria darah menunjukkan kebolehannya secara *in vitro* terhadap patogen *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*. Faj ini berjaya memecahkan sel hosnya dengan membentuk zon lingkaran cerah di permukaan agar. Pengkelasannya telah dilakukan melalui pemerhatian morfologi di bawah mikroskop elektron transmisi manakala kesesuaian hos diuji menggunakan beberapa spesies bakteria dan diuji kestabilannya pada nilai suhu dan pH yang berbeza. Keupayaannya secara tunggal dan koktail melalui ujian *in vitro* terhadap patogen *R. syzygii* subsp. *celebesensis* memungkinkan penggunaannya sebagai agen kawalan biologi terhadap penyakit layu bakteria darah pada tanaman pisang.

Penghargaan

Penghargaan ditujukan kepada MARDI yang telah menyediakan dana bawah Kod Projek Pembangunan P-RH21003004050001-Kajian Peningkatan Hasil dan Kualiti Buah-Buahan Premium untuk Peningkatan Daya saing (Betik, Nanas, Melon, Belimbing, Nangka, Pisang, Mangga, Durian dan Manggis) bagi menjalankan kajian ini.

Bibliografi

- Addy, H.S., Ahmad, A.A. dan Huang, Q. (2019) Molecular and Biological Characterization of *Ralstonia* Phage RsoM1USA, a New Species of P2virus, Isolated in the United States. *Front Microbiol.* 10: 267
- Álvarez, B., López, M.M. dan Biosca, E.G. (2008). Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology* (Reading, England) 154(11): 3,590 – 3,598
- Balogh, B., Jeffrey B.J., Iriarte, F.B. dan Momol, M.T. (2010). Phage therapy for plant disease control. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11: 48 – 57
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., O'Mahony, J. dan Coffey, A. (2017) Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers in microbiology* 8: 34
- Wan Nurhafizah, W.I., Alia Syafiqah, A., Nur Azna, S., Lee, K.L., Nadirah, M., Laith, A.R., Danish-Daniel, M., Sandra, C.Z., Mohamed Shariff, M.D., Mazlan, A.G. dan Najiah, M. (2017). *In-vitro* characterization of lytic bacteriophage PhVh6 as potential biocontrol agent against pathogenic *Vibrio harveyi*. *AAFL Bioflux*, 2017, Volume 10, Issue 1
- Hamdi, S., Rousseau, G.M., Labrie, S.J., Kourda, R.S., Tremblay, D.M., Moineau, S. dan Slama, K.B. (2016). Characterization of five podoviridae phages infecting *Citrobacter freundii*. *Frontiers in microbiology* 7: 1,023
- Kering, K.K., Kibii, B.J. dan Wei, H. (2019). Biocontrol of phytobacteria with bacteriophage cocktails. *Pest Manag Sci.* 75(7): 1,775 – 1,781
- Nur Sulastri, J., Kogeethavani, R., Mohamad Roff, M.N. dan Tengku Ab. Malik, T.M. (2016). Penyakit layu bakteria pada pisang di Malaysia: Moko atau penyakit darah pisang (BDB)? *Buletin Teknologi MARDI* Bil. 9: 31 – 39

Ringkasan

Penyelidikan penggunaan bakteriofaj iaitu sejenis virus “pemakan bakteria” dilihat semakin mendapat perhatian dalam bidang pertanian bagi pengurusan bersepadu penyakit bakteria secara biologi pada tanaman. Tidak seperti penggunaan racun kimia, bakteriofaj lebih bersifat mesra alam dan kehadirannya yang hidup secara semula jadi di persekitaran adalah kurang berbahaya jika terdedah kepada manusia. Kecenderungan penggunaan bakteriofaj ini dilihat pada sifatnya yang tidak toksik, mampu mereplikasi secara sendiri, bersifat hos spesifik, berupaya mengatasi kerintangan dan mudah dihasilkan. Dalam kajian ini, dua bakteriofaj yang dipencilkan telah dikenal pasti berpotensi terhadap *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* iaitu bakteria yang menyebabkan penyakit layu pada pisang melalui bioasai secara *in vitro*.

Summary

Research on the use of bacteriophage, "bacteria-eating" virus is seen to be gaining attention in agriculture for the integrated management of bacterial diseases in crops. Unlike the use of chemical pesticides, bacteriophages are more environmentally friendly and their presence living naturally in the environment allows human exposure to them to be less harmful. The tendency to use this bacteriophage is seen in its non-toxic nature, able to replicate independently, being a specific host, able to overcome resistance and easy to produce. In this study, two isolated bacteriophages have been identified as potential for *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*, the bacteria that cause the banana blood disease to through in vitro bioassay.

Pengarang

Nur Sulastrı Jaffar

Pusat Penyelidikan Hortikultur, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: sulastrı@mardi.gov.my

Md Nurul Khalid Kayube

Pusat Penyelidikan Hortikultur, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor