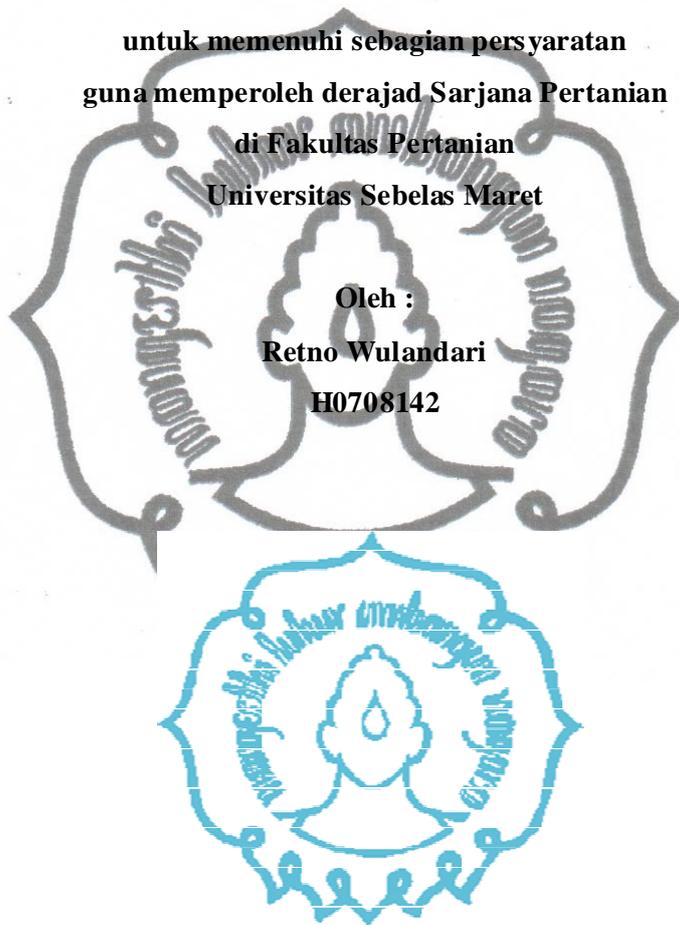


**ANALISIS BAKTERI RIZOSFER TERKULTURKAN DENGAN PCR-  
RISA: HUBUNGANNYA DENGAN KESUPRESIFAN TANAH  
TERHADAP BUSUK PANGKAL BAWANG PUTIH**

**SKRIPSI**

**untuk memenuhi sebagian persyaratan  
guna memperoleh derajat Sarjana Pertanian  
di Fakultas Pertanian  
Universitas Sebelas Maret**

**Oleh :  
Retno Wulandari  
H0708142**



**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
SURAKARTA  
2012**

*commit to user*

**SKRIPSI**

**ANALISIS BAKTERI RIZOSFER TERKULTURKAN DENGAN PCR-  
RISA: HUBUNGANNYA DENGAN KESUPRESIFAN TANAH  
TERHADAP BUSUK PANGKAL BAWANG PUTIH**

**Retno Wulandari**

**H0708142**

**Pembimbing Utama**

**Pembimbing Pendamping**

**Ir. Zainal Djauhari F, MS  
NIP 194909061979031001**

**Dr. Ir. Hadiwiyono, MSi  
NIP 196201161990021001**

**Surakarta, Desember 2012**

**Universitas Sebelas Maret Surakarta  
Fakultas Pertanian  
Dekan**

**Prof. Dr. Ir. Bambang Pujiasmanto, MS  
NIP 195602251986011001**

*commit to user*

**SKRIPSI**

**ANALISIS BAKTERI RIZOSFER TERKULTURKAN DENGAN PCR-  
RISA: HUBUNGANNYA DENGAN KESUPRESIFAN TANAH  
TERHADAP BUSUK PANGKAL BAWANG PUTIH**

yang dipersiapkan dan disusun oleh

**Retno Wulandari**

**H0708142**

telah dipertahankan di depan Tim penguji  
pada tanggal : .....

dan dinyatakan telah memenuhi syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Pertanian  
Program Studi Agroteknologi

**Susunan Tim Penguji**

Ketua

Anggota I

Anggota II

Ir. Zainal D. F, MS.  
NIP. 194909061979031001

Dr. Ir. Hadiwiyono, M.Si  
NIP. 196201161990021001

Prof. Dr. Agr. Sc. Ir. Vita R. C, MP  
NIP. 196612051990102001

*commit to user*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan limpahan kenikmatan yang tiada terhitung sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi dengan judul “Analisis Bakteri Rizosfer Terkulturkan Dengan PCR-RISA: Hubungannya dengan Kesupresifan Tanah terhadap Busuk Pangkal Bawang Putih”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan guna memperoleh derajat Sarjana S1 Pertanian di Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Penulisan laporan ini tidak lepas dari bantuan moral maupun material dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan yang berbahagia ini penulis menghaturkan rasa terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Pujiasmanto, MS., selaku Dekan Fakultas Pertanian UNS,
2. Dr. Ir. Hadiwiyono, M.Si selaku Ketua Program Studi Agroteknologi UNS, sekaligus sebagai pemberi ide penelitian serta pembimbing pendamping yang telah memberikan saran, sumbangan pemikiran serta motivasi kepada penulis dari sejak awal jalannya penelitian sampai dengan akhir penulisan skripsi ini,
3. Ir. H. Zainal D. Fatawi MS., selaku pembimbing akademik, dan pembimbing utama yang telah memberikan saran, sumbangan pemikiran serta motivasi kepada penulis dari sejak awal jalannya penelitian sampai dengan akhir penulisan skripsi ini,
4. Prof. Dr. Ir. Agr. Sc Vita Ratri C, MP., selaku pembahas yang telah memberikan saran dan masukan kepada penulis,
5. Bapak dan Ibu tercinta yang telah memberikan banyak hal yang tidak dapat penulis ungkapkan,
6. Bapak/Ibu dosen serta karyawan Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta
7. Bapak Ahmad Himawan, Bapak Tony Ruaedi dan Mbak Nina K selaku Pembimbing Laboratorium.

*commit to user*

8. Rekan-rekan Gocelu dan Solmated 2008 yang telah memberikan bantuan baik berupa moral maupun spiritual
9. Rekan-rekan Kost Pondok A5, kakak tingkat dan adik tingkat.
10. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari Penulis sadar bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Tetapi diharapkan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	iii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iv
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	ix
<b>RINGKASAN</b> .....	x
<b>SUMMARY</b> .....	xi
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Perumusan Masalah .....	2
C. Tujuan dan Manfaat Penelitian .....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
A. Bawang Putih ( <i>Allium sativum</i> L.) .....	4
B. Tanah Supresif .....	7
C. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> penyebab busuk pangkal Bawang Putih .....	9
D. PCR-RISA (PCR- <i>Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i> ) .....	14
<b>III. METODE PENELITIAN</b> .....	17
A. Waktu dan Tempat Penelitian .....	17
B. Bahan dan Alat .....	17
C. Tata Laksana Penelitian .....	17
D. Analisis Data .....	20
<b>IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b> .....	21
A. Pengambilan Sampel Tanaman terserang <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>cepae</i> .....	21
B. Hasil Analisis Komunitas Bakteri Rhizosfer dengan PCR-RISA....	24

*commit to user*

**DAFTAR ISI**

**(lanjutan)**

	Halaman
V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	29
A. Kesimpulan .....	29
B. Saran .....	29
DAFTAR PUSTAKA .....	30
LAMPIRAN	



**DAFTAR TABEL**

Nomor	Judul dalam teks	Halaman
1.	Perbedaan sifat kimia tanah pada tanah supresif dan kondusif	20

Nomor	Judul dalam lampiran	Halaman
2.	Tabel Pengamatan Jumlah Pita DNA Hasil Amplifikasi Daerah <i>Intergenic Spacer</i>	35



## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul dalam teks	Halaman
1.	Sampel tanaman bawang putih sehat dan sakit yang digunakan untuk analisis komunitas bakteri rizosfer.....	22
2.	Gejala serangan <i>E. oxysporum</i> f. sp. <i>Cepae</i> pada pertanaman bawang putih.....	22
3.	Umbi bawang putih sehat.....	23
4.	Pola fragmen DNA bakteri rizhosfer pada tanah supresif melalui PCR-RISA dengan elektroforesis horizontal menggunakan gel agarose.....	24
5.	Pola fragmen DNA bakteri rizhosfer pada tanah kondusif melalui PCR-RISA dengan elektroforesis horizontal menggunakan gel agarose.....	25
6.	Pola fragmen DNA bakteri rizhosfer pada tanah supresif dan kondusif melalui PCR-RISA dengan elektroforesis vertikal menggunakan poliakrilamid. A: sampel tanaman sehat, B: sampel tanaman sakit.....	26
7.	Dendrogram-UPGMA berdasarkan pola fragmen DNA hasil PCR-RISA pada 4 sampel tanaman berumur 100 HST.....	27
Nomor	Judul dalam lampiran	Halaman
8.	Hasil ekstraksi DNA bakteri rizosfer tanah supresif umur 100 HST : D1-D5 sampel perakaran tanaman sehat dan E1-E5 sampel perakaran tanaman sakit.	34
9.	Hasil ekstraksi DNA bakteri rizosfer tanah kondusif umur 100 HST : O1-O5 sampel perakaran tanaman sehat dan P1-P5 sampel perakaran tanaman sakit.	34
10.	Skema Pola Pita DNA Hasil Amplifikasi Daerah <i>Intergenic Spacer</i>	36

## RINGKASAN

**ANALISIS BAKTERI RIZOSFER TERKULTURKAN DENGAN PCR-RISA: HUBUNGANNYA DENGAN KESUPRESIFAN TANAH TERHADAP BUSUK PANGKAL BAWANG PUTIH.** Skripsi: Retno Wulandari (H0708142). Pembimbing: Zainal D. Fatawi, Hadiwiyono, Vita Ratri Cahyani. Program Studi: Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta.

Tawangmangu, Jawa Tengah merupakan salah satu daerah penghasil bawang putih yang cukup pesat. Namun demikian, produksi bawang putih setiap tahunnya menurun karena adanya serangan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Busuk pangkal yang disebabkan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* merupakan salah satu penyakit penting pada bawang putih di Tawangmangu, Karanganyar. Dan juga merupakan salah satu faktor penyebab kehilangan hasil bawang putih sejak 1973, selama di lahan maupun selama penyimpanan. Insidens penyakit di lapangan mempunyai tingkat ringan sampai berat. Keterlibatan agens pengendalian hayati perlu dilakukan dalam hubungannya dengan mekanisme kesupresifan tanah. Oleh karena itu, perlu informasi dasar tentang hubungan struktur komunitas mikrob dengan kesupresifan tanah tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari struktur komunitas bakteri rizosfer yang terkulturkan dari bawang putih dengan PCR-RISA dan hubungannya dengan kesupresifan tanah terhadap busuk pangkal bawang putih. Struktur komunitas bakteri rizosfer di analisis menggunakan metode PCR-RISA (*Polimerase Chain Reaction-Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) dari ekstraksi DNA hasil pengkulturkan.

Penelitian dilaksanakan mulai Oktober 2011 sampai September 2012 di lahan Tawangmangu, Surakarta dan Yogyakarta. Penentuan sampel dengan metode *purposive sampling*. Sampel yang diambil adalah perakaran tanaman sehat dan sakit dari tanah supresif dan kondusif. Sampel yang telah diambil kemudian dikulturkan di media TSA, selanjutnya diekstraksi menggunakan DNAMITE<sup>®</sup> kit. Amplifikasi DNA menggunakan metode PCR-RISA kemudian hasil amplifikasi divisualisasi menggunakan agarose gel 2% dan PAGE 12%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan struktur komunitas bakteri rizosfer pada tanah supresif dan kondusif, baik tanaman yang sehat maupun tanaman yang sakit. Komunitas bakteri rizosfer pada tanah kondusif cenderung berpotensi lebih beragam dibandingkan tanah supresif. Hal ini bisa dilihat dari jumlah dan ketebalan pada pola pita DNA. Berdasarkan analisis UPGMA menunjukkan bahwa terdapat pengelompokan dari masing-masing sampel berdasarkan kondisi tanaman. Hasil ini menunjukkan bahwa struktur komunitas bakteri tanaman sehat berbeda dengan tanaman sakit.

## SUMMARY

**ANALYSIS OF CULTURABLE RHIZOSPHERE BACTERIA USING PCR-RISA ITS RELATIONSHIP TO SOIL SUPPRESSIVENESS ON BASAL ROT ON GARLIC.** Thesis-S1: Retno Wulandari (H0708142). Advisers: Zainal D. Fatawi, Hadiwiyono, Vita Ratri Cahyani. Study Program: Agrotechnology, Faculty of Agriculture, University of Sebelas Maret (UNS) Surakarta.

Tawangmangu, Central Java, is one of the producer of garlic being quite rapid. However, production of garlic every year decreased due to by attack of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Basal rot is one of important disease of garlic and also one of the factors causing yield loss of garlic, while in the field and during storage. The disease incidence in the field are mild to severe. The involvement of biological control agens needs to be done in conjunction with the mechanism suppressiveness soil. Therefore, the necessary basic information about the relationship of community structure of soil microbia with suppressiveness soil. The research was purposed to study rhizosphere bacterial communities structure of garlic culturable by PCR-RISA and its relationship to soil suppressiveness. Structure of rhizosphere bacterial communities using method of PCR-RISA (*Polimerase Chain Reaction-Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) of DNA extraction from mixture bacterial culture.

The research was carried out from October 2011 to September 2012 in Tawangmangu, Surakarta and Yogyakarta. Sampels were determined by purposive sampling. The sampels are diseased and healthy plant rhizosphere. Samples have been taken then planted in TSA and then extracted using DNAMITE<sup>®</sup> kit. The results of the extraction analyzed by PCR-RISA then visualized by agarose gel 2% and PAGE 12%. The results showed that there was a difference between rhizosphere bacterial communities on suppressive soil and conducive soil, also the condition of healthy and diseased plants. Rhizosphere bacterial community in conducive soil showed tendency more diverse than the suppressive soil. Based on UPGMA analysis showed that the structure of bacterial community in healthy garlic were different with the diseased plant.

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Bawang Putih merupakan komoditas pertanian yang banyak dibutuhkan di dunia. Indonesia merupakan salah satu penghasil bawang putih, namun tingginya permintaan konsumsi bawang putih belum sebanding dengan jumlah produksinya. Oleh karena itu, hingga saat ini Indonesia masih mengimpor bawang putih dari luar negeri. Menurut data Dinas Pertanian Yogyakarta (2006), impor bawang putih Indonesia berjumlah 295 ribu ton dengan nilai tidak kurang dari US\$ 103 juta atau sebesar Rp 927 milyar. Upaya mengurangi ketergantungan impor bawang putih di Indonesia sudah mulai digalakkan yaitu dengan peningkatan produksi bawang putih secara intensif dan terus-menerus.

Pengembangan bawang putih di suatu daerah secara intensif dan terus-menerus memberikan dampak positif peningkatan pendapatan petani, namun juga memberikan dampak negatif dengan adanya peningkatan serangan penyakit bawang putih yang cukup signifikan. Penyakit menjadi kendala yang penting dalam budidaya bawang putih. Busuk pangkal yang disebabkan *F. oxysporum* f. sp. *cepae* merupakan salah satu faktor penyebab kehilangan hasil bawang putih sejak 1973, selama di lahan maupun selama penyimpanan (Widodo et al. 2008).

Busuk pangkal bawang (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*) merupakan salah satu penyakit penting pada bawang putih di Tawangmangu, Karanganyar. Di pertanaman, insidens penyakit ini dapat mencapai di atas 60% (Fatawi et al. 2003). Di lapangan, sebagian lahan dengan insidens penyakit sangat ringan, sedangkan yang lain berat. Lahan pertama tersebut disebut tanah supresif. Menurut Cook dan Baker (1983), tanah supresif merupakan tanah yang dicirikan dengan tidak berkembangnya patogen pada tanah itu, walaupun ditanami varietas yang rentan, sedangkan lahan kedua disebut tanah kondusif, yaitu lahan terdapat patogen dan menyebabkan penyakit yang merugikan.

Salah satu mekanisme kesupresifan tanah yang penting adalah keterlibatan agens pengendalian hayati. Untuk dapat memanfaatkan agens pengendali hayati

tersebut, maka sangat diperlukan informasi dasar tentang hubungan struktur komunitas mikrob dengan kesupresifan tanah tersebut.

Komunitas bakteri merupakan mikrob yang paling dominan dan kemungkinan meliputi separuh dari biomassa mikrob dalam tanah. Hubungan antara rizosfer dengan komunitas bakteri yang ada di perakaran dapat bersifat asosiatif atau antagonistik. Dominansi komunitas bakteri dalam tanah yang memiliki tingkat keragaman tinggi menjadi sangat penting dalam usaha mempelajari ekologi mikrobia tanah dan ekosistem alamiah (Ovreas and Torsvik 1998).

Analisis struktur komunitas melalui pendekatan pengkulturkan sering digunakan dan memiliki kelebihan dalam pengembangan pengendalian berbasis pengendalian hayati pada tanah supresif, karena agens pengendalian hayati yang terkulturkan akan lebih mudah dalam pengembangannya (Borneman dan Tripplet 1997). Metode molekuler seperti PCR-RISA merupakan salah satu cara menentukan keanekaragaman mikrob tanah yang sudah mulai dikembangkan. Kombinasi kedua pendekatan ini akan lebih akurat untuk analisis struktur komunitas bakteri dalam suatu lingkungan.

## **B. Rumusan Masalah**

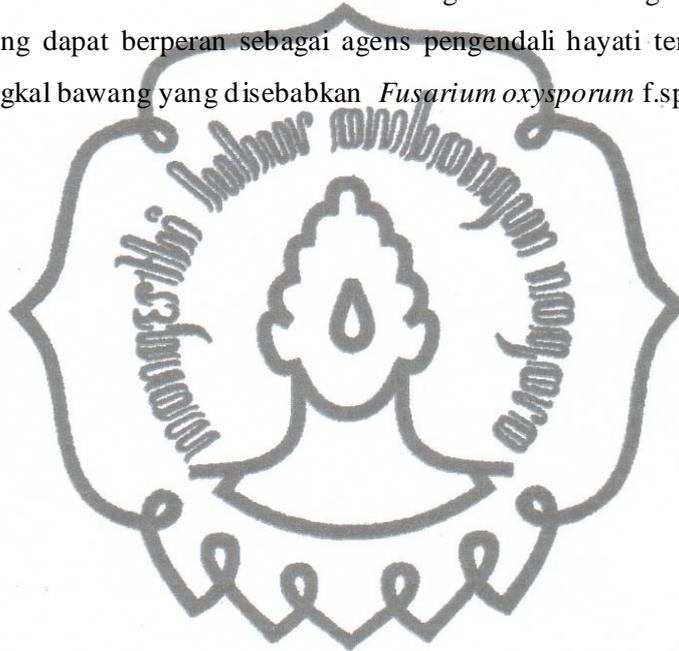
Busuk pangkal bawang yang disebabkan oleh cendawan *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* merupakan salah satu penyakit penting pada bawang putih. Insidens penyakit yang terjadi di lapangan bisa dalam frekuensi ringan hingga berat. Keterlibatan agens pengendali hayati dalam mekanisme kesupresifan tanah adalah sangat penting dilakukan sehingga perlu diketahui hubungan struktur komunitas mikrob dengan kesupresifan tanah tersebut.

Permasalahannya adalah bagaimana struktur komunitas bakteri rizosfer yang terkulturkan dari bawang putih dengan metode PCR-RISA pada tanah supresif dan kondusif dan hubungan struktur komunitas bakteri rizosfer yang terkulturkan dari bawang putih dengan kesupresifan tanah terhadap busuk pangkal bawang putih

### C. Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian bertujuan untuk mempelajari struktur komunitas bakteri rizosfer yang terkulturkan dari bawang putih dengan PCR-RISA pada tanah supresif dan kondusif dan hubungannya dengan kesupresifan tanah terhadap busuk pangkal bawang putih.

Penelitian ini bermanfaat untuk mengetahui mikroorganisme golongan bakteri yang dapat berperan sebagai agens pengendali hayati terhadap penyakit busuk pangkal bawang yang disebabkan *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Bawang Putih

#### 1. Arti Penting Bawang Putih

Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan salah satu komoditas hortikultura yang banyak dibutuhkan terutama untuk bumbu masak. Bawang putih juga berkhasiat sebagai obat, umbinya mengandung senyawa alliin atau allisin yang mempunyai efek antiseptik (Rukmana 1994). Bawang putih dipercaya dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti tekanan darah tinggi, masalah pernafasan, batuk dan lain-lain (Wibowo 2009).

Kondisi iklim, musim dan luas lahan di Indonesia sangat memungkinkan bagi produksi bawang putih secara besar-besaran. Namun, jika dibandingkan negara-negara penghasil bawang putih lain di dunia, produksi bawang putih di Indonesia masih terbilang kecil. Indonesia pada tahun 1981, produksi bawang putih mencapai 11.279 ton pada areal lahan seluas 4.787 ha, sedangkan pada tahun 2006 produksi bawang putih mencapai 20.780 ton dengan areal lahan seluas 3.284 ha (Wibowo 2009).

#### 2. Biologi Bawang Putih

Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan salah satu bumbu dapur utama. Bawang putih yang bermarga *Allium* ini diduga merupakan keturunan bawang liar *Allium longicarpis* Regel, yang tumbuh di daerah Asia Tengah yang beriklim subtropik (Wibowo 2009).

Taksonomi tanaman bawang putih menurut Rukmana (1995) adalah:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Kelas	: Liliales
Familia	: Liliaceae
Genus	: <i>Allium</i>

*commit to user*

Spesies : *Allium sativum L.*

Bawang putih (*Allium sativum L.*) termasuk genus *Allium* atau di Indonesia lazim disebut bawang putih. Bawang putih termasuk klasifikasi tumbuhan terna berumbi lapis atau siung yang bersusun. Bawang putih tumbuh secara berumpun dan berdiri tegak sampai setinggi 30 -75 cm, mempunyai batang semu yang terbentuk dari pelepah-pelepah daun. Helai daunnya mirip pita, berbentuk pipih dan memanjang. Akar bawang putih terdiri dari serabut-serabut kecil yang berjumlah banyak. Setiap umbi bawang putih terdiri dari sejumlah anak bawang (siung) yang setiap siungnya terbungkus kulit tipis berwarna putih (Tyas 2000)

Bawang putih atau *garlic* (*Allium sativum L.*) termasuk tanaman setahun yang berbentuk rumput. Daun bawang putih panjang, kecil, pipih dan tidak berlubang. Tanaman bawang putih ini mirip bawang merah, yakni batangnya berbentuk cakram. Dari cakram ini muncul tunas daun dan akar serabut. Bila pada bawang merah, tunas daun mampu menjadi anakan (tunas samping) maka pada bawang putih tunas-tunas tersebut berubah menjadi umbi siung. Umbi siung dibalut dengan kelopak daun sehingga menjadi sebuah umbi besar, bulat dan berwarna putih. Kulit pembungkus siung-siung cukup sehingga tidak dapat pecah. Oleh karena itu, bawang putih umumnya tidak membentuk rumpun (Sunarjono 2004)

Bawang putih tidak dapat berbunga secara normal, meskipun keluar tangkai bunga biasanya berukuran pendek sekali dan tidak tersembul tumbuh dari ujung tanaman, tetapi berada dalam batang semu. Pada bagian ujung bunga kadangkala tumbuh umbi-umbi kecil, sehingga batang semu terlihat membengkak. Umbi yang berukuran kecil dapat digunakan sebagai bahan perbanyakan secara vegetatif (Rukmana 1995).

### 3. Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bawang Putih

Bawang putih untuk dapat tumbuh dengan baik dan hasil yang optimum, diperlukan kondisi ekologi tertentu. Iklim, tanah, dan air merupakan tiga faktor utama yang perlu mendapat perhatian agar hasil optimum bawang putih tercapai.

Ketinggian tempat yang mempunyai hubungan erat dengan suhu udara merupakan faktor penting dalam budidaya bawang putih (Wibowo 2009).

Syarat penting tumbuhnya tanaman bawang putih adalah hawanya sejuk dan kering serta pH tanah 6,5 – 7,5. Bawang putih sangat baik ditanam pada awal musim kemarau. Jika ditanam pada musim hujan, tanaman mudah terserang penyakit (Sunarjono 2004).

Varietas tanaman bawang putih dataran tinggi menghendaki suhu yang dingin dan sejuk untuk pertumbuhannya dan pembentukan umbinya. Bawang putih dataran tinggi tidak tahan terhadap suhu dan cuaca yang panas. Suhu yang cocok untuk pembudidayaan bawang putih dataran tinggi adalah berkisar antara 20°C - 25°C. Suhu yang terlalu tinggi dari kisaran tersebut dapat menyebabkan pertumbuhan tunas terhenti atau umbi dalam keadaan istirahat (dorman). Demikian pula, suhu yang terlalu rendah (dibawah 15°C) dapat menyebabkan pertumbuhan tunas terhambat. Kisaran suhu tersebut diatas dapat dijumpai di daerah yang memiliki ketinggian antara 700 m – 1.100 m di atas permukaan laut. Sedangkan kelembaban udara yang cocok untuk tanaman bawang putih dataran tinggi adalah sekitar 60% – 80% (Rukmana 1995).

Bawang putih dapat ditanam di tanah tegalan, pekarangan, maupun di tanah sawah setelah panen padi. Tanah ringan atau gembur dapat menghasilkan umbi yang lebih baik daripada tanah berat. Tanah yang gembur akan mendorong perkembangan umbi sehingga dapat tumbuh besar. Kondisi tanah yang paling baik adalah tanah lempung atau lempung liat. Bawang putih juga menyukai tanah yang banyak mengandung bahan organik atau humus, subur, gembur, aerasi baik dan tidak becek (Wibowo 2009).

#### **4. Budidaya Bawang Putih**

Perbanyakan tanaman bawang putih pada umumnya dilakukan dengan cara vegetatif, yaitu berupa umbi bibit. Prasyarat umbi bibit yang baik adalah berasal dari tanaman yang berumur tua sekitar 100 – 120 hari dan termasuk varietas unggul, telah mengalami masa simpan selama 7 – 9 bulan, penampakan kulit umbi mengkilap dan bebas dari gangguan hama maupun penyakit, ukuran

siung berukuran 1,1 – 2,0 g dan jika ujung siung dipatahkan telah nampak tunas berwarna hijau (Rukmana 1995).

Pengaturan jarak tanam mempengaruhi kualitas umbi yang dihasilkan jarak tanam untuk bawang putih umumnya antara 8 – 20 cm antar baris dan jarak masing-masing tanaman dalam baris sekitar 15 – 20 cm. Untuk siung berukuran besar sebaiknya ditanam dengan jarak tanam lebih renggang, yaitu 15 x 10 cm, sedangkan siung kecil ditanam dengan jarak tanam 10 x 10 cm (Wibowo 2009).

Pengolahan tanah untuk budidaya bawang putih ditujukan untuk mencapai kondisi yang dipersyaratkan. Untuk mencapai kondisi tersebut, pada garis besarnya pengolahan tanah adalah penggemburan, pembuatan bedeng dan parit, pemupukan dasar serta pengapuran bagi tanah-tanah yang masam. Pengolahan tanah dilakukan 2 minggu sebelum penanaman (Wibowo 2009).

Penambahan pupuk perlu dilakukan untuk menyediakan hara optimal bagi pertumbuhan bawang putih. Diperlukan tiga unsur hara utama, yaitu N, P dan K dalam bentuk N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dan K<sub>2</sub>O. Pemberian pupuk dilakukan secara bertahap dan biasanya dilakukan dua kali. Pemberian pertama dilakukan sebelum penanaman dan yang kedua diberikan setelah penanaman sebagai pupuk buatan (Wibowo 2009).

## **B. Tanah Supresif**

Perakaran tanaman (rizosfer) merupakan bagian tanaman yang paling kaya akan mikroorganisme. Tingginya populasi mikroorganisme yang ada di rizosfer disebabkan karena pada daerah tersebut merupakan bagian yang sangat kaya akan nutrisi seperti asam amino dan gula sebagai sumber nitrogen dan karbon yang dibutuhkan untuk perkembangan mikroorganisme (Eliza et al. 2007).

Tanah secara khas kaya akan mikroflora dengan jumlah beratus ribu dalam setiap gram tanah. Suatu tanah dikatakan sebagai tanah supresif (*suppressive soil*), apabila tanaman yang tumbuh pada tanah tersebut tidak mengalami gangguan, walaupun OPT terdapat pada lahan tersebut dan tanaman itu merupakan tanaman mudah terserang OPT (Yin et al. 2002).

Tanah supresif menurut Weller et al. (2002) adalah tanah dengan penyakit tidak berkembang, sedangkan tanah kondusif adalah tanah dengan penyakit berkembang. Menurut Neate (2004), tanah supresif merupakan tanah dengan kondisi sesuai untuk perkembangan patogen, namun patogen tidak berkembang, patogen berkembang tapi tidak menghasilkan penyakit, atau berkembang dan kemudian menurun.

Dalam mempelajari tanah supresif banyak hal yang harus menjadi perhatian diantaranya OPT tular tanah dan mikroba antagonisnya. Tanah supresif menjadi berguna untuk mengetahui interaksi kuantitatif dan berperan sebagai musuh alami dari satu OPT (Westphal and Becker 2001).

Dalam tanah supresif, akar tanaman terlindungi oleh mikrob tanah dari serangan OPT. Fenomena ini menjadi penting untuk menggali lebih dalam mengenai tanah supresif dalam mengontrol OPT terbawa tanah, faktor stimulasi dari bahan-bahan dalam tanah, dan mekanisme biologis yang mempunyai kontribusi pada ketahanan terhadap penyakit (Mazzola and Yu 2002).

Hadiwiyono (2008) menyatakan bahwa tanah supresif lebih menekankan pada kapasitas penekanan tanah terhadap penyakit, sedangkan tanah sehat lebih menekankan pada kapasitas tanah untuk memproduksi secara optimum. Kapasitas produksi tanah dapat terekspresikan secara optimum apabila penyakit tidak berkembang atau pada status supresif

Ekspresi asosiatif tanaman-mikroorganisme telah diuji secara luas di alam dan kemampuan induksi supresifnya terhadap OPT terbawa tanah. Di antara kelompok organisme merupakan komponen asosiasi akar-bakteri, yang secara umum digolongkan dalam komunitas bakteri rizosfer (Kloepper et al. 1999). Rizosfer dicirikan oleh lebih banyaknya kegiatan mikrobiologis dibandingkan kegiatan di dalam tanah yang jauh dari perakaran tanaman. Intensitas kegiatan semacam ini tergantung dari panjangnya jarak tempuh yang dicapai eksudasi oleh cairan yang keluar dari sistem perakaran. Istilah 'efek-rizosfer' menunjukkan pengaruh keseluruhan perakaran tanaman terhadap mikroorganisme tanah (Rao 2007).

### C. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* penyebab busuk pangkal Bawang Putih

#### 1. Arti Ekonomi

Busuk pangkal bawang-bawangan yang disebabkan oleh *F. oxysporum* f. sp. *cepae* telah menjadi penyakit yang merugikan dan mengancam pertanaman bawang putih di Tawangmangu Karanganyar Jawa Tengah sehingga menjadi kendala baru sejak musim tanam 2000. Berdasarkan hasil identifikasi penyakit, busuk pangkal *Fusarium* di Tawangmangu disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *cepae* (Hanz.) Snyd. et. Hans (Fatawi et al. 2003).

Hadisutrisno (1989) dalam Semangun (1996) melaporkan bahwa FOCe menyebabkan busuk umbi pada bawang putih di Jawa dan Sumatera. Menurut Havey (1995), gejala busuk pangkal bawang putih disebabkan oleh *F. oxysporum* Schl. :Fr. f. sp. *cepae* (H.N. Hans.) W.C. Snyder dan H.N. Hans. Inang utamanya adalah bawang merah dan menyebabkan busuk umbi lapis (*basal plate rot*), dan juga dapat menyerang bawang putih.

#### 2. Gejala serangan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* pada bawang putih

Patogen busuk pangkal bawang putih menyebabkan gejala bagian atas tanaman yang terserang daunnya mati dari ujung dengan cepat atau layu. Apabila tanaman dicabut terjadi pembusukan pada perakaran dan atau umbi terutama mulai dari pangkal umbi sehingga sesuai dengan gejalanya disebut penyakit busuk pangkal. Pada umbi yang busuk sering dijumpai tanda penyakit berupa miselium cendawan yang berwarna putih. Di Tawangmangu, pada musim tanam 2000 serangan patogen paling tinggi 10% namun dari tahun ke tahun meningkat dan pada musim tanam 2002 insiden penyakit dapat mencapai 60%. Penyakit paling sering muncul pada tanaman yang menjelang siap panen, namun pada musim tanam 2003 penyakit telah dapat dijumpai pada tanaman umur 15 hari setelah tanam. Penyakit ini tentu sangat merugikan karena tanaman yang terserang patogen umumnya umbi sebagai hasil tanaman menjadi busuk, sehingga besarnya kerugian sama dengan insidens penyakit, karena umbi bawang tanaman yang terserang tidak lagi laku dijual (Fatawi et al. 2003).

*F. oxysporum* f. sp. *cepae* menyerang bawang putih yang luka pada waktu penyiangan, panen, pengangkutan, atau pada waktu pemotongan daun. Gejala pada umbi terserang patogen adalah umbi membusuk dan berwarna kuning coklat, umbi bawang putih menjadi “gembus”. Penyakit Fusarium dapat menyebabkan layu pada daun bawang putih, gejalanya dimulai dari pucuk daun (Santoso 1988). Fusarium merupakan jamur tanah atau yang lazim sebagai *soil in habitant*. Tanah yang sudah terinfestasi sukar dibebaskan dari jamur ini. Jamur ini bersifat tular tanah. Apabila tidak ada tanaman inang di lapangan jamur ini dapat bertahan lebih 10 tahun dalam tanah (Semangun 2001).

Penyakit busuk pangkal batang menjadi kendala dalam produksi bawang putih (*Allium sativum* L.). Gejala yang ditunjukkan hampir sama yaitu terpelintirnya dan mengeringnya daun dimulai dari ujung serta pembusukan umbi atau perakaran (Choiruddin 2010).

### 3. Biologi *F. oxysporum* f. sp. *Cepae*

Menurut Semangun (1996), bahwa klasifikasi jamur penyebab layu fusarium ini adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Mycetaceae
Divisi	: Amastigomycota
Subdivisi	: Deuteromycotina
Kelas	: Deuteromycetes
Subkelas	: Hypomycetidae
Bangsa	: Moniliales
Suku	: Tuberculariaceae
Marga	: Fusarium
Jenis	: <i>Fusarium</i> sp.

*F. oxysporum* adalah cendawan tanah yang dapat bertahan lama dalam tanah sebagai kladospora, yang terdapat banyak dalam akar-akar yang sakit. Cendawan dapat bertahan juga pada akar bermacam-macam rumput, dan pada tanaman jenis Heliconia. *F. oxysporum* menyerang melalui akar, terutama akar yang luka. Baik luka mekanis maupun luka yang disebabkan nematoda

*Radophulus similis*. Tetapi ia tidak bisa masuk melalui batang atau akar rimpang, meskipun bagian ini dilukai (Semangun 1996).

*Fusarium* mempunyai makrokonidium dan mikrokonidium, dimana makrokonidium berbentuk melengkung, panjang dengan ujung yang mengecil dan mempunyai satu atau tiga buah sekat, sedangkan mikrokonidium mempunyai bentuk tidak bersekat atau bersekat satu dan dihasilkan oleh sporodokium. Klamidospora dan sclerotia juga sering terbentuk dari hasil miseliumnya. Klamidospora dihasilkan apabila keadaan lingkungan tidak sesuai bagi patogen dan berfungsi untuk mempertahankan kelangsungan hidup patogen. *Fusarium* hidup sebagai parasit dan saprofit pada berbagai tanaman terutama pada bagian pembuluhnya, sehingga tanaman menjadi mati karena terhambatnya jaringan oleh suatu toksin. *Fusarium* mula-mula berwarna putih kemudian krem atau kuning pucat dan apabila ditumbuhkan dalam medium PDA maka akan berwarna merah muda atau ungu (Sastrahidayat 1990).

*Fusarium* sp. menghasilkan tiga macam toksin yang menyerang pembuluh xilem yaitu asam *fusaric*, asam *dehydrofusaric*, dan *lycomarasmis*. Toksin-toksin tersebut akan mengubah permeabilitas membran plasma dari sel tanaman inang sehingga mengakibatkan tanaman yang terinfeksi lebih cepat kehilangan air daripada tanaman yang sehat (Sastrahidayat 1990).

Infeksi *Fusarium* terjadi pada bagian jaringan pembuluh xilem. Akibat gangguan pada jaringan xilem, tanaman menunjukkan gejala layu, daun menguning, dan akhirnya mati. Gejala layu seringkali disertai gejala klorosis dan nekrosis pada daun. Gejala yang terjadi pada tanaman yang layu *Fusarium* adalah menguningnya daun dari tepi daun selanjutnya menjadi coklat dan mati secara perlahan hingga tulang daun. Menguning dan matinya daun-daun dimulai dari daun yang lebih tua. Hal ini disebabkan patogen menginfeksi tanaman melalui luka pada akar dan masuk ke dalam jaringan xilem melalui aktivitas air sehingga merusak dan menghambat proses menyebarnya air dan unsur hara keseluruh bagian tanaman terutama pada bagian daun yang tua (Huda 2010).

Daur penyakit layu *Fusarium* menurut Sastrahidayat (1990) yaitu apabila tanaman sehat ditanam pada tanah terinfeksi maka tabung kecambah (*germ tube*)

dari spora atau miselium akan mengadakan penetrasi langsung ke akar yang sehat atau melalui luka pada akar. Setelah itu, miselium akan bergerak hingga mencapai pembuluh xilem. Di dalam pembuluh xilem miselium menghasilkan mikrokonidium dalam jumlah banyak dan miselium akan bercabang-cabang dan masuk ke ruang-ruang intraseluler. Di dalam pembuluh xilem miselium menghasilkan toksin yang akan mengubah permeabilitas membran plasma dari sel tanaman inang sehingga tanaman lebih cepat kehilangan air. Selain itu, jamur juga akan membebaskan polifenol yang nantinya dioksidasi oleh enzim *polyphenoloxidase* menjadi quinon yang segera mengadakan polimerisasi menjadi melanin berwarna sawo matang yang menyebabkan perubahan warna di dalam pembuluh xilem.

#### 4. Faktor yang Mempengaruhi *F. oxysporum f. sp. Cepae*

Cendawan *Fusarium* sp. merupakan patogen tular tanah atau “*soil-borne pathogen*” yang termasuk parasit lemah. Cendawan ini menular melalui tanah atau rimpang yang berasal dari tanaman sakit, dan menginfeksi melalui luka. Luka tersebut dapat terjadi karena pengangkutan benih, penyiangan, pembumbunan, atau karena serangga dan nematoda. Apabila kondisi lingkungan tidak menguntungkan, cendawan bertahan hidup dalam bagian tanaman, baik di lapangan maupun selama masa penyimpanan. Pada saat kondisi lingkungan menguntungkan, cendawan akan tumbuh dan berkembang pada bagian tanaman dan menular ke bagian tanaman lain. Walaupun tanah sudah tertular, gejala penyakit belum nampak pada tanaman karena memerlukan waktu beberapa bulan dan bila digunakan sebagai bibit sebagian besar tanaman akan terinfeksi cendawan patogen tersebut (Djaenuddin 2011).

Temperatur optimum untuk pertumbuhan *F. oxysporum f. sp. cepae* berkisar antara 24 °C sampai 27 °C yang berpengaruh pada diameter koloni dan berat kering setelah 146 dan 177 jam. Suhu tanah dapat menjadi faktor utama yang memberikan respon untuk perkembangan busuk pangkal *Fusarium* bawang dalam kondisi lahan di pegunungan, yang umumnya dingin dalam sebagian stadium pertumbuhannya (Abawi and Lorbeer 1972).

Sastrahidayat (1990) menyatakan pada suhu 18°C sedikit terjadi infeksi, antara 25-28°C patogen akan menjadi virulen, sedangkan pada suhu 38°C selama beberapa hari patogen akan mati. Pada suhu 25-30°C spora akan berkecambah, sedangkan pada suhu yang lebih rendah proses perkecambahan akan terhambat. Selain itu, jamur *Fusarium* sangat cocok pada tanah masam dengan kisaran pH 4,5-6,0. Patogen tumbuh baik pada biakan murni dengan kisaran pH 3,6-8,4, sedangkan untuk sporulasi optimal berkisar 5,0-3,6.

##### 5. Pengendalian *F. oxysporum* f. sp. *cepae*

Pengendalian penyakit tumbuhan yang disebabkan oleh jamur menurut Pusposendjojo (2008) dapat dilakukan dengan berbagai cara: (1) eksklusi, yakni mencegah masuknya patogen ke suatu tempat, daerah, kawasan, atau negara dengan peraturan-peraturan yang menetapkan syarat-syarat yang harus dipenuhi (karantina tumbuhan) dan sertifikasi bahan/produk pertanian, (2) proteksi atau perlindungan tumbuhan untuk mencegah menjadi sakitnya tumbuhan apabila patogen sudah ada di lingkungan, dan (3) eradikasi atau pemusnahan patogen yang sudah menyerang tumbuhan dan tumbuhan sakit.

Hasil penelitian Severn et al. (2003), pengendalian layu fusarium pada tanaman dengan cara kimiawi dan kultur teknis tidak efektif. *Fusarium oxysporum* sukar diketahui kehadirannya. Penggunaan fungisida untuk mengendalikan patogen di dalam tanah terbukti tidak efektif karena senyawa-senyawa yang dihasilkan fungisida tadi menjadi tidak bersifat biosidal karena adanya bahan organik di dalam tanah yang berfungsi sebagai penetral racun. Oleh karena itu perlu dicari cara lain agar patogen dapat ditekan perkembangannya (Sunyoto et al. 2003).

Pengendalian dengan cara biologi yaitu dengan aplikasi agens hayati misalnya *Trichoderma* spp., *Gliocladium* sp., *Pseudomonas fluorescent*, *Bacillus subtilis* sebelum atau pada saat tanam (satu kilogram/lubang tanam) yang diintroduksi bersama dengan kompos dengan perbandingan 1 : 10, atau pada bibit (100 g/bibit). Sedangkan cara kimia semua alat yang digunakan didisinfektan dengan kloroks 1% atau dicuci bersih dengan sabun, dan injeksi larutan minyak

tanah atau herbisida sistemik terhadap tanaman sakit dan anaknya, sebanyak 5 – 15 ml/pohon tergantung ukuran atau umur tanaman. Injeksi ini dapat diulangi hingga tanaman mati (Djatnika et al. 2003).

#### **D. PCR RISA (PCR- *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*)**

Reaksi polimerase berantai atau dikenal sebagai *polymerase chain reaction* (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro*. Metode PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA sebanyak ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, yaitu sekitar  $10^6$ - $10^7$  kali. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap  $n$  siklus PCR akan diperoleh  $2n$  kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target (Fatchiyah et al. 2011).

PCR-RISA digunakan untuk menentukan keanekaragaman mikrob tanah (Borneman dan Triplet 1997), yang didasarkan pada kemampuan primer fluoresen dalam pengamplifikasi *ribosomal intergenic spacer* mikrob, dengan menggunakan DNA terekstraksi dari sampel lingkungan sebagai cetakan. PCR-RISA melibatkan amplifikasi PCR daerah gen operon rRNA antara subunit kecil (16S) dan subunit besar (23S) yang disebut *intergenic spacer region* (ISR). Menggunakan primer oliginukleotida dengan target daerah sasaran gen 16S dan 23S yang lestari, fragmen PCR-RISA dapat menampilkan bakteri dominan dari sampel lingkungan. Kemayoran rRNA operon yang memberikan suatu fungsi struktural, daerah 16S-23S dapat disandi tRNAs yang tergantung spesies bakteri. Nilai taksonomi ISR memberikan heterogenitas yang signifikan, baik panjang maupun urutan nukleotida. Heterogenitas panjang ISR berkisar 150-1500 bp dengan panjang mayoritas berkisar antara 150 dan 500 bp (Fisher dan Triplett 1999).

Penggunaan sekuen 16S rRNA memiliki kelemahan karena kadang-kadang kurang dapat membedakan dengan jelas suatu spesies dalam level genus.

Beberapa bakteri memiliki sifat fisiologis yang berbeda tetapi memiliki sekuen 16S rRNA yang sama. Berbeda dengan sekuen 16S rRNA, sekuen di antara 16S-23S rDNA yang dikenal dengan ribosomal intergenic spacer (RIS) memiliki panjang sekuen yang berbeda untuk masing-masing spesies, sehingga sekuen RIS dapat digunakan sebagai penanda untuk membedakan spesies dan galur dalam suatu spesies (Yu dan Mohn 2001).

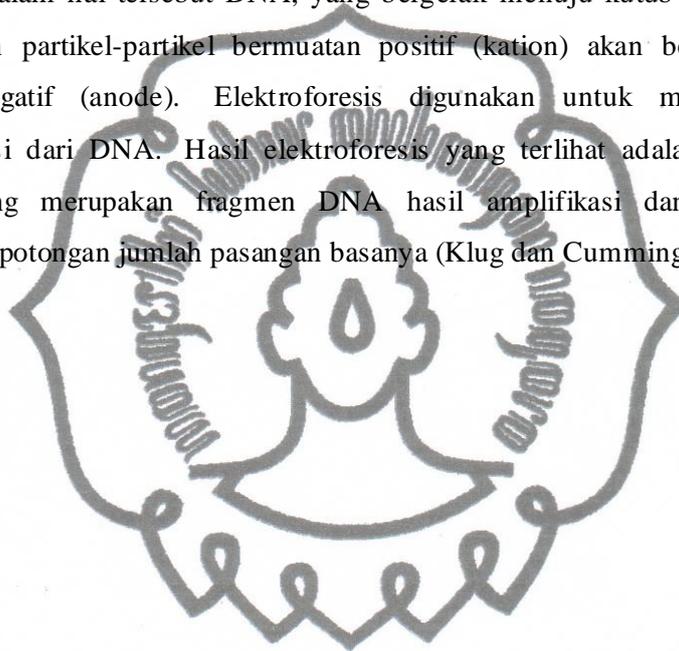
RISA merupakan metode yang sangat baik untuk mengamati struktur dan dinamisasi komunitas bakteri yang sangat kompleks melalui perubahan pita-pita DNA. RISA dapat digunakan untuk mengidentifikasi populasi yang terjadi dalam suatu komunitas. Rangkaian beberapa pita DNA dapat menunjukkan secara spesifik keberadaan populasi dalam suatu komunitas. Variasi bagian teramplifikasi dari IGS dapat dengan langsung dipisahkan atas dasar ukurannya menggunakan gel poliakrilamid. Variabilitas ukuran yang tinggi menunjukkan adanya variabilitas yang tinggi dalam struktur genetik komunitas (Ranjard et al. 2000).

Metode RISA dapat digunakan untuk mempelajari komposisi dan populasi dari komunitas mikrob baik identifikasi genus, spesies atau pengelompokan phylogenetik dan mengamati perubahan lingkungan yang terjadi. RISA juga dapat digunakan untuk mengamati struktur dan dinamisasi komunitas bakteri yang sangat kompleks melalui perubahan pita-pita DNA. Dimana pita-pita DNA tersebut dapat menunjukkan secara spesifik keberadaan populasi dalam suatu komunitas. Variasi bagian teramplifikasi dari IGS dapat dengan langsung dipisahkan atas dasar ukurannya menggunakan gel poliakrilamid. Variabilitas ukuran yang tinggi menunjukkan adanya variabilitas yang tinggi dalam struktur genetik komunitas (Christanto et al. 2007).

Empat komponen utama pada proses PCR adalah (1). DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2). oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3). deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4). enzim DNA polimerase yaitu enzim

yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa penyangga (Yuwono 2006).

Elektroforesis adalah suatu teknik yang mengukur laju perpindahan atau pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), dalam hal tersebut DNA, yang bergerak menuju kutub positif (anode), sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (anode). Elektroforesis digunakan untuk mengamati hasil amplifikasi dari DNA. Hasil elektroforesis yang terlihat adalah terbentuknya *band* yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi dan menunjukkan potongan-potongan jumlah pasangan basanya (Klug dan Cummings 1994).



### III. METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Oktober 2011 – September 2012. Pengambilan sampel dilakukan di Desa Pancot dengan ketinggian 1.193 mdpl pada posisi 7°39' LS dan 111°8' BT dan Desa Gondosuli dengan ketinggian 1.577 mdpl pada posisi 7°40' LS dan 111°9' BT Kecamatan Tawangmangu, Karanganyar. Analisis laboratorium dilakukan di Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian UNS, Laboratorium Biologi Fakultas MIPA UNS, Laboratorium Agribiotek dan Laboratorium Bioteknologi Pusat Antar Fakultas (PAU) Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

#### B. Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu perakaran tanaman bawang putih (tanaman sehat dan tanaman sakit) yang diambil dari tanah supresif dan kondusif yang diperoleh dari lahan pertanaman bawang putih di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Bahan untuk pengkulturan bakteri menggunakan media *Tryptic Soy Agar* (TSA) dan air steril. Bahan untuk ekstraksi DNA menggunakan DNAMITE® kit. Bahan yang digunakan untuk PCR dan elektroforesis antara lain: DNA template, Primer S926f (5'>CTYAAAKGAATTGACGG<3') dan L189R (5'>TACTGAGATGYTTMARTTC<3'), DNA Marker, larutan penyangga *Tris-Borac-EDTA* (TBE) 1X, larutan penyangga TBE 5X, *Bovine Serum Albumin* (BSA), *Mega Mix Royal* (MMR), gel agarosa, etidium bromide (Good View), *polyacilamid gel electrophoresis* (PAGE) 12% yang dibuat dari 6 ml acrylamid 12 %, 3 ml larutan penyangga TBE 5X, 15 µl N,N,N',N'-*Tetramethylethylenediamine* (TEMED) dan 135 µl Amonium persulfat (APS) 10%.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: tabung reaksi, petridis, jarum sprider, yellow tip, eppendorf, mikro pipet, sentrifuse, mesin *automatic thermocycler*, microwave, mesin elektroforesis (horizontal), mesin *mini vertical electrophoresis*, kamera digital.

### C. Tata Laksana Penelitian

#### 1. Pengambilan Sampel Tanaman terserang *F. oxysporum* f. sp. *cepae*

Pengambilan sampel ditentukan melalui *purposive sampling*. Adapun kriteria lahan yang digunakan untuk penelitian adalah pertanaman berumur 100 hari, terserang *F. oxysporum* f. sp. *cepae* penyebab busuk pangkal bawang putih, dengan insidens penyakit kurang 1% untuk tanah supresif dan sama atau lebih dari 40% untuk tanah kondusif. Perakaran dikumpulkan menjadi satu untuk dijadikan sampel komposit dalam 5 ulangan. Pengambilan sampel dari lahan supresif dan kondusif penyakit dilakukan pada 2 lahan yang berbeda untuk dilakukan analisis secara terpisah.

#### 2. Pengkulturan Bakteri Rizosfer

Bakteri yang terdapat dalam rendaman perakaran bawang putih dibiakkan dalam medium TSA (*Trypsic Soy Agar*). Persiapan pembuatan medium TSA dengan memanaskan 30 g TSB (*Trysic Soy Broth*) dan 15 g Agar dalam 1 L aquades kemudian disterilisasikan selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Sebanyak 1 ml suspensi bakteri hasil rendaman akar bawang putih diratakan di atas medium TSA yang telah membeku. Kemudian diinkubasi selama 4 hari dan kemudian dipanen dengan cara memasukkan 5 ml air steril dan dengan menggunakan jarum spider koloni bakteri dilepaskan dari medium. Suspensi bakteri yang diperoleh dikumpulkan pada tabung reaksi, yang kemudian digunakan untuk ekstraksi DNA.

#### 3. Ekstraksi DNA Bakteri Rizosfer

Isolasi DNA bakteri rizosfer mengambil suspensi dari kultur yaitu sebanyak 1 ml suspensi massa bakteri dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf dan setiap sampel disentrifugasi pada 1.000 rpm selama 5 menit. Supernatan kemudian dipindah ke Eppendorf yang baru dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindah ke Eppendorf baru lalu disentrifugasi 10.000 selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal hasil sentrifugasi 5000 rpm 5 menit dan 10.000 rpm 10 menit masing-masing ditambahkan larutan

LA sebanyak 500  $\mu$ l. Setelah keduanya disatukan dalam satu Eppendorf, ditambahkan 100  $\mu$ l larutan PA kemudian digojog hingga homogen. Selanjutnya disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit, maka akan muncul endapan berwarna putih. Supernatan dipindahkan ke Eppendorf baru lalu menambahkan 400  $\mu$ l larutan CA kemudian disentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang, sedangkan pelet yang tertinggal ditambahkan 50  $\mu$ l aquabides. Setelah itu, disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit sehingga akan dihasilkan DNA template hasil ekstraksi DNA.

Hasil ekstraksi dilihat melalui elektroforesis pada gel 1 % dengan pewarna ethidium bromide untuk memastikan terdapatnya DNA dalam hasil ekstraksi tersebut.

#### **4. Amplifikasi *Ribosomal Intergenic Spacer***

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan metode PCR-RISA dalam 25  $\mu$ l campuran reaksi PCR yang dibuat dari 3  $\mu$ l DNA cetakan bakteri total; 2,5  $\mu$ l dari 10mg/ml BSA; 12,5  $\mu$ l *Mega Mix Royal* (MMR); 1  $\mu$ l dari 100 pmol dari masing-masing primer S926F (5'>CTYAAAKGAATTGACGG<3') dan L189R (5'>TACTGAGATGYTTMARTTC<3'), dan 5  $\mu$ l aquabides. Program PCR yang dijalankan adalah denaturasi awal pada 95 °C selama 5 menit, 35 siklus terdiri dari denaturasi pada 95 °C selama 1 menit, penempelan 50 °C selama 1 menit, perpanjangan pada 72 °C selama 2 menit dan *final extension* (pemanjangan akhir) selama 6 menit pada 72°C (Widayati 2007).

Setelah semua proses berakhir, DNA hasil PCR-RISA dapat langsung dilakukan elektroforesis maupun disimpan dalam suhu 4 °C hingga dilakukan elektroforesis.

#### **5. Elektroforesis dan Pewarnaan DNA**

Elektroforesis dari DNA teramplifikasi dilakukan dua kali, yaitu dengan gel agarose 2% dengan marker ladder 1 kb selama 20 menit dijalankan dengan arus 110 V dengan mesin elektroforesis (horizontal) dan elektroforesis kedua dengan *polyacilamid gel electrophoresis* (PAGE) 12%, yang dibuat dari: 6 ml

acrylamid 12 %, 3 ml larutan penyangga TBE 5X, 15  $\mu$ l TEMED dan 135  $\mu$ l APS (Amonium persulfat) 10%. Elektroforesis dijalankan dengan arus 100 V selama 170 menit dalam penyangga 1xTBE menggunakan mesin *mini vertical electrophoresis* (BioRad<sup>TM</sup>). DNA yang diperoleh divisualisasi dengan larutan perak nitrat 1%.

Proses pewarnaan perak nitrat dimulai dengan memberikan asam asetat glasial 10% setelah gel dilepaskan dari kaca elektroforesis. Setelah kurang lebih selama 40 menit digoyang dalam rendaman asam asetat glasial 10%, larutan dibuang dan gel dibilas dengan air destilat ganda selama 5 menit (sebanyak 3 kali) sambil terus digoyang. Setelah air destilat ganda bilasan terakhir dibuang, gel direndam dalam larutan perak nitrat (0,1% AgNO<sub>3</sub> dan 0,56% formaldehid), dan digoyang kembali selama 45 menit. Selanjutnya gel dibilas dengan air destilat ganda (selama 15 detik) dan direndam pada larutan pewarna (3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 2 mg/ml Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dan 0,56% formaldehid). Proses perendaman dilakukan secara bertahap, tiga kali perendaman masing-masing selama kurang lebih 30–60 detik, sampai diperoleh visualisasi yang diinginkan. Reaksi dihentikan dengan penambahan asam asetat glasial 10% dan digoyang beberapa saat. Setelah itu larutan dibuang dan diganti larutan asam asetat glasial 10% yang baru. Hasil elektroforesis ditutup menggunakan plastik kaca dan dikeringkan.

#### D. Analisis Data

Hasil visualisasi PCR-RISA dibuat data pola fragmen DNA masing-masing isolat menjadi suatu matrik. Kemunculan fragmen DNA pada setiap tanaman sampel diberi indeks 1, sedangkan yang tidak muncul diberi indeks 0. Matrik data yang diperoleh dianalisis *un-weighted pair-group method arithmetic average* (UPGMA) dengan perangkat lunak NTSYS 2.1 untuk melihat hubungan kedekatan struktur komunitas bakteri endofit antartanaman sampel. Kedekatan hubungan dilihat berdasarkan koefisien kesamaan dan pengelompokan sampel dalam bentuk dendrogram.

#### IV. HASIL PENGAMATAN DAN PEMBAHASAN

##### A. Pengambilan Sampel Tanaman terserang *F. oxysporum f. sp cepae*

Sampel tanah diambil dari daerah Tawangmangu yang merupakan jenis tanah andosol. Tanah andosol memiliki ciri-ciri: struktur remah, gembur, bahan organik tinggi, aerasi dan drainase baik, pH rendah (Wibowo 1988, Nazaruddin 1994). Berikut ini disajikan data mengenai sifat kimia tanah dari masing-masing sampel tanah.

Tabel 1 Perbedaan sifat kimia tanah pada tanah supresif dan kondusif

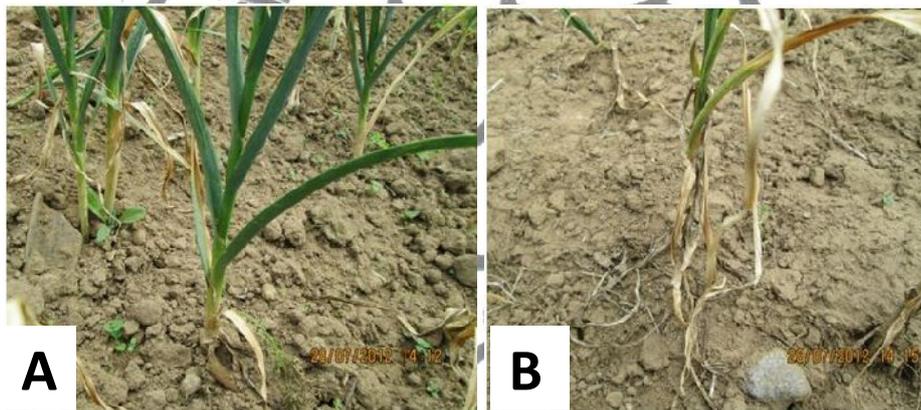
Sampel Tanah	N total (%)	P tersedia (ppm)	K tertukar (me/100g)	Bahan organik (%)	C Organik (%)	pH
Supresif	0,42	13,35	0,34	1,58	0,92	6,43
Kondusif	0,49	15,22	0,41	2,46	1,42	6,19

Tanah merupakan perpaduan yang kompleks dari berbagai unsur yang ada didalamnya, antara lain bahan organik (BO), unsur hara dan mikroorganismen tanah. BO dan mikroorganismen tanah yang merupakan unsur kesuburan tanah ternyata mempengaruhi perkembangan penyakit busuk pangkal bawang putih. Pada tanah supresif kandungan BO-nya lebih rendah daripada tanah kondusif. Hal ini menunjukkan komunitas mikrob yang ada tidak berperan sebagai agens pengendali hayati busuk pangkal bawang putih. Hadiwiyono dan Salim (2008) juga menyebutkan bahwa intensitas busuk pangkal bawang putih di Tawangmangu ditentukan karakter fisika, kimia, dan biologi tanah. Tingginya komunitas mikrob karena adanya kandungan bahan organik yang tinggi pada tanah yang cenderung meningkatkan intensitas busuk pangkal bawang putih.

Kandungan bahan organik pada tanah supresif yang lebih tinggi dibandingkan tanah kondusif diduga mempengaruhi nutrisi hara di dalam tanah yang justru akan memberikan medium tumbuh yang baik bagi *F. oxysporum f. sp. cepae*. Hal ini sesuai pernyataan Koike et al. (2008), bahwa bahan organik yang menyebabkan tersedianya nutrisi dengan KPK (Kapasitas Pertukaran Kation)

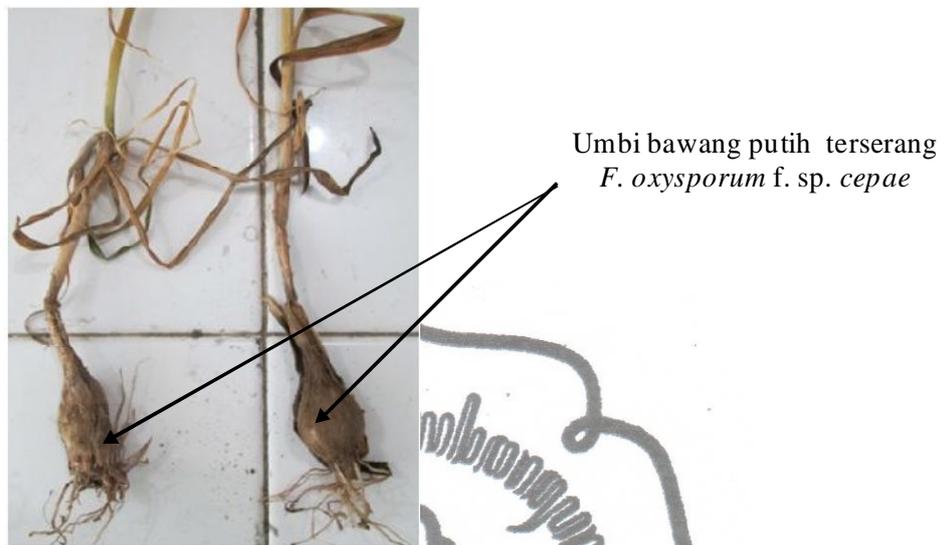
yang tinggi justru memberikan medium tumbuh yang baik bagi *F. oxysporum* f. sp. *cepae* sebagai patogen penghuni tanah yang saprotrof

Sampel tanaman yang digunakan pada penelitian ini menggunakan sampel tanaman sehat dan sakit. Bawang putih yang sakit terdapat patogen busuk pangkal. Gejala serangan busuk pangkal dimulai dari pucuk daun (Santoso 1988). Gejala yang terlihat adalah pada umbi membusuk dan muncul miselium jamur putih pada luar umbi. Bawang putih terserang *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. menjadi layu dan menguning, daun mati dari ujung hingga pangkal, akibat matinya jaringan akar dan pangkal bawang putih, bila dicabut pada umbi terlihat gejala busuk.



Keterangan: A: Tanaman bawang putih sehat, B: Tanaman bawang putih yang terserang *F. oxysporum* f. sp. *cepae*

Gambar 1: Sampel tanaman bawang putih sehat dan sakit yang digunakan untuk analisis komunitas bakteri rizosfer



Umbi bawang putih terserang  
*F. oxysporum* f. sp. *cepae*

Gambar 2: Gejala serangan *F. oxysporum* f. sp. *cepae* pada pertanaman bawang putih

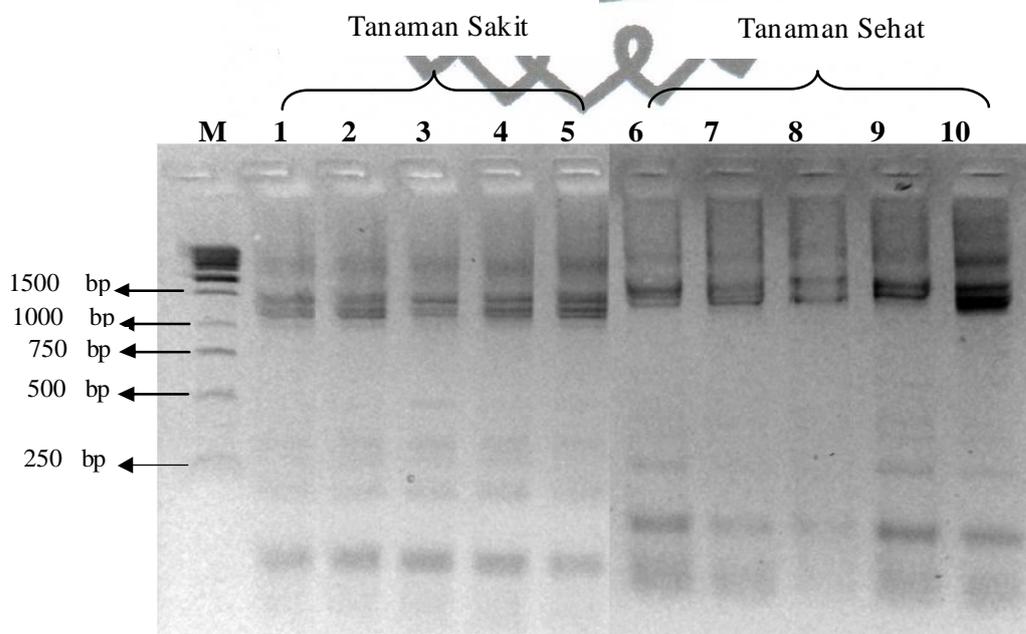


Gambar 3: Umbi bawang putih sehat

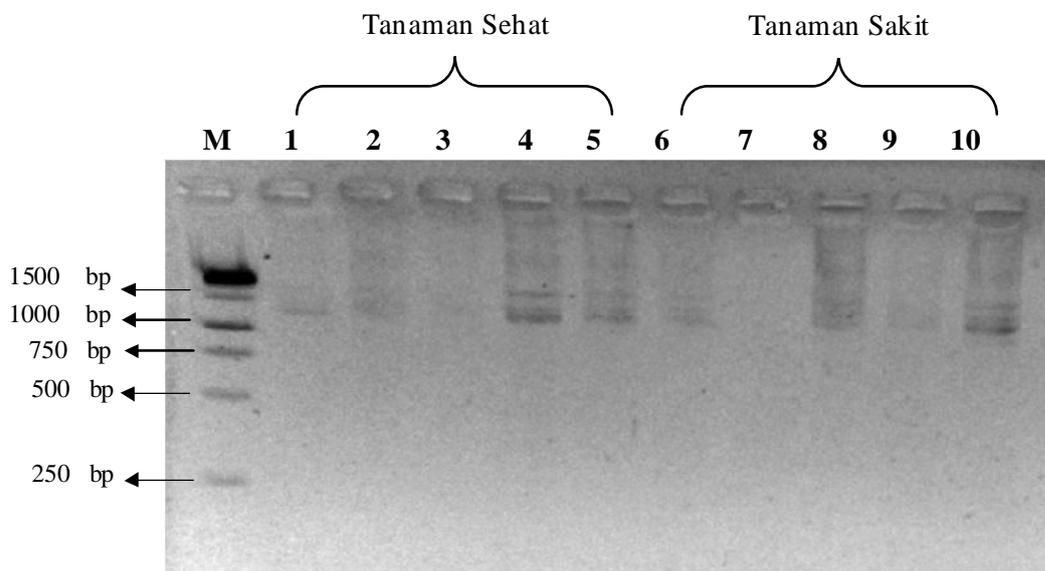
Sampel perakaran tanaman bawang putih yang diperoleh selanjutnya direndam selama satu malam. Selanjutnya, kultur bakteri pada media TSA dan suspensi hasil kultur kemudian diekstraksi menggunakan DNAMITE<sup>®</sup> kit.

### B. Hasil Analisis Komunitas Bakteri Rhizosfer dengan PCR-RISA

Hasil visualisasi DNA amplicon PCR\_RISA memperlihatkan adanya komunitas bakteri rizosfer pada semua sampel tanaman bawang putih (Gambar 4 dan 5). Hal ini sesuai dengan pernyataan Eliza et al. (2007) bahwa perakaran tanaman (rizosfer) merupakan bagian tanaman yang paling kaya akan mikroorganisme. Rizosfer dicirikan oleh lebih banyaknya kegiatan mikrobiologis dibandingkan kegiatan di dalam tanah yang jauh dari perakaran tanaman. Intensitas kegiatan semacam ini tergantung dari panjangnya jarak tempuh yang dicapai eksudasi oleh cairan yang keluar dari sistem perakaran. Istilah 'efek-rizosfer' menunjukkan pengaruh keseluruhan perakaran tanaman terhadap mikroorganisme tanah (Rao 2007).

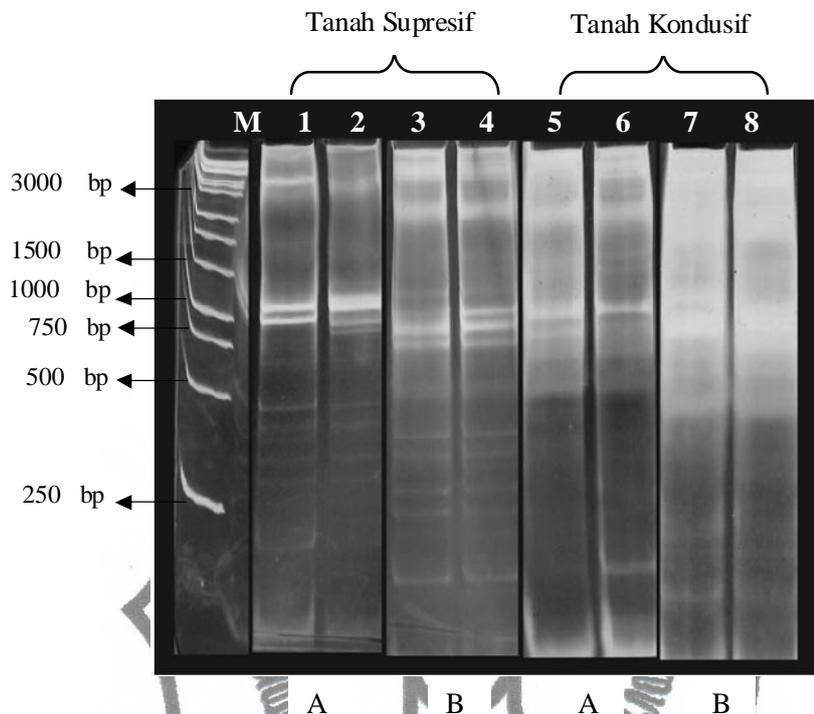


Gambar 4. Pola fragmen DNA bakteri rizhosfer pada tanah supresif melalui PCR-RISA dengan elektroforesis horizontal menggunakan gel agarose



Gambar 5. Pola fragmen DNA bakteri rizhosfer pada tanah kondusif melalui PCR-RISA dengan elektroforesis horizontal menggunakan gel agarose

Hasil analisis PCR RISA juga menunjukkan adanya keragaman komunitas bakteri yang berbeda pada masing-masing sampel tanaman (Gambar 5). Pola pita DNA bakteri rizosfer yang terlihat memiliki perbedaan baik dari segi tanah maupun kondisi tanamannya. Sampel tanaman pada tanah kondusif baik dalam kondisi sehat maupun sakit menunjukkan pola pita DNA yang lebih banyak dibandingkan pada tanah supresif. Hal ini sesuai dengan pendapat Nannipleri et al. (2003), bahwa tanah supresif sangat ditentukan oleh keragaman mikrob tanah. Dilihat dari kondisi tanamannya, pola pita DNA sampel tanaman sehat pada tanah supresif lebih banyak dari pada sampel tanaman sakit. Sedangkan pada tanah kondusif, pola pita DNA tanaman sakit lebih beragam dibandingkan tanaman sehat. Menurut Sudarma (2009), supresif berhubungan dengan tipe dan jumlah organisme yang ada di dalam tanah, pada tanaman yang sehat keragaman mikroba tanah lebih besar dari pada habitat tanaman sakit.



Gambar 6. Pola fragmen DNA bakteri rizhosfer pada tanah supresif dan kondusif melalui PCR-RISA dengan elektroforesis vertikal menggunakan poliakrilamid. A: sampel tanaman sehat, B: sampel tanaman sakit

Gambar 6 memperlihatkan bahwa jumlah pita terbanyak yang terbentuk dari hasil amplifikasi pada daerah *intergenic spacer* adalah pada kolom 7 dan 8, yang merupakan sampel tanaman bawang putih sakit yang berasal dari tanah kondusif, sedangkan keragaman bakteri terendah terdapat pada kolom 3 dan 4 yang merupakan sampel tanaman sakit pada tanah supresif. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan yang jelas antara struktur komunitas bakteri dari perakaran tanaman sehat dengan perakaran tanaman sakit.

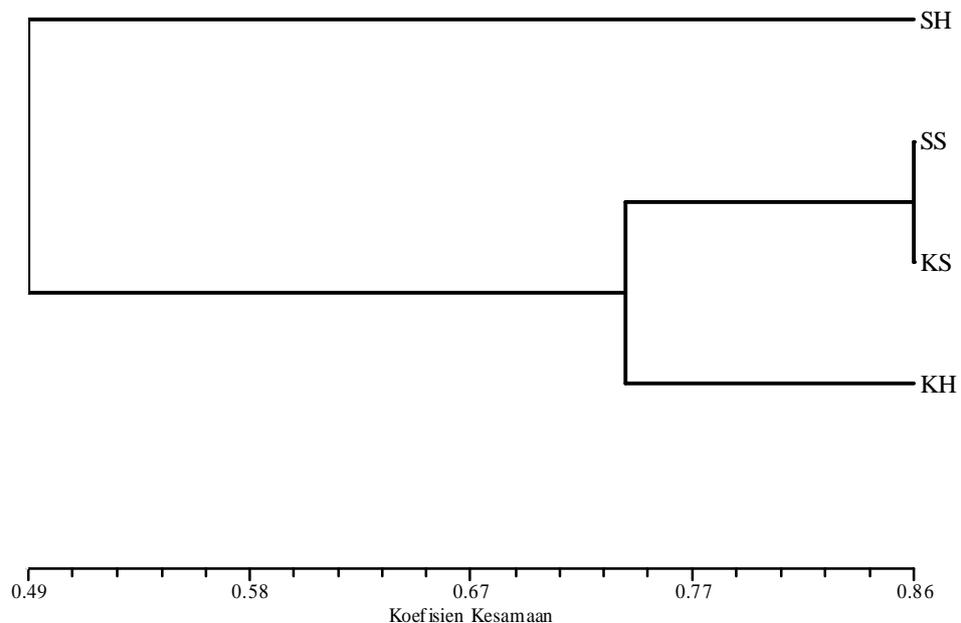
Perbedaan pola pita DNA antara sampel tanaman bawang putih pada tanah supresif dan kondusif juga bisa dilihat pada jumlah dan tebal tipisnya pita DNA yang terbentuk. Jumlah pita DNA sampel tanaman pada tanah kondusif lebih banyak dibandingkan sampel tanaman pada tanah supresif. Dilihat dari intensitas pita DNA yang terbentuk sampel tanaman pada tanah kondusif beberapa terlihat lebih tebal dibandingkan pola pita DNA sampel tanaman pada tanah supresif. Pola

pita DNA yang dominan diduga mengandung beberapa jenis bakteri yang terdapat di dalam komunitas bakteri tersebut. Hal ini sesuai pendapat Cahyani et al. (2007) bahwa pola pita DNA yang terlihat tebal menunjukkan adanya komunitas bakteri yang terdiri dari berbagai bakteri tanpa ada spesifik bakteri tertentu sebagai anggota yang dominan. Menurut Muyzer et al. (1993), intensitas pita DNA yang terbentuk ditentukan oleh banyaknya DNA *template* yang mencerminkan kelimpahan bakteri tersebut pada cuplikan.

Perbandingan jumlah pita yang tervisualisasi antara sampel tanah supresif dan tanah kondusif, mengindikasikan bahwa keragaman komunitas bakteri yang ada diduga memiliki peran yang berbeda-beda. Ada bakteri rizosfer yang bersifat antagonis terhadap patogen, dan ada juga yang berasosiasi negatif dengan tanaman yang dapat menyebabkan tanaman menjadi lebih rentan terhadap patogen. Barea et al. (2005) menyatakan bahwa di dalam tanah terdapat interaksi mikroba, seperti rizosfer merupakan tempat asosiasi mikroba dan hubungan tanaman-patogen serta kesatuan ini memberikan andil terhadap pengembangan dan aktivitas komunitas mikroba dalam tanah. Kloepper et al. (1999) juga menyebutkan bahwa, diantara kelompok organisme merupakan komponen asosiasi akar-bakteri, yang secara umum digolongkan dalam komunitas bakteri rizosfer.

Komunitas bakteri yang ada pada sampel tanah supresif secara umum diduga berperan sebagai salah satu faktor pembatas yang mampu menekan intensitas penyakit busuk pangkal yang disebabkan *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, sedangkan untuk sampel tanah kondusif secara umum diduga sebagai faktor pendorong yang mampu berasosiasi positif dengan patogen ini, sehingga dapat mengakibatkan perkembangan intensitas penyakit busuk pangkal. Menurut Hadiwiyono (2008), tanah supresif berhubungan dengan biomassa mikrob total dalam tanah yang berkompetisi dengan patogen terhadap sumber kebutuhan hidup atau menyebabkan penghambatan melalui antagonisme. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan Mazzola and Yu (2002), bahwa dalam tanah supresif, akar tanaman terlindungi oleh mikroba tanah dari serangan OPT.

Keragaman mikroba tanah dipengaruhi oleh tiga hal utama: (1) tipe tanaman yang merupakan penentu utama struktur dari komunitas mikroba dalam tanah, seperti tanaman penyedia utama karbon dan sumber energi, (2) tipe tanah merupakan penentu utama komunitas mikroba seperti kombinasi struktur dan tekstur tanah, bahan organik, stabilitas mikroagregat, pH dan keberadaan nutrisi utama seperti N, P dan Fe menentukan habitat dalam tanah, dan (3) cara mengelola pertanian yaitu rotasi tanaman, pengolahan tanah, herbisida, aplikasi pemupukan dan irigasi juga menentukan struktur komunitas mikroba dalam tanah (Nannipieri et al. 2003).



Keterangan: SH: Supresif sehat, SS: Supresif sakit, KH: Kondusif sehat, KS: Kondusif sakit

Gambar 7. Dendrogram-UPGMA berdasarkan pola fragmen DNA hasil PCR-RISA pada 4 sampel tanaman berumur 100 HST

Berdasarkan dendrogram (Gambar 7) menunjukkan adanya pengelompokan dari masing-masing sampel berdasarkan kondisi tanaman. Hasil ini menunjukkan bahwa struktur komunitas bakteri tanaman sehat berbeda dengan tanaman sakit.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. Kesimpulan

Berdasarkan pola pita DNA hasil analisis PCR-RISA menunjukkan bahwa:

1. Terdapat perbedaan komunitas bakteri rizosfer tanaman bawang putih pada tanah supresif dan tanah kondusif
2. Terdapat perbedaan komunitas bakteri rizosfer tanaman bawang putih sehat dan yang terserang busuk pangkal bawang putih
3. Komunitas bakteri rizosfer pada tanah kondusif cenderung berpotensi lebih beragam dibandingkan tanah supresif.

### B. Saran

Perlu dilakukan sequencing terhadap pita DNA teramplifikasi untuk mengetahui nama komunitas dan spesies bakteri rizosfer yang ada pada lahan yang diamati.