



**PEMETAAN KEBERADAAN BAKTERI PATOGEN TULAR
TANAH *Ralstonia solanacearum* DAN *Erwinia carotovora*
DI LAHAN TANAMAN TEMBAKAU PADA
ENAM KABUPATEN DI JAWA TIMUR**

SKRIPSI

Oleh
Derry Marhaendar Mayang
NIM 111510501001

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**PEMETAAN KEBERADAAN BAKTERI PATOGEN TULAR
TANAH *Ralstonia solanacearum* DAN *Erwinia carotovora*
DI LAHAN TANAMAN TEMBAKAU PADA
ENAM KABUPATEN DI JAWA TIMUR**

SKRIPSI

diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk menyelesaikan
Program Sarjana pada Program Studi Agroteknologi (S1)
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh
Derry Marhaendar Mayang
NIM 111510501001

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Derry Marhaendar Mayang

NIM : 111510501001

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: **Pemetaan Keberadaan Bakteri Patogen Tular Tanah *Ralstonia solanacearum* dan *Erwinia carotovora* di Lahan Tanaman Tembakau pada Enam Kabupaten di Jawa Timur** adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap dan etika ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 11 Agustus 2015
Yang menyatakan,

Derry Marhaendar Mayang
NIM. 111510501001

SKRIPSI

**PEMETAAN KEBERADAAN BAKTERI PATOGEN TULAR
TANAH *Ralstonia solanacearum* DAN *Erwinia carotovora*
DI LAHAN TANAMAN TEMBAKAU PADA
ENAM KABUPATEN DI JAWA TIMUR**

Oleh

**Derry Marhaendar Mayang
NIM 111510501001**

Pembimbing

Pembimbing Utama : Ir. Paniman Ashna Mihardjo, MP.
NIP. : 19500903 1980031 1 001

Pembimbing Anggota : Hardian Susilo Addy, SP., MP. Ph.D.
NIP. : 19801109 200501 1 001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “ **Pemetaan Keberadaan Bakteri Patogen Tular Tanah *Ralstonia solanacearum* dan *Erwinia carotovora* di Lahan Tanaman Tembakau pada Enam Kabupaten di Jawa Timur** ” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 11 Agustus 2015

tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Ir. Paniman Ashna Mihardjo, MP.
NIP. 19500903 198003 1 001

Hardian Susilo Addy, SP. MP. PhD.
NIP. 19801109 200501 1 001

Penguji,

Ir. Tatang Pranata, Dip.Agr
NIP. 19580316 198602 1 001

Mengesahkan
Dekan,

Dr. Ir. Jani Januar, MT.
NIP. 19590102 198803 1 002

RINGKASAN

Pemetaan Keberadaan Bakteri Patogen Tular Tanah *Ralstonia solanacearum* dan *Erwinia carotovora* di Lahan Tanaman Tembakau pada Enam Kabupaten di Jawa Timur. Derry Marhaendar Mayang. 111510501001. Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Tembakau merupakan salah satu komoditas non-pangan penting yang memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi. Namun produksi tembakau menghadapi berbagai kendala, salah satu yang menyebabkannya adanya penyakit dari patogen tular tanah. Beberapa patogen tular tanah yang berbahaya bagi tanaman tembakau yang berasal dari patogen bakteri *R. solanacearum* dan *E. carotovora*. Deteksi keberadaan patogen tular tanah dilakukan pada sentra tembakau kabupaten di Jawa Timur yaitu Jember, Bondowoso, Situbondo, Banyuwangi, Lumajang dan Probolinggo. Salah satu teknik yang telah banyak digunakan yaitu PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR merupakan salah satu teknik biologi molekuler untuk mendeteksi keberadaan patogen, mempercepat dan mempermudah pengamatan.

Metode pertama dilakukan dengan pengambilan sampel tanah dari enam kabupaten, tahap kedua dilakukan ekstraksi bakteri total tanah, tahap ketiga penghitungan populasi dan variasi koloni bakteri, tahap keempat ekstraksi DNA, dan dilakukan deteksi DNA menggunakan biologi molekuler teknik PCR. Deteksi keberadaan *R. solanacearum* menggunakan primer *fliC* dengan ukuran 400 bp dan *E. carotovora* menggunakan primer *Ecc312* dengan ukuran 312 bp. Selanjutnya pembuatan peta keberadaan patogen tular tanah bakteri.

Hasil populasi koloni bakteri total dan variasi, kondisi total mikroba bakteri di tanah tembakau dapat mengetahui kondisi tanah tembakau. Populasi koloni bakteri total serta variasi bakteri tanah yang paling rendah yakni pada lahan Demung dan Pakistaji. Populasi mikroba tanah yang berkurang menyebabkan tingginya patogen yang akan menyerang tanaman. Hasil PCR *R. solanacearum* terdeteksi lima lahan dari tiga kabupaten yaitu Kabupaten Situbondo (Bloro dan

Demung), Kabupaten Jember (Tanjungrejo), Kabupaten Probolinggo (Sumberejo), Kabupaten Banyuwangi (Pakistaji) dan *E. carotovora* terdeteksi satu lahan yaitu Kabupaten Jember (Tanjungrejo).



SUMMARY

Mapping of Soil-borne Pathogens of *Ralstonia solanacearum* and *Erwinia carotovora* in Tobacco Plant Fields at Six Regency In East Java. Derry Marhaendar Mayang. 111510501001. Agrotechnology study program, Faculty of Agriculture, University of Jember.

Tobacco is one of non-food crop that has high economical value. However, it face some problem during production. One of them is soil-borne pathogen including *Ralstonia solanacearum* and *Erwinia carotovora*. Detection of the presence of such pathogens was done from soil samples collected from six regencies of Jember, Situbondo, Bondowoso, Banyuwangi, Lumajang, and Probolinggo. One of the common technique in detection is *Polimerase Chain Reaction* (PCR), which is a molecular tool to detect the presence of pathogen and simplify the observation.

The first step was sample collection from six districts in East Java following by extraction of total bacteria from soil. The next step was calculating number and variation of bacterial colonies from soil. In addition, DNA extraction and detection of specific DNA fragment using molecular tool such as PCR was done to detect the specific DNA fragment from DNA extract from soil. The detection of presence of the specific DNA fragment of particular soil-borne pathogens were done using specific pair-primer such as *fliC* for *R. solanacearum* with suspected amplicon about 400 bp in length while primer *Ecc312* for *E. carotovora* with suspected amplicon about 312 bp in length. Finally, mapping of the presence detected-pathogens were done base-on detection results using Google map software.

According to total bacteria colonies and variations, the condition of total microbes especially bacteria in tobacco soil (plantation fields) were figured-out as result as soil condition in Bloro and Pakistaji which had low number of both population and variation of soil bacteria resulting low impact on disease development (caused by soil-borne pathogen). PCR results show that there were five areas (from 3 regencies) such as Bloro and Demung in Situbondo,

Tanjungrejo in Jember, Sumberejo in Probolinggo and Pakistaji in Banyuwangi showing infestation of *R. solanacearum* in soil. Interestingly, the only one area (Tanjungrejo in Jember) had both soil-borne pathogen (*R. solanacearum* and *E. carotovora*) infested in soil based on the detection using PCR technique.



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sholawat serta salam atas junjungan Nabi Muhammad SAW, sehingga penyusunan skripsi dengan judul Pemetaan Keberadaan Bakteri Patogen Tular Tanah *Ralstonia solanacearum* dan *Erwinia carotovora* di Lahan Tanaman Tembakau pada Enam Kabupaten di Jawa Timur dapat diselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) sebagai sarjana pertanian di Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Beberapa pihak turut membantu penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

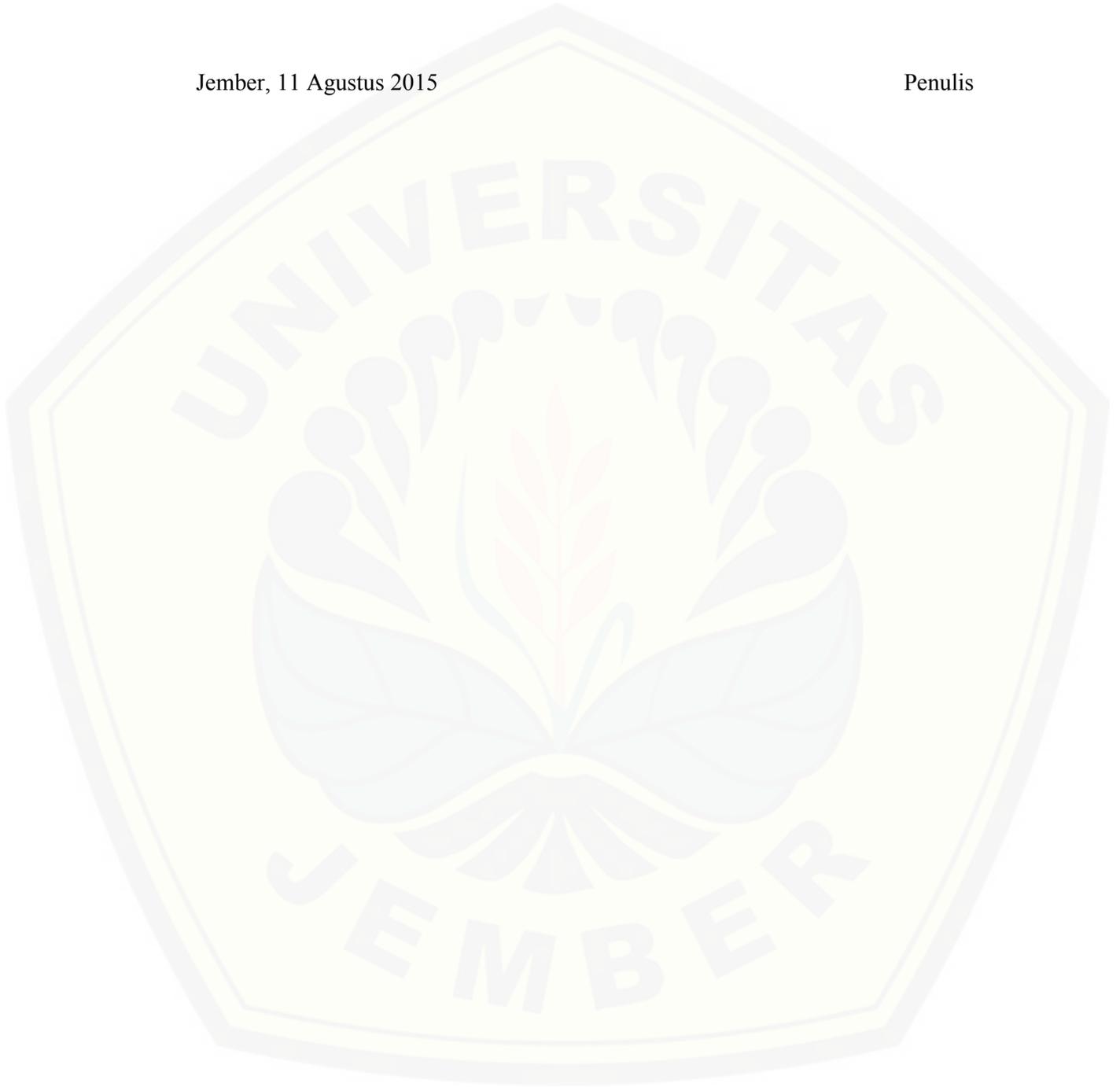
1. Dr. Ir. Jani Januar. MT. selaku Dekan Fakultas Pertanian
2. Ir. Paniman Ashna Mihardja, MP. selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU), Hardian Susilo Addy, SP.MP.Ph.D. selaku selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) dan Ir. Tatang Pranata, Dip.Agr. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, peningkatan wawasan, keterampilan, dan motivasi dalam pelaksanaan penelitian serta penyelesaian skripsi;
3. Ir. Raden Soedradjad, MT. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
4. Dinas Perindustrian dan Perdagangan Provinsi Jawa Timur yang telah mendanai proyek ini dan Ir. Syaifuddin Hasyim, MP. selaku Dosen Pembimbing lapang yang telah membimbing selama penelitian;
5. Prof. Dr. Bambang Sugiarto, M.Agr.Sc selaku Ketua CDAST yang telah membantu dan memberikan ijin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di CDAST;
6. Orangtua saya bapak Djoko Saptomo dan Ibu Sri Muyati, kakak saya Ratih Inggar Mayang dan Derra Marhaendar Mayang yang telah memberikan dukungan dan semangat sehingga proses penyelesaian skripsi dapat berjalan dengan lancar.

7. Serta semua pihak yang telah memberikan saran, kritik dan motivasi selanjutnya Universitas Jember.

Akhirnya penulis berharap semoga Karya Ilmiah (Skripsi) ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan dapat digunakan sebagai acuan penelitian-penelitian selanjutnya.

Jember, 11 Agustus 2015

Penulis

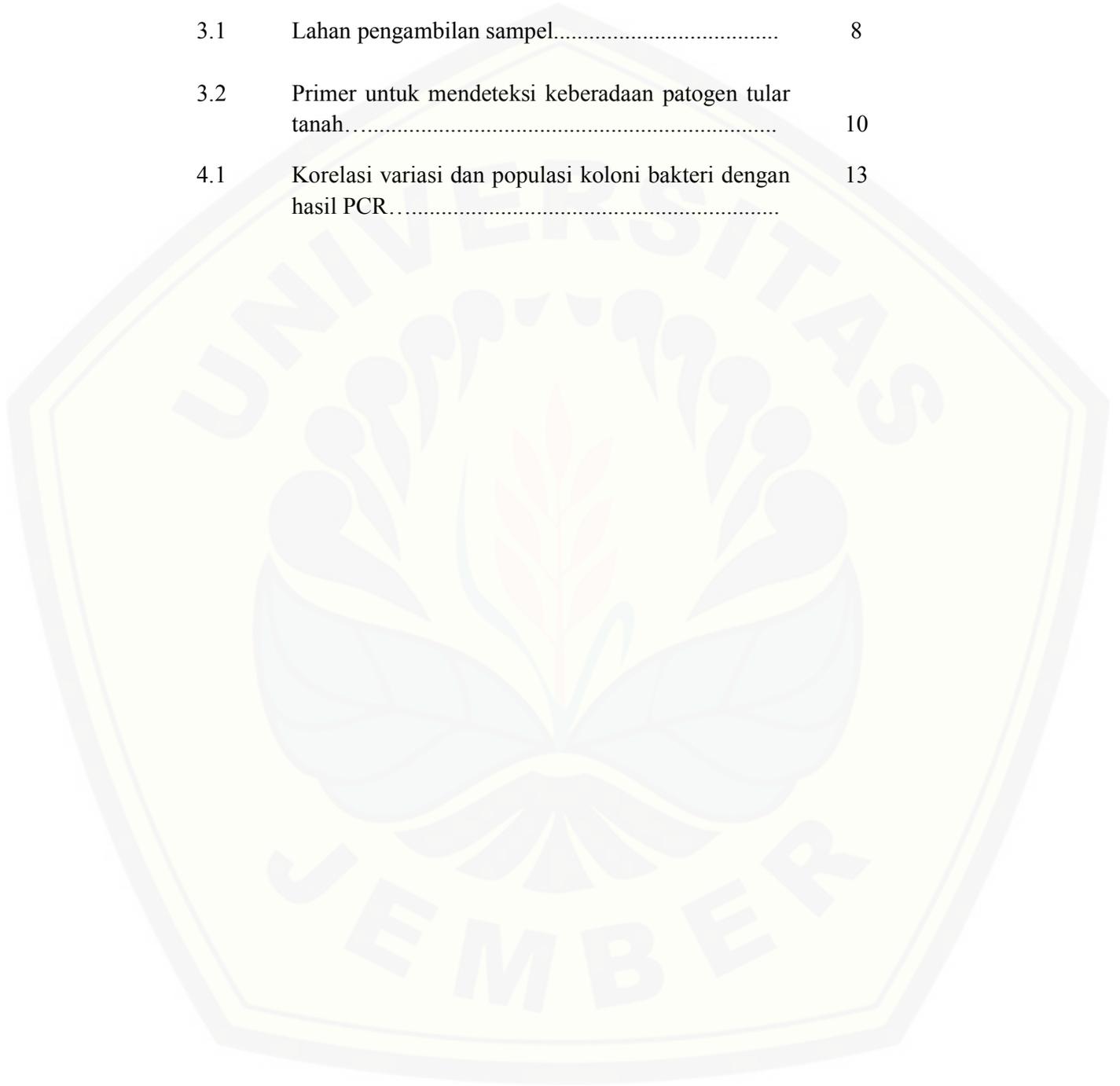


DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN.....	v
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Patogen Tular Tanah.....	3
2.2 Patogen <i>R. solanacearum</i>	3
2.3 Patogen <i>E. carotovora</i>	4
2.4 <i>Poymerase Chain Reaction</i> (PCR)	5
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	7
3.1 Bahan dan Alat	7
3.1.1 Bahan.....	7
3.1.2 Alat.....	7
3.2 Metode Penelitian	7
3.2.1 Sampling Tanah.....	7
3.2.2 Ekstraksi Bakteri dari Tanah	8
3.2.3 Menghitung Populasi Koloni Bakteri Total dalam Tanah .	9
3.2.4 Ekstraksi Total DNA Bakteri dalam Tanah	9
3.2.5 Deteksi Keberadaan Patogen Tular Tanah Bakteri dengan Teknik PCR.....	10
3.2.6 Pembuatan Peta Keberadaan Patogen Tular Tnah Bakteri.	11
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	12
4.1 Hasil	12
4.2 Pembahasan	15
BAB 5. KESIMPULAN DAN PENUTUP	18
5.1 Kesimpulan.....	18
5.2 Saran.....	18
DAFTAR PUSTAKA	19
LAMPIRAN	22

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
3.1	Lahan pengambilan sampel.....	8
3.2	Primer untuk mendeteksi keberadaan patogen tular tanah.....	10
4.1	Korelasi variasi dan populasi koloni bakteri dengan hasil PCR.....	13

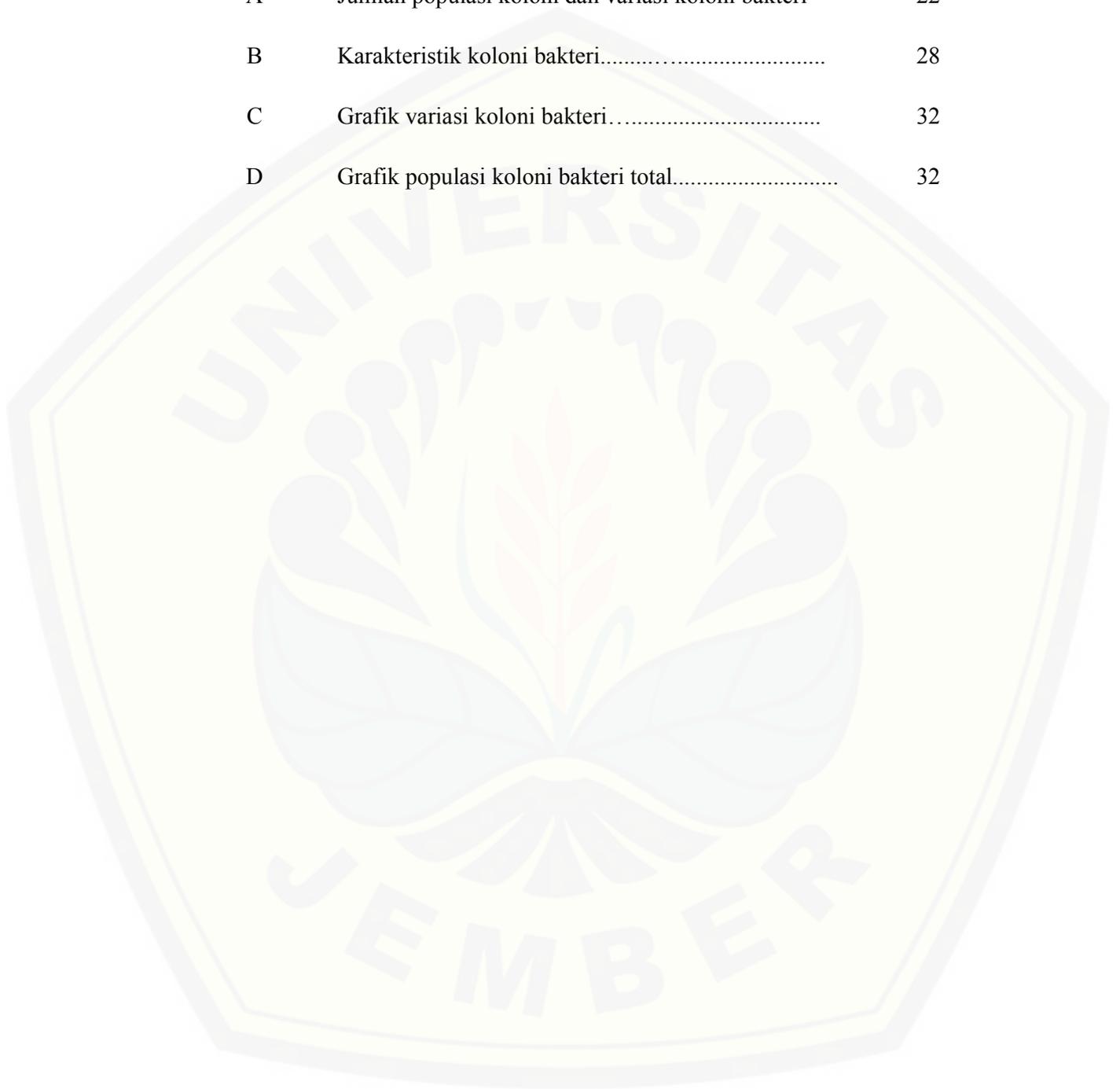


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
3.1	Denah Pengambilan sampel.....	8
4.1	Elektroforesis hasil PCR bakteri patogen tular tanah (A) <i>R. solanacearum</i> dan (B) <i>E. carotovora</i> pada 1 % gel agarose.....	12
4.2	Peta keberadaan patogen tular tanah <i>R. solanacearum</i> dan <i>E. carotovora</i>	14

DAFTAR LAMPIRAN

Gambar	Judul	Halaman
A	Jumlah populasi koloni dan variasi koloni bakteri	22
B	Karakteristik koloni bakteri.....	28
C	Grafik variasi koloni bakteri.....	32
D	Grafik populasi koloni bakteri total.....	32



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Tembakau merupakan salah satu komoditas non-pangan penting yang memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi. Produksi tembakau di Jawa Timur mencapai 56% (Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan Departemen Pertanian, 2012). Tembakau yang terkenal di Jawa Timur meliputi tembakau Madura, tembakau Besuki, tembakau Kasturi dan tembakau Paiton (Probolinggo) (Ratmawati, 2013). Tanaman tembakau ini merupakan tanaman yang dipanen daunnya yang digunakan sebagai bahan utama dalam industri rokok. Namun produksi tembakau menghadapi berbagai kendala, salah satu yang menyebabkannya adanya penyakit dari patogen tular tanah (Dinas Perkebunan dan Kehutanan Probolinggo, 2013).

Patogen tular tanah merupakan kelompok mikroorganisme yang sebagian siklus hidupnya berada di dalam tanah dan mempunyai kemampuan untuk menginfeksi dan menimbulkan penyakit pada tanaman yang memiliki kemampuan pemencaran dan bertahan dalam tanah sehingga dapat memencar ke areal yang lebih luas (Nurhayati, 2013). Beberapa patogen tular tanah yang berbahaya bagi tanaman tembakau yang berasal dari patogen bakteri yaitu *R. solanacearum* (Hidayah dan Djajadi, 2009). Yulianti (2010) juga melaporkan bahwa *R. solanacearum* dan *E. carotovora* telah menyebar ke hampir seluruh areal tembakau cerutu di Jember dan mengakibatkan kerugian 3,6–7,8 juta rupiah/ha. Oleh karena itu perlu mengetahui keberadaan serta sebaran dari kedua patogen tular tanah tersebut pada pertanaman tembakau terutama di wilayah sentra tembakau di Jawa Timur yakni Probolinggo, Lumajang, Situbondo, Bondowoso, Jember dan Banyuwangi.

Salah satu teknik yang telah banyak digunakan untuk mendeteksi keberadaan patogen, mempercepat dan mempermudah pengamatan yaitu dengan teknik biologi molekuler (Nurlaily, 2012). Sebagai contoh teknik molekuler yang digunakan untuk deteksi patogen adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Yung dan Chi-Chung (2000) mencontohkan deteksi patogen *R. solanacearum* dari dalam tanah dengan PCR menggunakan primer *BP4*. PCR patogen *E. carotovora*

dilakukan menggunakan primer *Ec001* pada tanaman kentang (Maitham dan Selman, 2013). Teknik PCR yang digunakan karena teknik ini telah banyak digunakan untuk melihat keanekaragaman hayati suatu kelompok organisme serta lebih cepat (Suryanto, 2003).

1.2 Perumusan Masalah

Bagaimana keberadaan patogen bakteri tular tanah *R. solanacearum* dan *E. carotovora* di lahan tanaman tembakau pada enam kabupaten di Jawa Timur yang dideteksi melalui pendekatan molekuler dengan teknik PCR?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan bakteri patogen tular tanah *R. solanacearum* dan *E. carotovora* di lahan tanaman tembakau pada enam kabupaten di Jawa Timur melalui pendekatan molekuler dengan teknik PCR. Hasil penelitian ini dapat bermanfaat sebagai sumber informasi tentang keberadaan bakteri patogen tular tanah *Ralstonia solanacearum* dan *Erwinia carotovora* di lahan tanaman tembakau pada enam kabupaten di Jawa Timur.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Patogen Tular Tanah

Garrett (1970) menyatakan patogen tular tanah (*soilborne pathogen*) berupa berbagai macam mikroorganisme seperti bakteri, nematoda, cendawan dan lainnya yang ada di tanah. Nurhayati (2013) menyatakan juga bahwa patogen tular tanah merupakan kelompok mikroorganisme yang sebagian siklus hidupnya berada di dalam tanah dan mempunyai kemampuan untuk menginfeksi dan menimbulkan penyakit pada tanaman. Patogen tular-tanah mampu hidup, menyebar, dan bertahan dalam jangka waktu lama di dalam tanah (Soesanto *et al.*, 2011). Kerugian yang disebabkan oleh patogen tular tanah bervariasi dari ringan sampai mengakibatkan serangan berat dimana tanaman tidak dapat berproduksi (Hidayah dan Djajadi. 2009). Patogen tular tanah yang telah diidentifikasi menyerang tanaman tembakau adalah dari jenis cendawan, bakteri, dan nematoda. Patogen-patogen tersebut menyerang tanaman pada berbagai stadia tumbuh dengan menimbulkan gejala yang berbeda-beda pada masing-masing tanaman (Hidayah dan Djajadi. 2009).

2.2 Patogen *Ralstonia solanacearum*

Semangun (2000), menyatakan bahwa *R. solanacearum* merupakan penyakit penting di Indonesia, selain sangat merugikan juga sangat sukar dikendalikan. Pada tahun 1864 penyakit ini diketahui di Sumatra yang merupakan penyakit tertua pada tembakau. Hidayah dan Djajadi (2009) menyatakan tanaman tembakau yang terinfeksi oleh *R. solanacearum* akan menunjukkan gejala layu pada salah satu sisi tanaman dan daunnya berwarna kekuningan. Dinas Perkebunan dan Kehutanan Probolinggo (2013) menyatakan bahwa serangan pada umbi menimbulkan gejala dari luar tampak bercak-bercak kehitam-hitaman, terdapat lelehan putih keruh (massa bakteri) yang keluar dari mata tunas atau ujung stolon. Yulianti (2010) menyatakan bahwa *R. solanacearum* strain tembakau dapat bertahan 6 bulan di dalam lapisan tanah tanpa ada vegetasi.

Penyebaran *R. solanacearum* sangat mudah menyebar, baik melalui benih, air, tanah, maupun serangga, sehingga sulit dikendalikan jika telah menjadi wabah (outbreak) (Dinas Perkebunan dan Kehutanan Probolinggo, 2013). Supriadi (2011) menyatakan *R. solanacearum* akan berkembang biak di dalam pembuluh kayu (xylem) dalam akar dan pangkal batang, kemudian menyebar ke seluruh bagian tanaman. Akibat tersumbatnya pembuluh kayu oleh jutaan sel *R. solanacearum*, transportasi air dan mineral dari tanah terhambat sehingga tanaman menjadi layu dan mati. Supriadi (2011) melaporkan juga penyebaran *R. solanacearum* dapat melalui benih, serangga vector, melalui tanah, air, alat pertanian. Morfologi dan fisiologi dari *R. solanacearum* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang dengan ukuran $0,5-0,7 \times 1,5-2,5 \mu\text{m}$, berflagela, bersifat aerobik, tidak berkapsula, serta membentuk koloni berlendir berwarna putih (Dinas Perkebunan dan Kehutanan Probolinggo, 2013). Beberapa faktor yang mempengaruhi sifat virulensi *R. solanacearum* di antaranya (1) peningkatan aktivitas PG (poligalakturonase) apabila bakteri berinteraksi dengan tanaman, (2) akumulasi EPS (ekstraseluler polisakarida) yang diatur oleh gen *hrp* juga berperan dalam mengimbas (menginduksi) tanggap hipersensitif pada tanaman yang kompatibel dan inkompatibel, dan (3) akumulasi enzim pendegradasi dinding sel tanaman (endoglukanase) yang berperan pada patogenisitas (Suryadi dan Machmud, 2002).

2.3 Patogen *Erwinia carotovora*

Dalmadiyo *et al.* (2004) menyatakan bahwa bakteri berkembang pada lahan bekas tanaman Cucurbitaceae, jagung, tebu, dan sayuran. Infeksi bakteri akan kurang berkembang apabila lahan yang digunakan untuk menanam tembakau yaitu bekas tanaman padi selama 2 tahun (Soeripno, 2001). Dalmadiyo *et al.* (2004) menyatakan bahwa bakteri ini masuk melalui luka akan terus berkembang dalam ruang antar sel serta menghasilkan enzim petinase yang dapat mencerna jaringan tanaman inang yang berakibat tanaman inang akan mengalami pembusukan. Semangun (2000) menyatakan bahwa empulur batang berwarna hitam membusuk dan akhirnya mengering sehingga batang menjadi berongga.

Arwianto dan Hartana (1999) menyatakan bahwa bakteri berkembang pada cuaca yang lembab dan basah. Bakteri mampu bertahan dalam tanah yang berat daripada tanah yang ringan.

Gejala penyakit *E carotovora* terjadi batang berlubang (*hollow stalk, top rot*) empulur batang membusuk sehingga berongga dan berbunyi khas. Empulur pada bidang potongan itu mengering dan mengendap, pada lekukan mengeluarkan air dan mengumpul sehingga terjadi pembusukan sehingga mudah berkembang bakteri – bakteri yang ada sehingga dapat menyerang tunas – tunas. Patogen ini juga dapat menyerang pada saat pembibitan yang sering disebut “*penyakit kaki hitam*” (Semangun, 2000). Sel bakteri berbentuk batang, dengan ukuran $(1,5 - 2,0) \times (0,6 - 0,9)$ mikron, umumnya membentuk rangkaian sel-sel seperti rantai, tidak mempunyai kapsul, dan tidak berspora. Bakteri bergerak dengan menggunakan flagela yang terdapat di sekeliling sel bakteri (flagela peritrik), serta bakteri bersifat Gram negatif (Semangun, 2000).

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Identifikasi patogen untuk mengetahui keragaman genetik perlu diketahui sebagai dasar pertimbangan dalam menyusun strategi pencegahan, perlindungan serta cara secara berkelanjutan. Identifikasi patogen tular tanah dapat dilakukan dengan menggunakan penanda morfologi, biokimia dan molekuler DNA misalnya dengan teknik PCR (Zulfahmi, 2013). Teknik PCR digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Zulfahmi (2013) menyatakan juga bahwa PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA cetakan dengan bantuan enzim DNA Polymerase dan primer dalam suatu thermocycler. Komponen – komponen yang digunakan untuk PCR antara lain template DNA, sepasang primer, nukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP) serta buffer reaksi yang mengandung MgCl, Enzim reverse transcription PCR dan alat yang digunakan untuk proses PCR yaitu thermocycler (Sulistyaningsih, 2007).

Penggunaan PCR pada patogen *R. solanacearum* telah dilakukan diantaranya oleh An Lee dan Chung Wang (2000) melaporkan bahwa desain spesifik primer dari *R. solanacearum* menggunakan primer *BP4* Pada patogen *E. carotovora* juga telah banyak diteliti dengan menggunakan primer yang beragam salah satunya seperti yang dilaporkan Maitham *et al.*, (2013) deteksi *E. carotovora* menggunakan primer *Ec001* F (5'-CGGTTACGATCAGCGTCTCG-3') dan R (5'-GATGTGCCGATGCCGATAC-3').



BAB 3. METODE PENELITIAN

Penelitian tentang “Pemetaan keberadaan bakteri patogen tular tanah *Ralstonia solanacearum* dan *Erwinia carotovora* di lahan tanaman tembakau pada enam di Jawa Timur“ dilaksanakan di lahan tembakau di enam kabupaten serta dilakukan uji laboratorium di CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember dengan waktu penelitian Oktober 2014 – Mei 2015.

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu sampel tanah, kantong plastik, kertas label, media NA, aquadest, alkohol, PCI, sodium asetat, etanol absolute, EtOH 70%, aquabidest, TE buffer, dua pasang primer PCR. buffer TBE, gel agrosa, ddH₂O, loading dye, dan ethidium bromide.

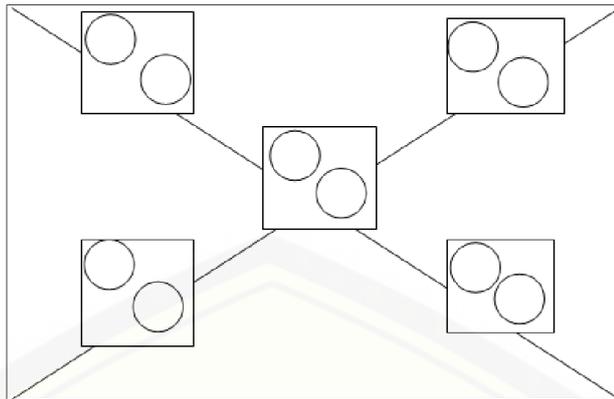
3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : cangkul/sekrop, cawan Petri, colony counter, eppendorf, micropipet, tube, elektroforesis chamber, kotak es, refrigator, mesin PCR, UV Gel Documentation System Major Science.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Sampling Tanah

Penelitian dilaksanakan menggunakan metode survei dengan mengambil sampel tanah. Setiap lokasi terpilih diambil 5 titik pengambilan sampel sesuai dengan luas lahan dengan menggunakan metode diagonal random sampling masing-masing diambil tanah ± 1 kg tiap titik pengambilan pada daerah dekat perakaran tanaman kedalaman ± 30 cm. Tanah sampel kemudian dimasukkan ke dalam tas plastik dan diletakkan dalam es box. Semua tanah sampel disimpan dalam refrigerator dengan suhu 4°C. Setiap kabupaten dilakukan pengambilan tanah pada tiga desa yang setiap tahun menanam tanaman tembakau.



Gambar 3.1. Denah pengambilan sampel secara diagonal

Tabel 3.1 lahan pengambilan sampel

Kabupaten	Wilayah I	Wilayah II	Wilayah III
Jember	Karangsono	Tutul	Tanjungrejo
Bondowoso	Maskuning Wetan	Maskuning Kulon	Patemon
Lumajang	Tekung	Besuk	Munder
Situbondo	Silomukti	Bloro	Demung
Banyuwangi	Kabat	Pakistaji	Karangbendo
Probolinggo	Sumberanyar	Karanganyar	Sumberejo

3.2.2 Ekstraksi Bakteri dari Tanah

Tanah sebanyak 5 gram diencerkan ke dalam air steril 50 ml, kemudian digojog dengan menggunakan shaker selama semalaman *over night*, kemudian dilakukan pengenceran berseri. Pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 ml suspensi dicampurkan ke aquades tabung reaksi sebanyak 9 ml. Pengenceran dilanjutkan hingga diperoleh seri pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-10} . Kemudian dipipet 100 μ l suspensi tanah dari pengenceran terakhir, memasukkannya dalam cawan Petri steril yang telah berisi NA padat, ratakan perlahan suspensi tanah hingga rata. Diinkubasikan selama 1-3 hari. Diamati pertumbuhan menggunakan mikroskop.

3.2.3 Menghitung Populasi Koloni Bakteri Total dalam Tanah

Penghitungan koloni bakteri dalam tanah dengan metode cawan hitung *plate count* dengan 5 gram tanah dari masing – masing contoh tanah dimasukkan dalam

50 ml agudes dalam tabung reaksi, kemudian digojog dengan menggunakan vortex, diperoleh seri pengenceran 10^{-1} . Pengenceran dilanjutkan hingga diperoleh seri pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-10} , kemudian dipipet 1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-10} , dimasukkan 100 μ l dalam cawan Petri yang telah berisi media NA. kemudian diratakan. Inkubasi dilakukan pada temperatur kamar (27°C sampai 28°C). Bakteri yang tumbuh kemudian dihitung jumlah populasi total bakteri dengan rumus yaitu

$$\text{CFU/ml/g} = \frac{\Sigma a}{b \times c \times d}$$

Keterangan :

a = jumlah koloni bakteri

b = tingkat pengenceran yang dilakukan (10^8 , 10^9 dan seterusnya)

c = volume suspensi yang digunakan (100 μ l atau 10^{-1} ml)

d = berat tanah yang diamati (5 gram)

3.2.4 Ekstraksi Total DNA Bakteri dalam Tanah

Tanah sebanyak 4 g dimasukkan ke media $\frac{1}{2}$ NB 40 ml dishaker selama 48 jam kemudian didiamkan selama 1 jam. Saring suspensi bakteri dengan kertas saring. Ambil 1,5 ml suspensi diletakkan pada ependorf sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, buang supernatan, ulangi kegiatan ini beberapa hingga didapat pelet bakteri yang tebal. Kemudian ditambah dengan TE buffer sebanyak 100 μ l panaskan pada suhu 100°C selama 5 menit, kemudian ditaruh di es selama 5 menit dan ditambahkan kembali TE buffer 400 μ l. ditambahkan PCI 500 μ l divortex, simpan di suhu -20°C selama 60 menit Kemudian sentrifuge selama 15 menit kecepatan 12.000 rpm. Diambil 400 μ l bagian atas supernatan dan ditambahkan 10% sodium asetat yaitu sebanyak 40 μ l digojog hingga homogen. Campuran ditambahkan $2,5 \times$ volume sampel dengan 97 % etanol absolute yaitu sebanyak 1000 μ l lalu diinkubasi selama 60 menit pada -20°C . campuran ini kemudian disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C . Dibuang supernatan dan ditambahkan EtOH 70% sebanyak 500 μ l. Sentrifuge selama 5 menit pada 12.000 rpm pada suhu 4°C . Dibuang supernatan kering anginkan tabung eppendorf. kemudian ditambahkan

100 µl TE buffer dicampur bahan hingga homogen kemudian ditambahkan RNase sebanyak 5 µl dicampur hingga homogen. Kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1% dengan bufer TBE. Setelah itu dimasukkan 7µl marker dan 2µl sampel DNA yang telah dicampur dengan 1µl sampel loading dye kedalam lubang sumur sampel. Arus listrik dialirkan 50 Volt selama 10 menit kemudian 100 Volt selama 30 menit. Gel kemudian direndam dalam bufer TBE yang mengandung etidium bromide selama 5-10 menit dan divisualisasi sinar ultraviolet dengan menggunakan alat UV Gel Documentation System Major Science. Visualisasi hasil elektroforesis DNA bakteri dilakukan melalui proses pewarnaan dengan *Ethidium Bromide* (EtBr). Molekul DNA tersebut dapat diketahui ukurannya dengan cara membandingkan posisi pita yang terbentuk dengan posisi pita marker DNA pada gel (Yuwono, 2005).

3.2.5 Deteksi Keberadaan Patogen Tular Tanah Bakteri dengan Teknik PCR

Tabel 3.2 Primer untuk mendeteksi keberadaan patogen tular tanah

Nama primer	Sekuensi	Target	Sumber
<i>R. solanacaerum</i>			
Primer <i>fliC</i> R	GGCGGCCTTCAGGGAGGTC	400 bp	Schenfold <i>et al.</i> , 2003
Primer <i>fliC</i> F	GAACGCCAACGGTGCGA ACT		
<i>E. carotovora</i>			
Primer <i>Ecc312</i> - R	GATGTGCCGATGCCGATAC	312 bp	Degefu <i>et al.</i> ,2009
Primer <i>Ecc312</i> -F	CGGTTACGATCAGCGTCTCG		

Campuran standar reaksi yang digunakan yaitu (30 µl) terdiri atas 12 µl ddH₂O, 1 µl Primer R, 1 µl Primer F, 1 µl Template DNA, 15 µl PCR mix (merk KAPPA). Amplikasi DNA dilakukan pada kondisi berikut : Predenaturasi suhu 94°C selama 5 menit, Denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, Annealing *R. solanacaerum* pada suhu 63°C selama 2 menit dan Annealing untuk *E. carotovora* 62°C selama 30 detik, Elongasi pada suhu 72°C selama 60 detik dan Final Elongasi pada suhu 72°C selama 10 menit dengan 25 -30 siklus.

Visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% dengan bufer 1x TBE. Setelah itu dimasukkan 2µl marker dan 5µl sampel DNA ke dalam

lubang sumur sampel. Arus listrik dialirkan 50 volt selama 10 menit kemudian 75 volt selama \pm 60 menit. Gel kemudian direndam dalam bufer TBE yang mengandung etidium bromide selama 5-10 menit dan divisualisasi sinar ultraviolet dengan menggunakan alat UV Gel Documentation System Major Science. Visualisasi hasil elektroforesis DNA bakteri dilakukan melalui proses pewarnaan dengan *Ethidium Bromide* (EtBr). Molekul DNA tersebut dapat diketahui ukurannya dengan cara membandingkan posisi pita yang terbentuk dengan posisi pita marker DNA pada gel (Yuwono, 2005).

3.2.6 Pembuatan Peta Keberadaan Patogen Tular Tanah Bakteri

Kegiatan pemetaan dengan mencari peta dari enam kabupaten yang diamati dengan menggunakan bantuan aplikasi google map dari Google.Inc. Menambahkan tanda lokasi yang diamati dan ditandai keberadaan bakteri patogen tular tanah masing – masing lokasi yang ditemukan dengan menentukan kordinat daerah yang tepat sehingga valid sesuai dengan keadaan sebenarnya.

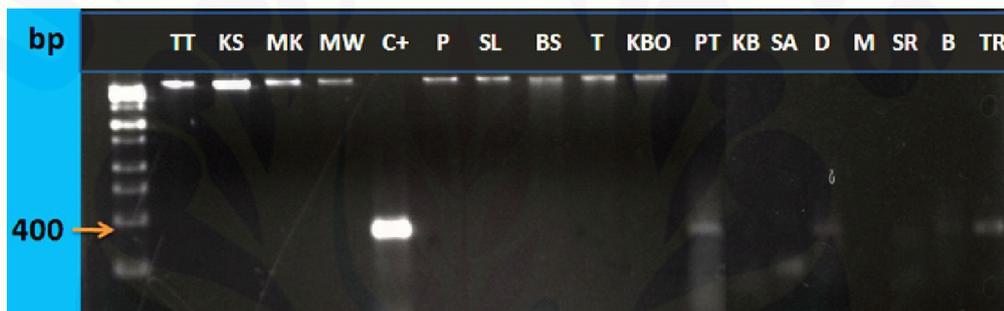
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil penelitian

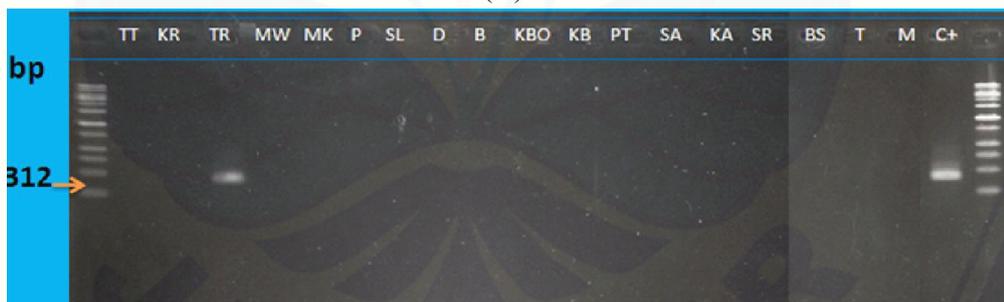
4.1.1 Ekstraksi Bakteri dari Tanah

Bakteri total yang tumbuh dapat diamati pada pengenceran 10^{-10} dengan pengamatan 24 jam setelah inkubasi. Penumbuhan bakteri ini ditujukan untuk mengetahui populasi total bakteri tanah tiap lahan tembakau yang diambil. Hasil isolasi bakteri total yang tumbuh di tanah tembakau, tumbuh berbagai macam bakteri. Bakteri yang tumbuh memiliki bentuk, ukuran, tipe, warna koloni yang berbeda-beda, Warna kuning keputihan, bentuk tidak beraturan, tepi halus, tampak samping cembung dan warna putih keruh, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung yang paling banyak muncul di setiap lahan.

Deteksi Keberadaan Patogen Tular Tanah Bakteri dengan Teknik PCR



(A)



(B)

Gambar 4.1 Elektroforesis hasil PCR bakteri patogen tular tanah (A) *R. solanacearum*, dan (B) hasil PCR *E. carotovora*

Identifikasi keberadaan fragmen DNA *R. solanacearum* dengan penyandi gen flagelin (*fliC*) menggunakan primer *fliC* yang spesifik untuk mendeteksi *R.*

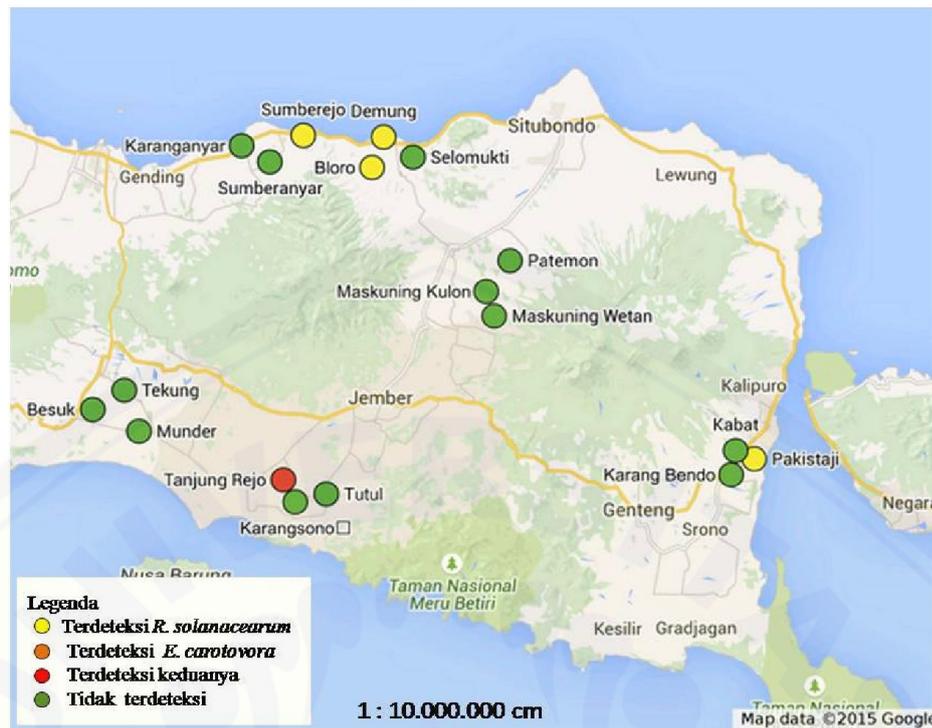
solanacearum (Jung *et al.*, 2007). Hasil PCR menunjukkan bahwa, hanya lima sampel bakteri yang memiliki fragmen *fliC* dengan ukuran 400 bp. Pada baris yang lain tidak ditemukan DNA dari *R. solanacearum* sehingga tidak dapat teramplifikasi oleh fragmen *fliC*. Identifikasi keberadaan fragmen DNA menggunakan *Ecc312* yang spesifik untuk mendeteksi *E. carotovora*. Hasil PCR (Gambar 4.1B) hanya satu sampel bakteri yang memiliki fragmen *Ecc312* dengan ukuran 312 bp. Baris yang lain tidak tampak karena amplicon pita DNA 312 bp tidak muncul.

Tabel 4.1 Korelasi variasi dan populasi koloni bakteri dengan hasil PCR

Kabupaten	Wilayah	Variasi Koloni	Populasi Koloni (CFU/ml/g)	PCR <i>R. solanacearum</i>	PCR <i>E. carotovora</i>
Jember	Karangsono	5	$9,2 \times 10^{11}$	Negatif	Negatif
	Tutul	5	$35,5 \times 10^{11}$	Negatif	Negatif
	Tanjungrejo	4	$13,2 \times 10^{11}$	Positif	Positif
Bondowoso	Maskuning	7	$12,2 \times 10^{11}$	Negatif	Negatif
	Wetan				
	Maskuning Kulon	3	32×10^{11}	Negatif	Negatif
Lumajang	Patemon	4	$23,4 \times 10^{11}$	Negatif	Negatif
	Tekung	4	24×10^{11}	Negatif	Negatif
	Besuk	4	$7,3 \times 10^{11}$	Negatif	Negatif
Situbondo	Munder	3	$6,4 \times 10^{11}$	Negatif	Negatif
	Silomukti	4	$26,4 \times 10^{11}$	Negatif	Negatif
	Bloro	4	$5,2 \times 10^{11}$	Positif	Negatif
Banyuwangi	Demung	3	$12,6 \times 10^{11}$	Positif	Negatif
	Kabat	7	$30,2 \times 10^{11}$	Negatif	Negatif
	Pakistaji	3	$16,4 \times 10^{11}$	Positif	Negatif
Probolinggo	Karangbendo	3	15×10^{11}	Negatif	Negatif
	Sumberanyar	5	$20,2 \times 10^{11}$	Negatif	Negatif
	Karanganyar	3	$19,4 \times 10^{11}$	Negatif	Negatif
	Sumberejo	4	$2,6 \times 10^{11}$	Positif	Negatif

Wilayah yang variasi dan jumlah populasi koloni yang relatif rendah terbukti terdeteksi *R. solanacearum* dan *E. carotovora* menggunakan teknik PCR. Yulianti (2009) menyatakan bahwa meningkatnya patogen tular tanah akibat menurunnya keragaman mikroba lainnya.

4.1.2 Pemetaan Keberadaan Patogen Tular Tanah



Gambar 4.2 Peta keberadaan patogen tular tanah *R. solanacearum* dan *E. carotovora*

Penyebaran patogen tular tanah *R. solanacearum* dan *E. carotovora* sangat cepat karena melalui air, tanah, alat pertanian dan terbawa benih serta serangga vektor yang masuk melalui luka (Supriadi, 2011).

4.2 Pembahasan

Keberadaan mikroba di dalam tanah dapat melihat kesuburan tanah tersebut. Semakin rendah populasi dan macam jenisnya maka dikatakan tanah tersebut mengalami kerusakan. Di dalam satu gram tanah yang subur, berkembang mikroorganisme yang jumlahnya dapat mencapai satu milyar sampai 10 milyar (Chauhan *et al.*, 2006 dalam (Hidayah dan Djajadi, 2009)). Hasil populasi bakteri total dan variasi dapat mengetahui mikroba bakteri yang ada di dalam tanah sehingga mengetahui kondisi tanah tembakau. Tanah yang diolah dan ditanami secara intensif selama bertahun-tahun, maka populasi dan jenis mikroba tersebut

menurun drastis, sedangkan jenis dan populasi mikroba patogen tanaman cenderung meningkat (Yulianti, 2009).

Populasi bakteri total serta variasi bakteri tanah yang paling rendah yakni pada lahan Bloro dan Pakistaji yang dapat dikatakan lahan tersebut termasuk tanah yang tidak sehat dari segi biologi karena jumlah dan variasi mikroba yang ada di tanah sedikit. Kerusakan biologi karena kurangnya bahan organik mengakibatkan mikroba tanah pun berkurang. Bahan organik yang kurang dapat menambah patogen yang akan menyerang tanaman.

Lebih lanjut, untuk memastikan keberadaan dari kedua patogen tular tanah *R. solanacearum* dan *E. carotovora* dengan teknik PCR. Hal di atas terbukti pada lima lahan terdeteksi pita DNA *R. solanacearum* (Gambar 4.1A), faktor dugaan yang menyebabkan terdeteksinya patogen *R. solanacearum* diantaranya lahan tersebut belum pernah ditambah bahan organik dengan cara pemupukan dan hampir tiap tahun ditanami tembakau. Pada tanah-tanah dengan kadar bahan organik rendah (0,63%) ditemukan lebih banyak infeksi penyakit, dan lebih tinggi adanya gejala serangan *R. solanacearum* (Hidayah dan Djajadi, 2009). Hal tersebut juga sesuai dengan Yulianti (2009) bahwa lahan yang ditanami dengan jenis tanaman yang sama cenderung rentan terhadap penyakit-penyakit tular tanah yang terakumulasi dari waktu ke waktu sehingga menimbulkan ledakan populasi yang besar. Hara dan Ono (1985) menyatakan bahwa *R. solanacearum* strain tembakau mampu bertahan 6 bulan di dalam lapisan tanah tanpa ada vegetasi. Kondisi fisik tanah yang termasuk lempung berpasir mempengaruhi perkembangan patogen *R. solanacearum* hal ini diungkapkan oleh Hidayah dan Djajadi (2009) tanah lempung berpasir mendukung perkembangan *R. solanacearum* karena termasuk bakteri aerob yang membutuhkan oksigen dalam respirasinya sehingga dapat berkembang dengan baik pada lingkungan yang aerasinya baik. Beberapa lahan tidak terdeteksi keberadaan *R. solanacearum* hal ini dikarenakan templat DNA bakteri hanya sedikit atau tidak ditemukan DNA *R. solanacearum*. Deteksi *R. solanacearum* yang berasal dari tanah dan air sulit karena jumlahnya $<10^4$ CFU/g tanah atau ml air dan bakteri saprofit lebih banyak (Seleim *et al.*, 2014). Supriadi dan Machmud (2002), menyatakan bahwa deteksi

R. solanacearum pada tanah masih menjadi kendala, oleh karena itu sangat diperlukan suatu metode ekstraksi yang tepat untuk deteksi yang akurat pada *R. solanacearum* dari tanah. Menurut Schonfeld *et al.* (2003) bahwa amplifikasi PCR *R. solanacearum* primer *Rsol_fliC* dari tanah memungkinkan untuk mendeteksi sekitar satu molekul DNA target per PCR yang setara dengan 10^3 CFU/g tanah.

Hasil PCR hampir kebanyakan wilayah tidak ditemukan keberadaan *E. carotovora* hal yang sama juga terjadi pada pengamatan di lapang tidak ditemukan gejala *E. carotovora*. Keberadaan *E. carotovora* yang terdeteksi hanya pada daerah Jember yaitu Tanjungrejo (Gambar 4.1B). Menurut Hyman *et al.* (1997) bahwa batas deteksi adalah 100 fg/ml DNA dengan menggunakan PCR konvensional. Hasil wawancara yaitu pada lahan Tanjungrejo tiap tahun ditanami tembakau, pemupukan menggunakan anorganik hal tersebut yang memicu berkembangnya patogen *E. carotovora*. Tanaman pada bekas tanaman inang sangat berisiko terjadi peledakan *E. carotovora* (Disbun Jawa Timur, 2011). Jember mengalami serangan *E. carotovora* yang telah menyebar ke hampir seluruh areal tembakau cerutu dan mengakibatkan kerugian 3,6–7,8 juta rupiah/ha pada tahun 1999 (Yulianti, 2010).

Pengamatan jumlah variasi koloni dan jumlah populasi bakteri Kabupaten Situbondo (Bloro) dan Kabupaten Banyuwangi (Pakistaji) variasi dan jumlah koloni bakteri rendah dan kedua wilayah tersebut terdeteksi *R. solanacearum* dengan teknik PCR (Tabel 4.1). Kabupaten Banyuwangi (Kabat) dan Kabupaten Jember (Tutul) variasi dan jumlah bakteri relatif beragam dalam jumlah populasi banyak tidak terdeteksi keberadaan *R. solanacearum* (Tabel 4.1). Hal ini diperkuat oleh Yulianti (2010) bahwa terjadinya suatu penyakit yang disebabkan oleh patogen tular tanah adalah akibat menurunnya keanekaragaman hayati dalam tanah.

Lahan Tanjungrejo merupakan lahan yang dimana ditemukan kedua penyakit patogen tular tanah, sehingga perlu dilakukan perbaikan kondisi tanah dengan rotasi tanaman, pemilihan bibit yang sehat dan varietas tahan, pemupukan organik dan pengendalian dengan agen hayati (Yulianti, 2009).

Berdasarkan peta sebaran *R. solanacearum* dan *E. carotovora* (Gambar 4.2) dan karakteristik patogen mudah menyebar ke daerah lain, perlu upaya pencegahan agar daerah sekitar tidak terinfeksi. Dalam proses infeksi pada tanaman tanpa adanya pelukaan, populasi bakteri *R. solanacearum* minimal yang diperlukan untuk menginfeksi tanaman sebanyak 5000 sel bakteri per ml (Suryadi dan Machmud, 2002), sedangkan untuk *E. carotovora* dapat menginfeksi tanaman antara $10^3 - 10^8$ CFU per tanaman (Rahimian dan Mitchell, 1984). Penyebaran patogen tular tanah melalui air, serangga, nematoda, angin atau hewan lainnya masuk ke dalam lubang alami tembakau (Dalmadiyo *et al.* 2004). (Arwiyanto dan Hartana 1999 dalam (Addy, 2007)) menyatakan bakteri *E. carotovora* merupakan patogen tular tanah yang sulit dikendalikan secara kimiawi dan penyebarannya sangat cepat. Pencegahan yang dilakukan dengan memperbaiki kesuburan lahan. Hermanto dan Setyawan (2002) menyatakan bahwa sebaran dan perkembangan penyakit di lapangan dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan sifat genetik pendukung ketahanan tanaman. Maka dari itu keadaan kesehatan lahan perlu diperbaiki guna mencegah penyebaran penyakit yang lebih luas.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Keberadaan bakteri *R. solanacearum* dan *E. carotovora* dapat terdeteksi dengan menggunakan biologi molekuler teknik PCR.
2. Keberadaan *R. solanacearum* terdeteksi pada lima lahan yaitu Kabupaten Situbondo (Desa Bloro dan Desa Demung), Kabupaten Jember (Desa Tanjungrejo), Kabupaten Probolinggo (Desa Sumberejo), Kabupaten Banyuwangi (Desa Pakistaji) sedangkan *E. carotovora* terdeteksi pada lahan Kabupaten Jember (Desa Tanjungrejo). Pada Kabupaten Jember (Desa Tanjungrejo) terdeteksi kedua patogen tular tanah.

5.2 Saran

Karakteristik patogen tular tanah yang mudah menyebar maka daerah di sekitar daerah terdeteksi *R. solanacearum* dan *E. carotovora* dilakukan pencegahan agar patogen tidak meluas.

DAFTAR PUSTAKA

- Addy, H.S. 2007. Pengaruh sumber mineral terhadap penekanan *Erwinia carotovora* oleh pseudomonas pendar-fluor secara in vitro. *J. Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*7(2):117-124.
- Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan Surabaya. 2013. *Data Laporan Bulanan Kabupaten Probolinggo*. BBPPTP Surabaya.
- Degefu, Y.E., Virtanen, and T. Vayrynen. 2009. Pre-PCR processes in the molecular detection of blackleg and soft rot erwiniae in seed potatoes. *Journal of Phytopathology.*, 157: 370- 378.
- Dinas Perkebunan dan Kehutanan Probolinggo. 2013. *Mengenal Lebih Dekat Penyakit Layu Bakteri Ralstonia solanacearum pada Tembakau*. Probolinggo.
- Dinas Perkebunan Jawa Timur. 2011. *Panduan Budidaya Tembakau Besuki Na-Oogst*. Surabaya.
- Farid, M.M. 2013. Deteksi Isolat Patogen Hawar Bakteri Pada Kedelai Asal Jember dengan Teknik Polymerase Chain Reaction. *Skripsi*. Fakultas Pertanian. Univeristas Jember.
- Fatatik, N.A. 2015. Isolasi dan Karakteristik Bakteriofag yang Menginfeksi Bakteri Ralstonia solanacearum pada Pisang Asal Kabupaten Lumajang *Skripsi*. Fakultas Pertanian. Univeristas Jember.
- Hara, H. and K. Ono. 1985. Ecological studies on the bacterial wilt of tobacco caused by *Pseudomonas solanacearum* EF Smith: VI. dissemination in infected field and survival on tobacco leaf of the pathogen exuded from the upper part of infected tobacco plants. *Bulletin Okayama Tobacco Experimental* 44: 87-92.
- Hermanto, C. dan T. Setyawan. 2002. Pola sebaran dan perkembangan penyakit layu fusarium pada pisang tanduk, rajasere, kepok, dan barangan. *J. Hort.* 12(1):64-70.
- Hidayah, N., dan Djajadi. 2009. Sifat – sifat tanah yang mempengaruhi perkembangan patogen tular tanah pada tanaman tembakau. *Perspektif* 8(2): 74-83.

- Hyman, L.J., Dewasmes, V. Toth, and I.K. Perombelon. 1997. Improve PCR detection sensitivity of *Erwinia carotovora* subsp. *antroseptica* in potato tubes peel extract by prior enrichment on a selective medium. *Letters in Applied Microbiology* 25(2):143-147.
- Jung, K.M., M.H. Lee., J.K. Shim, S.T. Seo, R. Shrestha, M.S. Cho, J.H. Han, and D.S. Park. 2007. PCR-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* by amplication of cytochrome c1 signal peptide sequences. *J. Microbio Biotechnol* 17(11):1765-1771.
- Kartini, E., A.L. Abadi, dan L.Q. Aini. 2009. Pengembangan bio-bakterisida yang memanfaatkan bahan aktif bakteri endofit potensial antagonis untuk mengendalikan *Erwinia* sp., di umbi kentang. *Jurnal HPT* 2(4):63-70.
- Maitham, J., dan S.D. Ehab. 2013. Detection of *Erwinia* isolates causing diseases in potato by using DNA amplication by polymerase chain reaction technique (PCR). *Journal of Al-Nahrain University* 16(3):224-229.
- Mukaromah. 2013. *Karakteristik Penyebab Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau di Probolinggo*. Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan Departemen Pertanian.
- Nurhayati. 2013. Tanah dan Perkembangan Patogen Tular Tanah. *Prosiding Seminar Nasional 2013 MKTI*. Palembang.
- Nurilaily. 2012. Penggunaan Penanda Molekuler untuk Mempercepat dan Mempermudah Perbaikan Kualitas Tanaman Teh (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze). *Seminar*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Rahimian, M.K. and J.E. Mitchell. 1984. Population dynamics of *E. carotovora* pv. *carotovora* in potato stems. *Phytopathology* 74(2): 217-220.
- Ratmawati, I. 2013. Mengenal Lebih Dekat Penyakit Layu Bakteri *Ralstonia solanacearum* pada Tembakau. Dinas Perkebunan dan Kehutanan Probolinggo.
- Schenfold, J. H., Hever. J.D, Van Elsas and K. Smalla. 2003. Specific and sensitive detection of *R. solanacearum* in soil on the basis of PCR amplication of *fliC* fragments. *Appl Environ Microbial* 69(12):7248-7256.
- Seleim, M.A.A., K.A. Abo-Elyousar, K.M.A. Moneem, and F.A.Saed. 2014. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* biovar 2 race 1 on tomato in egypt. *Plant Pathol.* 30(3) : 299 – 303.

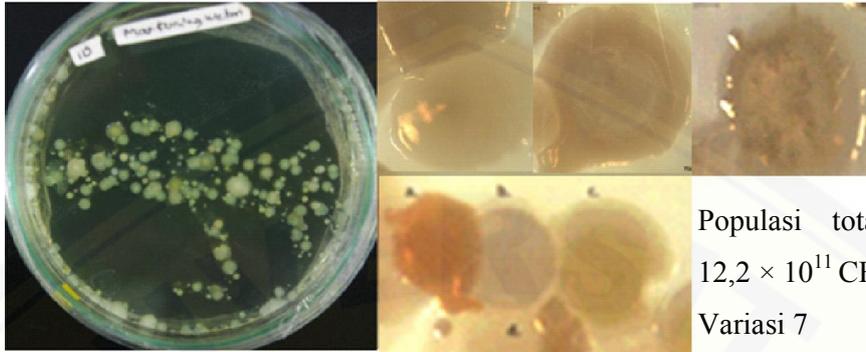
- Semangun, H. 2000. *Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Sudarma, I., D.N. Suprpta, I.M. Sudana, dan I.G. Temaja. 2012. Aplikasi polymerase chain reaction-ribosomal intergenic spacer analysis (PCR-RISA) untuk menentukan keragaman mikroba tanah pada habitat tanaman pisang dengan dan tanpa gejala layu fusarium. *Bumi Lestari*. 12 (2) : 313 – 320.
- Sulistyaningsih, E. 2007. Polymerase chain reaction (PCR): era baru diagnosis dan manajemen penyakit infeksi. *Biomedis* 1(1): 17-25.
- Supriadi. 2011. Penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*): dampak, bioekologi, dan peranan teknologi pengendaliannya. *Pengembangan Inovasi Pertanian*,4(4): 279 – 293.
- Suryadi, Y. dan M. Machmud. 2002. Keragaman genetik *Ralstonia solanacearum* berdasarkan karakterisasi menggunakan teknik berbasis asam nukleat. *Buletin Agrobio* 5(2):59-66.
- Soesanto, L., E. Mugiastuti, dan R.F. Rahayuniati. 2011. Inventarisasi dan identifikasi patogen tular-tanah pada pertanaman kentang di kabupaten purbalingga. *Jurnal Hortikultura* 21(3) : 254-264.
- UPT Penerbitan. 2011. *Pedoman Penulisan Karya Ilmiah Universitas Jember Edisi Ketiga*. Universitas Jember Press.
- Yulianti, T. 2009. Pengelolaan patogen tular tanah untuk mengembalikan kejayaan tembakau temanggung di kabupaten temanggung. *Perspektif* 8(1): 1-16.
- Yulianti, T. 2010. Bahan organik: perannya dalam pengelolaan kesehatan tanah dan pengendalian patogen tular tanah menuju pertanian tembakau organik. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri* (2)1: 26 – 32.
- Yung, A.L., and C.C. Wang. 2000. The design of specific primers of the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. *Bot Bull Acad Sin* 41:121-128.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.
- Zulfahmi. 2013. Penanda DNA untuk analisis genetik tanaman. *Agroteknologi* (3): 41-52.

LAMPIRAN

A. Jumlah populasi koloni dan variasi koloni bakteri

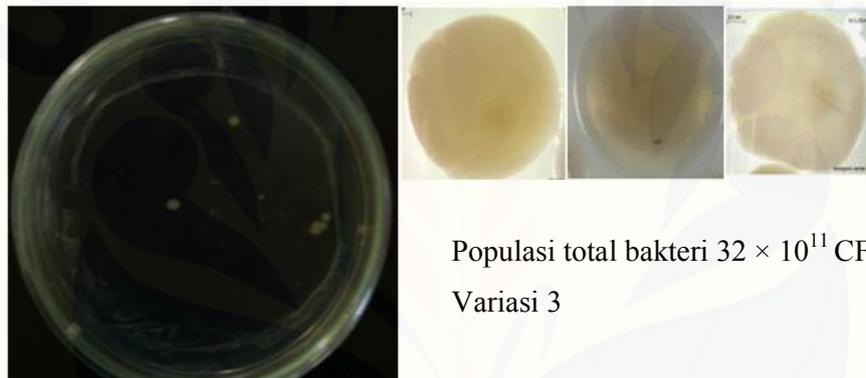
BONDOWOSO

1. Maskuning wetan



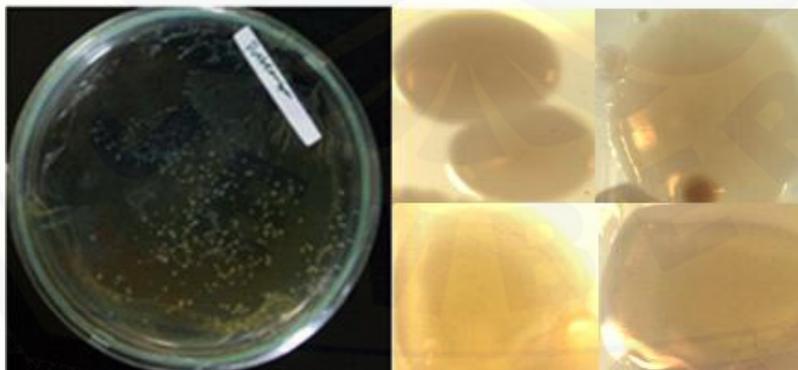
Populasi total bakteri
 $12,2 \times 10^{11}$ CFU/ml/g
Variasi 7

2. Maskuning kulon



Populasi total bakteri 32×10^{11} CFU/ml/g
Variasi 3

3. Patemon



Populasi total bakteri
 $23,4 \times 10^{11}$ CFU/ml/g
Variasi 3

SITUBONDO

1. Bloro



Populasi total bakteri
 $5,2 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 4

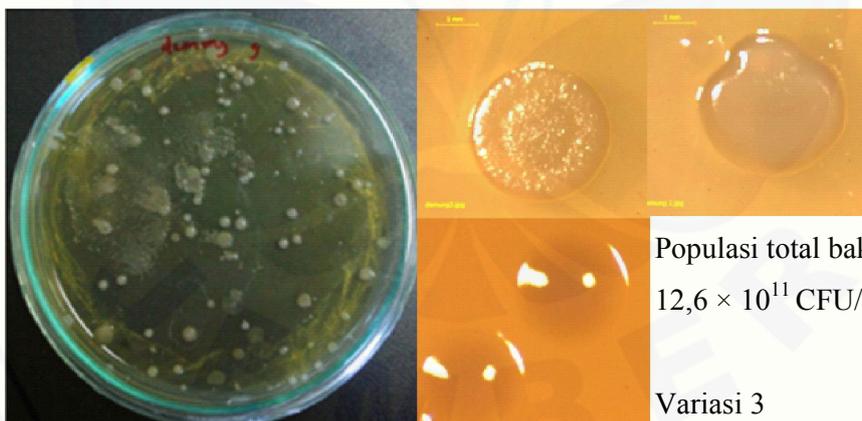
2. Silomukti



Populasi total bakteri
 $26,4 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 4

3. Demung

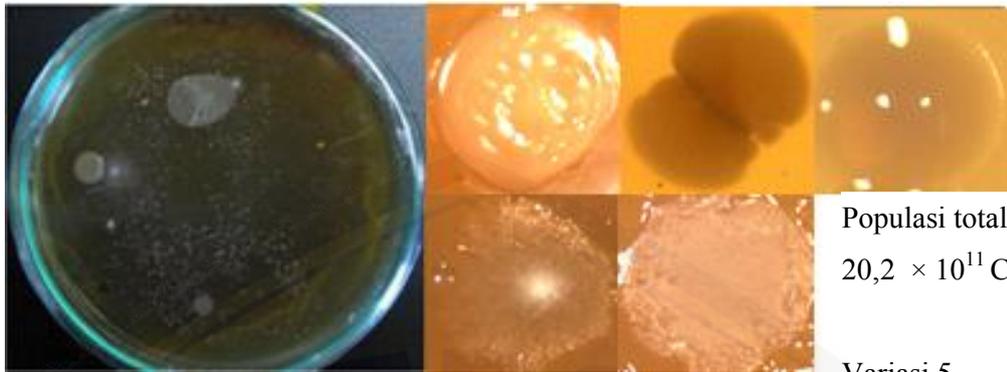


Populasi total bakteri
 $12,6 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 3

PROBOLINGGO

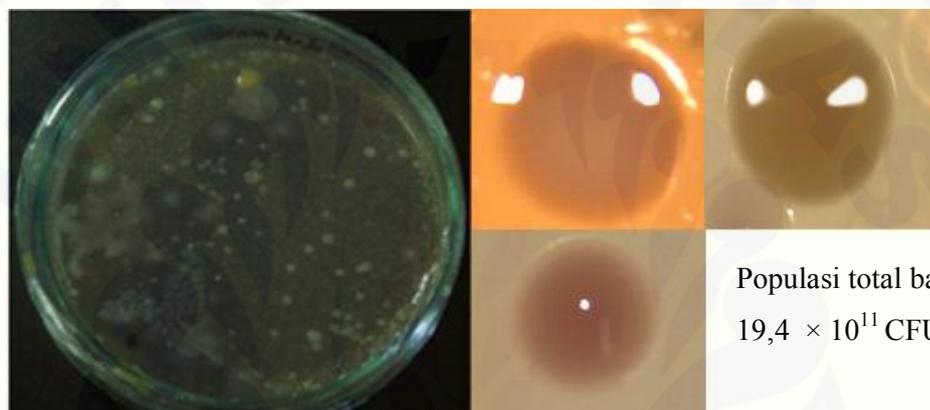
1. Sumberanyar



Populasi total bakteri
 $20,2 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 5

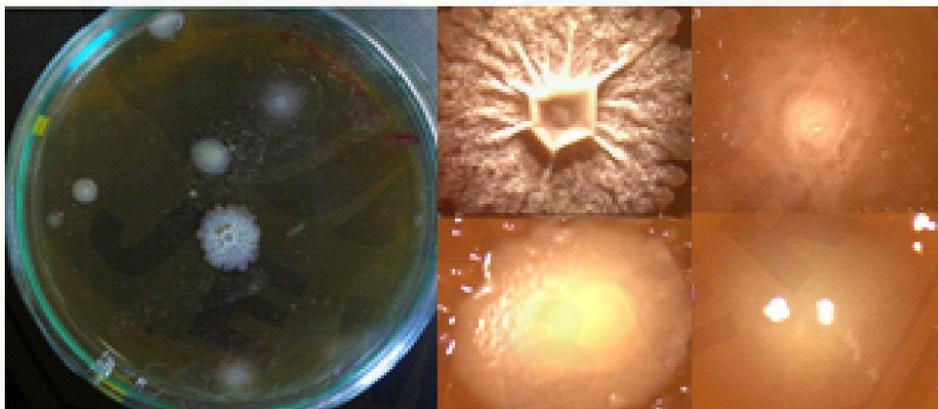
2. Karanganyar



Populasi total bakteri
 $19,4 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 3

3. Sumberejo

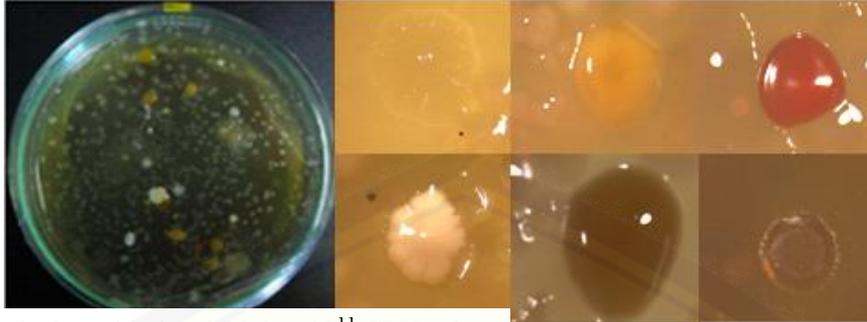


Populasi total bakteri $2,6 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 4

BANYUWANGI

1. Kabat



Populasi total bakteri $30,2 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 7

2. Karangbendo



Populasi total bakteri 15×10^{11} CFU/ml/g

Variasi 3

3. Pakistaji

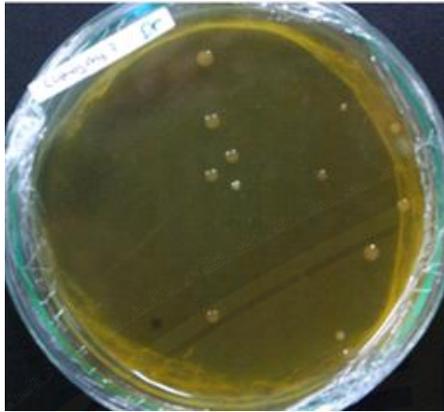


Populasi total bakteri
 $16,4 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 3

LUMAJANG

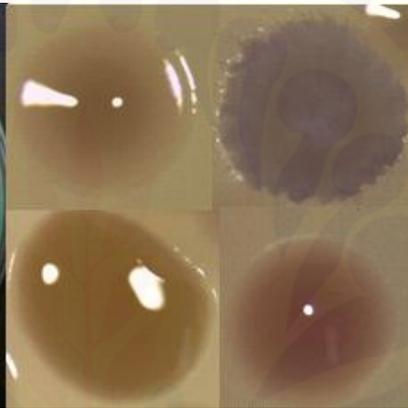
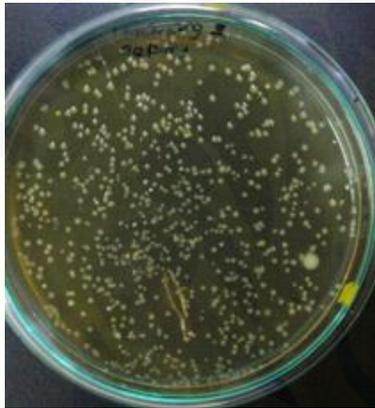
1. Munder



Populasi total bakteri
 $6,4 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 3

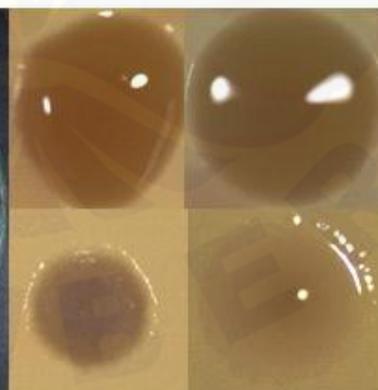
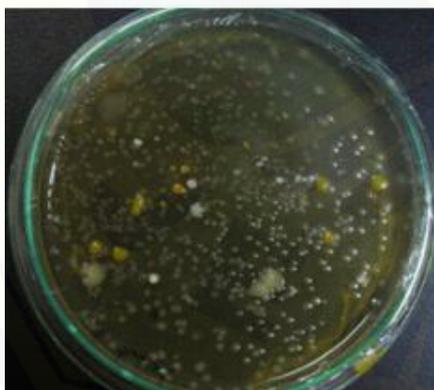
2. Tekung



Populasi total bakteri
 24×10^{11} CFU/ml/g

Variasi 4

3. Besuk

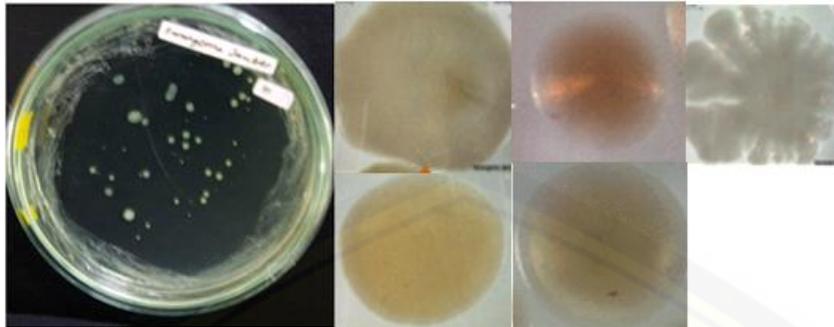


Populasi total bakteri
 $7,3 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 4

JEMBER

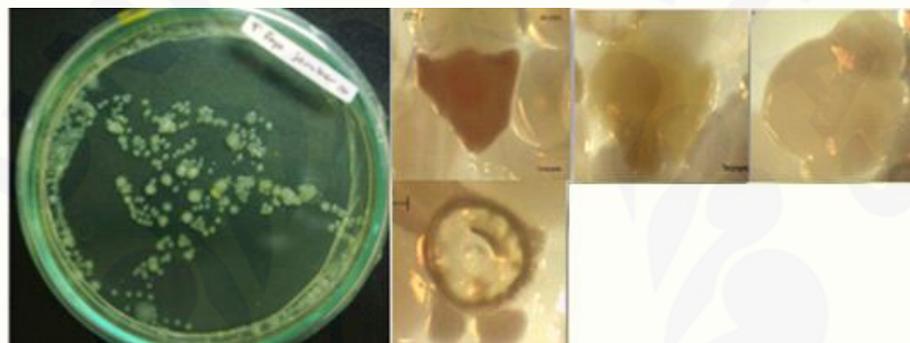
1. Karangsono



Populasi total bakteri $9,2 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 5

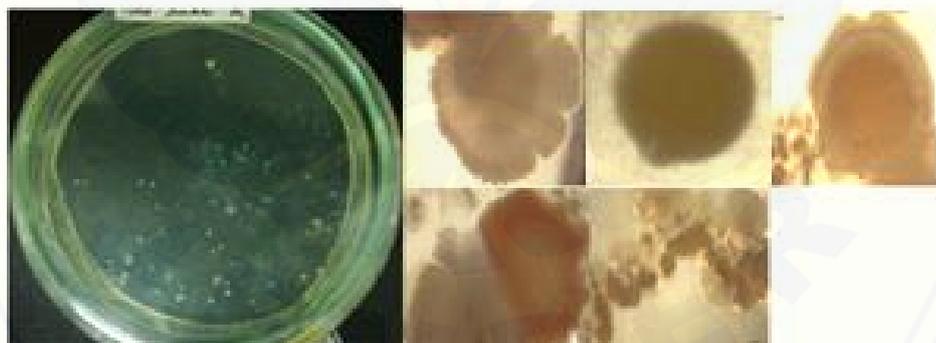
2. Tanjungrejo



Populasi total bakteri $13,2 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 4

3. Tutul



Populasi total bakteri $35,5 \times 10^{11}$ CFU/ml/g

Variasi 5

B. Karakteristik koloni bakteri

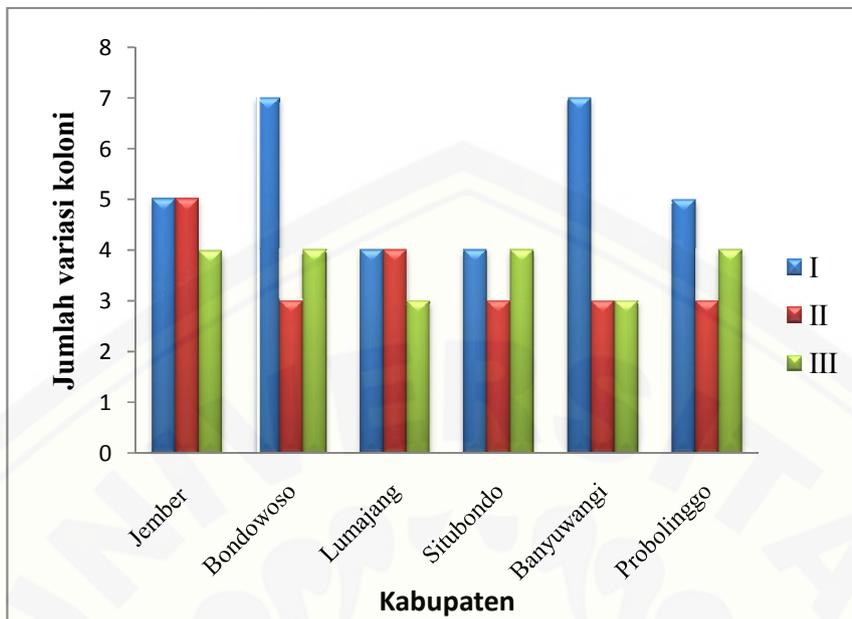
Kabupaten	Lokasi	Karakteristik isolat
Jember	Tanjungrejo	Warna orange, bentuk tidak beraturan, tepi bergelombang, tampak samping datar.
		Warna kuning keputihan, bentuk tidak beraturan, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih keruh, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna bening tepi putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna putih keruh tepi berwarna bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna orange cerah, bentuk tidak beraturan, tepi halus, permukaan datar, dapat ditembus cahaya
	Karangsono	Warna putih keruh, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna orange cerah, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih susu, bentuk tidak beraturan, tepi bergelombang membulat, tampak samping datar.
		Warna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna kuning bagian tepi berwarna bening, bentuk bulat tepi halus, tampak samping cembung.
	Tutul	Warna putih, bentuk tidak beraturan, tepi bergelombang, tampak samping datar.
		Warna kuning gelap, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung
		Warna putih bagian tengah kuning, bentuk bulat, tepi bergelombang, tampak samping bagian tepi meninggi
		Warna orange kekuningan, bentuk tidak beraturan, tepi bergelombang, tampak samping cembung
		Warna bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung
		Warna kuning keruh, bentuk bulat, tepi halus,

		tampak samping cembung
Bondowoso	Maskuning wetan	Warna putih keruh, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih keruh tengah berwarna putih susu, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping berpusat
		Warna bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna orange, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih susu, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna kuning tepi putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna merah kecoklatan, bentuk tidak beraturan, tepi bergelombang, tampak samping datar.
	Maskuning kulon	Warna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna kuning tepi bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung
		Warna putih keruh, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
	Patemon	Warna putih keruh, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung
		Warna putih keruh, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar
		Warna kuning cerah, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
Warna bening, bentuk tidak beraturan, tepi halus, tampak samping datar		
Banyuwangi	Kabat	Warna bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna merah, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih, bentuk tidak beraturan,, tepi bergelombang membulat, tampak samping cembung
		Warna bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung
		Warna bening, bentuk bulat, tepi halus,

		tampak samping berpusat.
		Warna bening kekuningan, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping kubah.
	Karangbendo	Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih, bentuk bulat, tepi bergelombang, tampak samping datar.
		Warna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping bertingkat datar.
	Pakistaji	Warna putih susu, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih tepi warna bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
Lumajang	Munder	Warna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna kuning keruh, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna putih keruh, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
	Tekung	Warna merah muda, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping bertingkat datar.
		Warna putih keruh, bentuk bulat, tepi bergelombang, tampak samping datar.
		Warna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih kemerahan, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
	Besuk	Warna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna bening tengah berwarna putih, tepi halus, tampak samping bertingkat datar.
Probolinggo	Sumberanyar	Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.

		Warna putih, bentuk berfilamen, tepi bergelombang, tampak samping rata.
		Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
	Karanganyar	Warna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna merah muda, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
	Sumberejo	Warna putih, bentuk bulat, tepi bergelombang membulat, tampak samping kubah.
		Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping datar.
		Warna kuning tepi berwarna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih susu, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
Situbondo	Bloro	Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping bentuk kawah.
		Warna putih tengah berwarna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping kubah.
		Warna bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
	Silomukti	Warna putih, bentuk bulat, tepi bergelombang, tampak samping datar.
		Warna putih tepi berwarna bening. Bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna putih kekuningan, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
	Demung	Warna bening, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping bagian tepi meninggi
		Warna putih, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.
		Warna kuning, bentuk bulat, tepi halus, tampak samping cembung.

C. Variasi koloni bakteri



D. Populasi koloni bakteri total

