



**IDENTIFIKASI NEMATODA PARASIT TANAMAN PADA TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.) BERBASIS MOLEKULER DI DAERAH
LUMAJANG, PROBOLINGGO, DAN
SE-KARESIDENAN BESUKI**

SKRIPSI

Oleh

**HALIMATUS SA'DIYAH
NIM 111510501037**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

\



**IDENTIFIKASI NEMATODA PARASIT TANAMAN PADA TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.) BERBASIS MOLEKULER DI DAERAH
LUMAJANG, PROBOLINGGO, DAN
SE-KARESIDENAN BESUKI**

SKRIPSI

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

Oleh

**HALIMATUS SA'DIYAH
NIM 111510501037**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Halimatus Sa'diyah

NIM : 111510501037

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Identifikasi Nematoda Parasit Tanaman pada Tembakau (*Nicotiana Tabacum L.*) Berbasis Molekuler di Daerah Lumajang, Probolinggo, dan Sekeresidenan Besuki”** adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya ilmiah jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap dan etika ilmiah yang harus di junjung 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, 16 Agustus 2016

Yang menyatakan,

Halimatus Sa'diyah

NIM. 111510501037

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI NEMATODA PARASIT TANAMAN PADA TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.) BERBASIS MOLEKULER DI DAERAH
LUMAJANG, PROBOLINGGO, DAN
SE-KARESIDENAN BESUKI**

Oleh

Halimatus Sa'diyah
Nim 111510501037

Pembimbing

Pembimbing Utama : Hardian Susilo Addy, SP.,MP. PhD.
NIP. : 19801109200501 1 001

Pembimbing Anggota : Ir. Soekarto, MS
NIP : 19521021198203 1 001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “ **Identifikasi Nematoda Parasit Tanaman pada Tembakau (*Nicotiana Tabacum* L.) Berbasis Molekuler di Daerah Lumajang, Probolinggo, dan Se-Keresidenan Besuki** “ telah diuji dan di sahkan pada :

Hari, tanggal : Selasa, 16 Agustus 2016

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Hardian Susilo Addy., SP . MP. Ph.D

NIP. : 19801109200501 1 001

Ir. Soekarto,MS.

NIP. 19521021198203 1 001

Dosen Penguji,

Ir. Hari Purnomo, M.Si.,Ph.D.,DIC

NIP. 19660630199003 1 002

Mengesahkan

**a.n Dekan,
Pembantu Dekan I,**

Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph. D

NIP. 19600506 198702 1 001

RINGKASAN

Identifikasi Nematoda Parasit Tanaman pada Tembakau (*Nicotiana Tabacum* L.) Berbasis Molekuler di Daerah Lumajang, Probolinggo, dan Sekeresidenan Besuki. Halimatus Sa'diyah. 111510501037. Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Tembakau merupakan komoditas penting yang banyak dibudidayakan di Kabupaten Lumajang, Probolinggo, Jember, Bondowoso, Situbondo, dan Banyuwangi. Dan menjadi salah satu komoditas ekspor yang sangat penting bagi Indonesia. Sehingga perlu dijaga kualitas dan kuantitasnya agar produksi tembakau tetap konstan atau bahkan dapat meningkat. Namun untuk mencapai tujuan tersebut terdapat kendala-kendala yang harus ditangani salah satunya yaitu adanya serangan nematoda terhadap pertanaman tembakau dari spesies *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. dan *Longidorus* spp. dimana serangan nematoda ini dapat menyebabkan kerusakan seperti tanaman menjadi kerdil, menguning dan lain sebagainya yang dapat menyebabkan penurunan hasil produksi atau bahkan dapat menyebabkan kegagalan panen.

Sampel diambil dari 6 Kabupaten yaitu Lumajang, Probolinggo, Jember, Bondowoso, Situbondo dan Banyuwangi. Terdapat beberapa metode yang dilakukan yaitu ekstraksi dan perhitungan nematoda dari dalam tanah dan akar tanaman pada masing-masing sampel, serta identifikasi morfologi pada nematoda yang ditemukan yang diambil secara acak pada sampel yang digunakan, ekstraksi dan pengujian kualitas DNA dengan metode elektroforesis menggunakan spektrofotometer UV, kemudian dianalisis menggunakan teknik PCR untuk mengetahui keberadaan spesies nematoda patogenik terutama dari golongan spesies *Meloidogyne* spp. *Pratylenchus* spp. dan *Longidorus* spp. yang menyerang pertanaman tembakau.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan identifikasi morfologi nematoda patogenik dapat ditemukan di Kabupaten Banyuwangi dan Probolinggo dengan ciri stilet, bentuk tubuh, mulut dan ekor yang berbeda untuk setiap spesies

nematoda yang ditemukan. Namun spesies *Meloidogyne* spp. *Pratylenchus* spp. dan *Longidorus* spp. tidak dapat terdeteksi menggunakan analisis PCR. Hal ini kemungkinan di pengaruhi oleh beberapa faktor sehingga terjadi kegagalan dalam amplifikasi fragmen DNA yang di gunakan.



SUMMARY

Molecular-Based Identification of Parasitic Nematodes in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Plants in Lumajang, Probolinggo, and Ex-Residency of Besuki Regions. Halimatus Sa'diyah. NIM 111510501037. Agrotechnology Study Program, Faculty of Agriculture, Jember University.

Tobacco is an important commodity which is widely cultivated in Jember, Probolinggo, Banyuwangi, Bondowoso, Situbondo, and Lumajang Regencies. It becomes one very important export commodity for Indonesia, so it is necessary to maintain the quality and quantity of tobacco in order that its production remains constant or even increasing. However, to achieve these objectives, one issue that needs management is nematode attacks against tobacco crop, such as nematode species *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. and *Longidorus* spp. These nematodes can cause damages; for example, plants become stunted, yellow and others that can make a decrease in yield or even lead to crop failure.

Samples were taken from 6 regencies i.e. Lumajang, Probolinggo, Jember, Bondowoso, Situbondo and Banyuwangi. Several methods were used i.e. extraction and calculation of nematodes of the soil and plant roots in each sample as well as morphological identification of the nematodes found which were taken randomly from the samples used, extraction and testing of DNA quality by electrophoresis method using UV spectrophotometer and then analysed using PCR technique to identify the existence of pathogenic nematode species, especially from species group *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. and *Longidorus* spp. that attacked tobacco crops.

The results showed that based on morphological identification, pathogenic nematodes were found in Regencies of Banyuwangi and Probolinggo characterized by stylet, different shapes of body, mouth and tail on each nematode species found. However, the species of *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. and *Longidorus* spp. could not be detected using PCR analysis. This is most likely

influenced by several factors causing the failure in the amplification of DNA fragments used.



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat ALLAH S.W.T yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-nya, juga salam serta sholawat atas junjungan Nabi besar Muhammad SAW, sehingga penelitian dan penulisan skripsi dengan judul Identifikasi Nematoda Parasit Tanaman Pada Tembakau (*Nicotiana Tabacum* L.) Berbasis Molekuler Di Daerah Lumajang, Probolinggo, Dan Sekeresidenan Besuki.” dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh derajat kesarjanaan (S1) pada Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak akan terselesaikan dengan baik tanpa adanya bantuan dari semua pihak. Penulis menyampaikan penghargaan dan terimakasih kepada:

1. Dr. Ir. Jani Januar, MT. Selaku Dekan Fakultas Pertanian
2. Hardian Susilo Addy, SP. MP. PhD. Selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU), Ir. Soekarto, MS. Selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA), dan Ir. Hari Purnomo, M.Si.,Ph.D.,DIC Selaku Dosen Penguji yang telah memberikan arahan, bimbingan, peningkatan wawasan, keterampilan dan motivasi dalam melakukan penelitian dan penyelesaian skripsi.
3. Ir. Saifuddin Hasjim, MP. selaku dosen pembimbing lapangan yang telah bersabar dan memberikan ilmu serta proses pendanaan selama penelitian.
4. Ir. Sundahri, MP. Selaku Dosen pembimbing Akademik yang telah membimbing selama menjadi mahasiswa.
5. Prof, Dr. Ir Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc. Selaku ketua CDAST yang telah membantu dan memberikan izin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di CDAST.
6. Kedua Orang tua saya Bapak Muhari dan Ibu Tumina, serta suami saya Nur Ahmat yang telah memberikan dukungan, doa dan semangat sehingga proses penelitian serta penyelesaian skripsi dapat terselesaikan.
7. Serta semua pihak yang telah memberikan saran, kritik dan motivasi selama di universitas Jember

Akhirnya penulis berharap semoga Karya Ilmiah (Skripsi) ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan para pembaca pada umumnya serta bermanfaat bagi kemajuan dunia pertanian.

Jember, 16 Agustus 2016

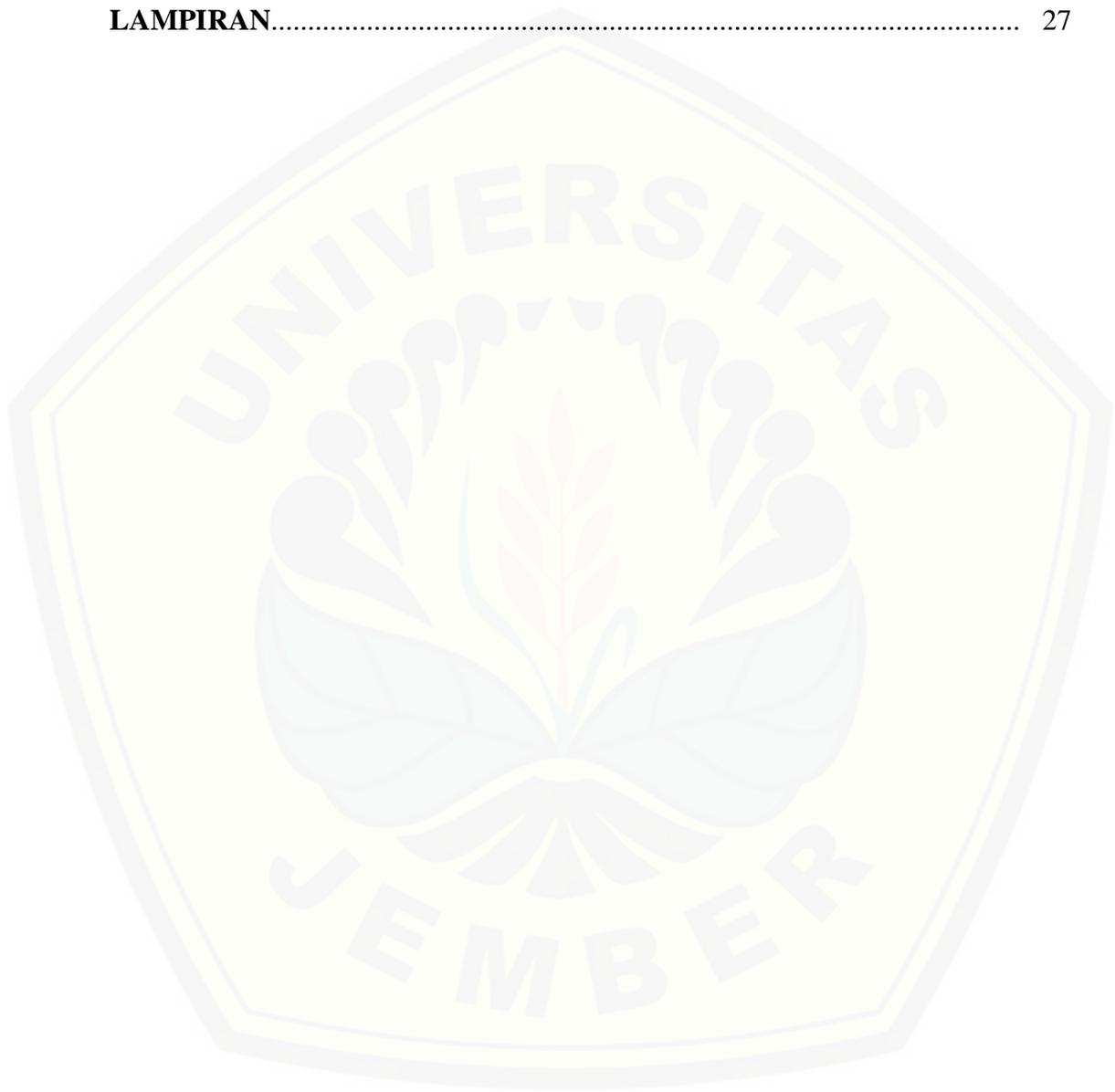
Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN	ii
HALAMAN PEMBIMBINGAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
RINGKASAN	v
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Tanama Tembakau	3
2.2 Nematoda Parasit	4
2.3 PCR	7
BAB 3. METODE PENELITIAN	9
3.1 Waktu dan Tempat	9
3.2 Metode Penelitian	9
3.2.1 Penentuan dan Pengambilan Sampel.....	9
3.2.2. Ekstraksi Nematoda.....	11
3.2.3 Identifikasi Molekuler.....	12
3.2.3.1 Ekstraksi DNA.....	12
3.2.3.2 Pengujian Kualitas DNA.....	12
3.2.3.3 PCR.....	13
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
4.1 Hasil	14

4.2 Pembahasan.....	19
BAB 5. PENUTUP.....	23
5.1 Kesimpulan dan Saran.....	23
DAFTAR PUSTAKA.....	24
LAMPIRAN.....	27



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
2.1	Perbedaan akar tanaman yang terserang nematoda Dan akar tanaman yang sehat.....	5
3.1	Peta lokasi pengambilan sampel tanah.....	10
3.2	Pengambilan sampel tanah dengan metode <i>systematic sampling</i> (zigzag).....	11
4.1	Populasi nematoda (per 100 g tanah).....	14
4.2	Populasi nematoda parasit tanaman dan nematoda predator	15
4.3	Isolat Nematoda.....	16
4.4	Isolat Nematoda.....	17
4.5	Visualisasi fragmen DNA dan hasil PCR.....	18

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tembakau merupakan komoditas yang banyak dibudidayakan di Kabupaten Lumajang, Probolinggo, Jember, Bondowoso, Situbondo, dan Banyuwangi. Hal ini dikarenakan kondisi lingkungan yang mendukung sehingga tanaman tembakau mampu menghasilkan atau memproduksi tembakau dengan kualitas yang mampu bersaing dipasar internasional (Mustika, 2010).

Usaha tani tembakau yang berkembang di Indonesia telah diekspor keberbagai negara, dan belum dapat memenuhi permintaan pasar internasional (Cahyono, 1998). Namun ada beberapa hal yang mempengaruhi hal tersebut yaitu penggunaan pestisida yang berlebihan juga dikarenakan perkembangan nematoda dan serangan penyakit yang tidak dapat diprediksi secara tepat. Salah satu perkembangan penyakit yang banyak dan belum dapat teratasi secara optimal adalah serangan nematoda pada tembakau yang menyerang akar tanaman tembakau, dimana kondisi lingkungan yang cocok mempengaruhi perbanyakan dan penyebaran nematoda tersebut.

Nematoda parasit yang paling banyak ditemukan pada tanaman adalah dari spesies *Meloidogyne* sp. yang merupakan nematoda penyebab puru akar, yaitu *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, dan *M. hapla* (Soekarto, 1997). Nematoda ini termasuk dalam hama penting yang tersebar dibanyak daerah di Indonesia, sehingga perlu adanya penanggulangan yang serius dan tepat untuk mengatasi permasalahan mengenai serangan nematoda ini, karena dengan penurunan ketahanan tanaman terhadap berbagai penyakit menyebabkan tanaman tidak dapat diselamatkan atau tidak dapat berproduksi. Secara global nematoda parasit dapat mengurangi produksi pertanian sekitar 11% (Mustika dan Nuryani, 2003).

Salah satu cara untuk mengetahui adanya serangan nematoda pada tanaman tembakau dapat dilakukan dengan metode molekuler menggunakan teknik PCR. Identifikasi yang tepat terhadap keberadaan spesies nematoda akan menentukan keberhasilan peningkatan produksi baik secara kualitas maupun kuantitas (Mulyadi, 1996).

Identifikasi nematoda parasit secara morfologi dan molekuler pada tanaman kentang di Serbia, dimana nematoda yang dikhususkan adalah nematoda dari spesies *Globodera*. Identifikasi morfologi dilakukan dengan metode morfometri yaitu dengan pengukuran stylet, *knob*, panjang vulva, anus, serta cutikula, dengan foto yang telah diamati. Sedangkan untuk identifikasi molekuler dilakukan dengan mengekstraksi DNA, dan diamplifikasikan menggunakan elektroforesis pada gel agaros dengan pewarnaan *etidium bromide*. (Oro *et al.*, 2010).

Ketelitian dan pemilihan metode identifikasi merupakan salah satu syarat dalam mengetahui spesies dan jenis nematoda sebagai parasit tanaman. Identifikasi pada level genus dan spesies masing-masing mempunyai masalah dan kesulitan tersendiri. Identifikasi nematoda, meskipun hanya dibatasi level genus masih sulit dilakukan karena belum secara keseluruhan dikuasai para pakar nematologi (Fortuner, 1989). Penelitian ini dikhususkan pada nematoda parasit spesies *Meloidogyne* spp. *Pratylenchus* spp. dan *Longidorus* spp.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ditemukan nematoda *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., dan *Longidorus* spp. pada tanaman tembakau dari masing-masing kabupaten?
2. Bagaimana hasil pendeteksian nematoda dengan pendekatan PCR?

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui keberadaan spesies nematoda *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* sp., dan *Longidorus* sp. yang menyerang pertanaman tembakau di beberapa lokasi sentra pertanaman di Kabupaten Lumajang, Probolinggo, dan Se-Keresidenan Besuki.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan dan menambah informasi mengenai penyebaran spesies nematoda parasit yang menyerang pertanaman tembakau di Kabupaten Lumajang, Probolinggo, dan Se-Keresidenan Besuki.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Tembakau

Tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) merupakan tanaman yang banyak dibudidayakan di negara dengan keadaan tropis. Tembakau merupakan tanaman yang memiliki nilai dan prospek permintaan pasar yang sangat tinggi diseluruh dunia yaitu untuk produksi sigaret, dan cerutu yang dibudidayakan paling luas di Dunia (Milne, 1972).

Tembakau merupakan tanaman asli Amerika Tengah yang merupakan tanaman hibrida alami yang dibudidayakan secara luas dan mulai menyebar ke seluruh daerah Amerika, dan mengalami proses eksplorasi dari Eropa ke Amerika, kemudian meluas ke seluruh dunia yang memiliki iklim mendukung untuk perkembangan tembakau. Produksi tembakau yang dipasarkan terdiri dari beberapa bentuk yaitu dalam bentuk serutan dan lembaran kering yang merupakan sumber pendapatan negara dan pemerintah yang menyumbang hampir 30% dari pajak lainnya (Ahurst, 1981).

Tembakau adalah produk yang sangat sensitif terhadap cara budidaya, lokasi tanam, musim/cuaca, dan cara pengolahan. Karena itu, suatu kultivar tembakau tidak akan menghasilkan kualitas yang sama apabila ditanam di tempat yang berbeda agroekosistemnya. Produk tembakau sangat khas untuk suatu daerah dan kultivar tertentu, sehingga macam-macam produk tembakau biasanya dinamai sesuai lokasi tanam (Cahyono, 1998).

Tanaman tembakau merupakan tanaman semusim dengan klasifikasi sebagai berikut yaitu kingdom *plantae*, divisio *Spermatophyta*, kelas *Dicotyledonae*, ordo *Solanales*, famili *Solanaceae*, genus *Nicotiana* dan spesies *N.tabacum* L. (Steenis, 2005)

Tembakau memiliki ciri-ciri morfologi yaitu memiliki batang yang tegak dan besar dengan ketinggian tanaman sedang, ada yang berdaun tipis dan elastis namun ada juga yang berdaun tebal, sesuai dengan jenis dan kebutuhan. Memiliki akar serabut, bentuk daun agak bulat dan lebar, kedudukan daun pada batang tampak mendatar, bermahkota tipis silinder, daun berwarna hijau cerah, daun

yang sudah diolah atau dipanen berwarna coklat tua. Tumbuh didataran rendah dengan curah hujan yang rendah serta membutuhkan sinar matahari yang cukup (Cahyono, 1998).

Menurut Steenis (2005) bentuk morfologi tanaman tembakau yaitu batang berkayu, bulat, berbulu, diameter ± 2 cm, dan berwarna hijau. Daun tunggal, berbulu, bulat, tepi daun rata, ujung runcing, pangkal tumpul, panjang daun 20-50 cm, lebar 5-30 cm tangkai daun dengan panjang 1-2 cm, berwarna hijau keputihan. Termasuk bunga majemuk, bunga tumbuh diujung batang, kelopak berbulu, pangkal bunga berlekatan, ujung terbagi lima, kepala sari berwarna abu-abu, putik memiliki panjang 3-3,5 cm, kepala putik hanya satu. Buah berbentuk kotak, bulat telur, buah muda berwarna hijau dan saat tua berwarna coklat tua. Memiliki biji kecil berwarna coklat, memiliki akar tunggang dan berwarna keputihan.

2. 2 Nematoda Parasit Tanaman

Nematoda adalah binatang berukuran mikroskopis berbentuk silindris memanjang, bilateral simetris, namun terdapat beberapa nematoda yang berbentuk Swollen yaitu dari golongan betina, misalnya dari genus *Meloidogyne*, *Nacobbus*, *Heterodera*, *Globodera*, *Tylenchulus*, *Rotylenchulus* dan lain-lain yang berbentuk buah pear, seperti sosis, buah jeruk, dan seperti bentuk ginjal. Nematoda tidak berwarna atau transparan, tidak bersekat atau bersegmen, memiliki semua organ fisiologis (kecuali organ respirasi dan sirkulasi) bagian depan berbentuk tumpul dan bagian ekor meruncing, Nematod juga sering disebut sebagai cacing gilik, cacing benang, *roundworm*, dan belut (Soekarto, 1997).

Beberapa laporan penelitian diluar negeri menunjukkan bahwa Nematoda *Meloidogyne* spp. dapat menyebabkan kerusakan tanaman tembakau sebesar 40%-100% (Natawegina, 1983). Menurut Dropkin (1980), larva *Meloidogyne* spp. mengalami empat stadium larva, yaitu larva stadium 1 dalam telur dan masih inaktif, beberapa hari kemudian terjadi pergantian kulit menjadi larva stadium. Bila aerasi dan kelembaban cukup, maka larva keluar dengan memecah kulit telur, kemudian bergerak bebas diantara partikel tanah dan sangat infeksi.



Gambar 2.1 Perbedaan akar tanaman yang terserang nematoda dan akar tanaman yang sehat (Dropkin, 1980).

Menurut Coyne *et al* (2009), berdasarkan sumber makanannya nematoda parasit dibagi menjadi dua yaitu parasit udara, dimana nematoda parasit jenis ini hidup atau mendapatkan makanannya dari permukaan tanah yang dekat dengan tanaman inang dan parasit dalam tanah yang mendapatkan makanannya dari dalam tanah yang dekat dengan perakaran tanaman.

Secara garis besar filum nematoda dikelompokkan menjadi 5 ordo, yaitu *Tylenchida*, *Dorilaimida*, *Mononchida*, *Enoplida* dan *Rhabditida*. Untuk nematoda parasit pada tumbuhan masuk kedalam ordo *Tylenchida* dan *Dorilaimida*, sedangkan ordo yang lain termasuk kedalam nematoda saprofit dan beberapa bertindak sebagai nematoda parasit pada serangga. *Tylenchida* memiliki stylet ramping, lancip, dan terdapat *knob* pada pangkal stylet yang terdiri dari 2 bagian, yang berfungsi sebagai tempat melekatnya otot-otot, kutikula memiliki anulasi jelas, faring dibagi menjadi empat bagian yang berturut-turut dari depan yaitu *Prokorporus*, *metakorporus*, *ithmas*, dan bagian bawah adalah basal bulbus. Dari ordo *Dorilaimida* memiliki stylet pendek dan gemuk, ujung miring, tidak memiliki *knob* pada pangkal stylet, bagian mulutnya bergigi, memiliki stylet panjang, faring tidak memiliki median bulbus, anterior ramping, posterior lebar, berbentuk silindris seluruhnya, anulasi kutikula tidak nampak apabila diamati dengan mikroskop cahaya (Luc *et al.*, 1995).

Nematoda menyukai tempat berair ataupun pada tanah-tanah yang lembab (Soekarto, 1997). Sebagian besar hidup nematoda berada didalam tanah,

kandungan air tanah merupakan faktor ekologi utama, dan mampu hidup dalam keadaan anhidrobiotik, dan sebaliknya nematoda akan mati apabila dalam tanah kekurangan oksigen. Nematoda tropis tidak mampu hidup dibawah suhu 10°C dan beberapa dapat hidup pada suhu tanah 50°C (Tenson, 1999). Reproduksiya bersifat amfimiktik atau partenogenetik, telur diletakkan secara tunggal atau berkelompok yang berasosiasi dengan nematoda betina. Nematoda umumnya menyerang tanaman melalui ujung-ujung akar dengan menusukkan stiletnya yang menyebabkan kerusakan atau kematian sel (puru akar, nekrosis) dan gejala diatas permukaan tanah yaitu pertumbuhan terhambat, klorosis dan penurunan hasil (Luc *et al.*, 1995).

Nematoda parasit yang ditemukan pada tanaman tembakau yang terbatas pada tempat-tempat tertentu sesuai dengan keadaan iklim atau lingkungan dan tipe tanah pada masing-masing daerah pertanaman tembakau yaitu *Meloidogyne* spp. Diantaranya nematoda terpenting adalah *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, dan *M. hapla*. Sedangkan spesies lain yaitu *Pratylenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Globodera*, *Ditylenchus dipsaci*, *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Rotylenchus*, *Tetylenchus*, dan *Criconemella*. Namun terdapat nematoda spiral seperti *Helicotylenchus*, *Rotylenchus*, *Scutellonema*, Spesies *Tetylenchus* dan *Criconemella*. Serta nematoda-nematoda parasit yang menjadi vektor penyebaran virus adalah dari spesies *Xiphinema*, *Longidorus*, *Trichodorus*, dan *Paratrichodorus* (Luc *et al.*, 1995).

Dalam suatu identifikasi penyakit dapat dilakukan dengan menggunakan bioteknologi yang sudah dikembangkan di Indonesia dengan hasil yang lebih cepat dan akurat (Yuwono, 2006). Beberapa teknik yang dapat digunakan dalam identifikasi spesies nematoda adalah dengan menggunakan teknik molekuler atau deteksi DNA menggunakan PCR (Fleming, 1998). Deteksi DNA merupakan identifikasi lanjutan dari identifikasi morfologi DNA untuk lebih memperjelas hasil yang telah ditemukan dengan waktu yang lebih cepat dan akurat. Identifikasi molekuler akan memberikan keuntungan berupa hasil identifikasi yang bersifat lebih kompleks dan dapat dipercaya (Quader, 2008).

2.3 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi / penggandaan DNA secara *in vitro*. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Dengan diketemukannya teknik PCR disamping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA, telah merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya dibidang diagnosa penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molekuler (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Komponen- komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah cetakan DNA, sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida ($MgCl_2$) dan enzim polimerase DNA. Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: pra-denaturasi DNA templat, denaturasi DNA templat, penempelan primer pada templat (*annealing*), pemanjangan primer (*extension*) dan pemantapan (*post-extension*). Tahap dua sampai dengan empat merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 –40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier (Newton dan Graham, 1994).

Seperti penelitian yang dilakukan oleh Oro *et al.* (2010) yang mengidentifikasi nematoda parasit secara morfologi dan molekuler pada tanaman kentang di Serbia, dimana nematoda yang dikhususkan adalah nematoda dari spesies *Globodera*. Identifikasi morfologi dilakukan dengan metode morfometri yaitu dengan pengukuran stylet, *knob*, panjang vulva, anus, serta cutikula, dengan foto yang telah diamati. Sedangkan untuk identifikasi molekuler dilakukan dengan mengekstraksi DNA, dan diampifikasikan menggunakan elektroforesis pada gel agaros dengan pewarnaan *etidium bromide*.

Contoh lainnya yaitu deteksi nematoda *Longidorus* yang diperoleh dari ekstraksi dari dalam tanah, dengan menggunakan sepasang primer yaitu F (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') dan R (5' TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'). Waktu dan suhu yang diperlukan yaitu denaturasi awal/ pemanasan pada suhu 94° C selama 4 menit, denaturasi pada suhu 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55° C selama 1,5 menit., *Elongation* pada suhu 72° C selama 2 menit dan *Ekstention* pada suhu 72° C selama 10 menit (Handoo *et al.*, 2005)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2015 sampai bulan Januari 2016 di Laboratorium Nematologi, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian dan Devisi Biomolekuler dan Bioteknologi *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember, serta pengambilan sampel di daerah Lumajang, Probolinggo, Jember, Bondowoso, Situbondo, dan Banyuwangi.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Penentuan dan pengambilan Sampel

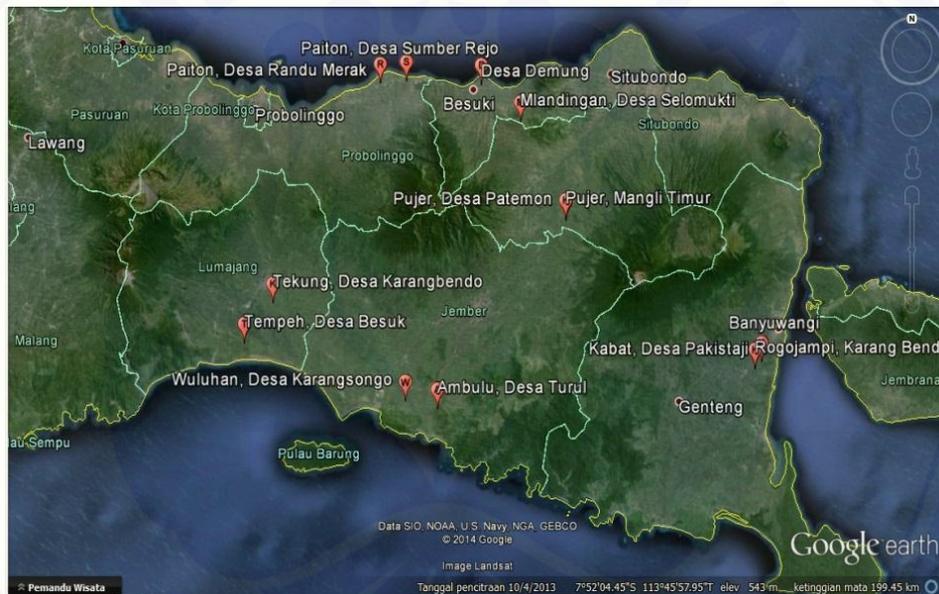
Sampel tanah dan akar tanaman diambil menggunakan metode *systematic sampling* (zigzag). Usahakan sampel yang diambil dari areal pertanaman yang menunjukkan gejala terserang Nematoda. Gejala tersebut berupa adanya tanaman menguning, layu, kerdil, atau pertumbuhan tanaman terhambat. Cara pengambilan sampel tanah dan akar tanaman yaitu tanah dicangkul/dicetok dengan kedalaman 20-30 cm dari permukaan tanah dekat akar sebanyak 1 kg. Sedangkan untuk pengambilan akar dilakukan dengan cara tanaman tembakau dicabut dan menghilangkan bagian tanah yang masih menempel pada bagian akar. Sampel tanah dimasukkan kedalam kantong plastik hitam dan diberi label. Label dicatat jenis tanaman dan kultivar, tanggal pengambilan sampel, nama petani, lokasi (koordinat GPS jika mungkin), nomor referensi (atau plot), tanaman sebelumnya.

Lokasi yang merupakan tempat pengambilan sampel antara lain (Gambar 3.1):

1. Kabupaten Lumajang, Kecamatan Tempeh, Desa Besuk dan Kecamatan tekung, Desa Karang Bendo ($\pm 0-3.676$ m dpl) dengan suhu rata-rata $22^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$.
2. Kabupaten Probolinggo, Kecamatan Paiton, Desa Randu Merak dan Desa Sumber Rejo (0-2500 m dpl), suhu rata-rata $27^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$.
3. Kabupaten Jember, Kecamatan Ambulu, Desa Turul (± 35 m dpl) dan Kecamatan Wuluhan, Desa Karangsono (± 18 m dpl) dengan suhu rata-rata $23^{\circ}\text{C} - 32^{\circ}\text{C}$

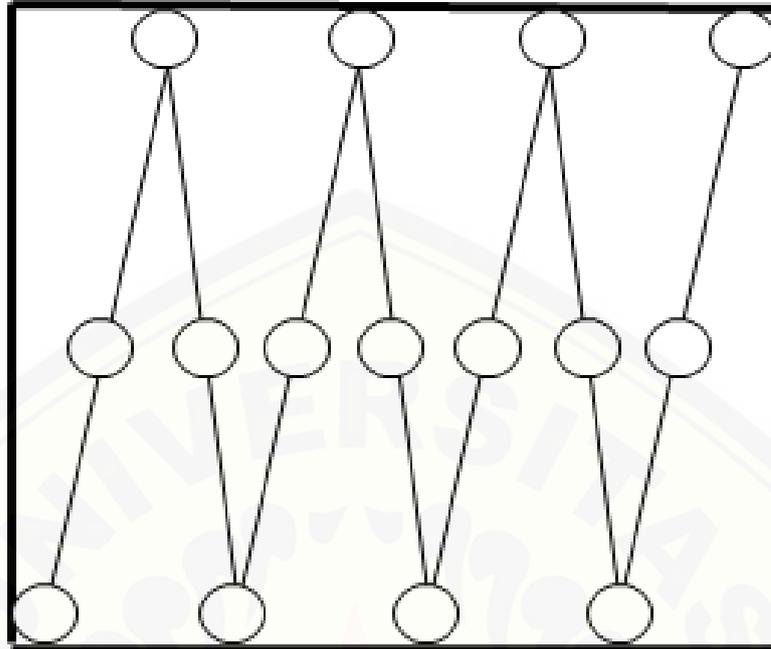
4. Kabupaten Bondowoso, Kecamatan Pujer, Desa Patemon dan Kecamatan Pujer, Desa Mangli Timur (± 220 s/d 427 m dpl) dengan suhu rata-rata 15,40 °C– 25,10 °C.
5. Kabupaten Situbondo, Kecamatan Besuki, Desa Demung dan Kecamatan Mlandingan Desa Silo Mukti (0 – 1.250 m dpl), suhu rata-rata 24,7°C – 27,9°C
6. Kabupaten Banyuwangi, Kecamatan Kabat, Desa Pakistaji dan Kecamatan Rogojampi, Desa Karang Bendo (17,14321 m dpl), suhu udara rata-rata 19 °C

PETA LOKASI PENGAMBILAN SAMPEL



Gambar 3.1 Peta lokasi pengambilan sampel tanah

Lokasi pengambilan sampel untuk satu kabupaten diambil 2 plot dengan lokasi yang berbeda setiap plotnya berdasarkan lokasi masing-masing Desa yang menjadi sentra pertanaman tembakau, sehingga diharapkan dengan posisi plot yang berbeda setiap Kabupatennya dapat mewakili persebaran nematoda dalam satu Kabupaten.



Gambar 3.2 Pengambilan sampel tanah pada pertanaman tembakau dengan metode *systematic sampling* (zigzag) (Coyne *et al.*, 2009).

3.2.2 Ekstraksi Nematoda

Menurut Coyne *et al.*, (2009) Proses ekstraksi tanah menggunakan metode modifikasi corong beerman dapat dilakukan dengan cara yaitu sebanyak 100-200 gram sampel tanah ditimbang, kemudian saringan dan kertas saring diletakkan diatas mangkuk dangkal atau piring. Sampel tanah dimasukkan diatas kain saring dan air secukupnya dituang kedalam mangkuk atau piring secara perlahan sampai tersisa ruang diantara saringan dengan permukaan air. Pemanenan nematoda dilakukan setelah 24 jam dengan cara sebanyak ± 100 ml cairan yang mengandung nematoda yang bergerak keluar dari tanah dan tenggelam ke dasar mangkuk dituang kedalam gelas ukur. Proses killing dilakukan pada suhu 60° C didalam water bath untuk mematikan dan memudahkan identifikasi nematoda. Metode tersebut juga dikemukakan oleh Mekete *et al* (2012). Sedangkan untuk memperoleh nematoda dari akar tanaman (*Meloidogyne spp.*) dilakukan secara manual, yaitu dengan menyayat bagian akar yang terdapat puru akar menggunakan mikroskop.

3.2.3 Identifikasi Molekuler

3.2.3.1 Ekstraksi DNA

Sebelum identifikasi molekuler tahap pertama yang dilakukan adalah proses ekstraksi nematode menggunakan metoda modifikasi corong bearmann modifikasi. Sebanyak 100-300 nematoda diambil dan dimasukkan kedalam tabung eppendorf 1,5 ml. Untuk memecah kulit dan meliliskan sel nematoda dilakukan sentrifius dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 200 µl larutan TE buffer dan 200 µl larutan PCI dicampur dan diinkubasi pada suhu 72°C selama 10 menit dengan dikocok atau divortex. Sampel terus disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit.

Kemudian supernatan diambil dan dimasukkan kedalam tabung eppendorf baru dan ditambah sodium asetat 20 µl, etanol absolut dingin 550 µl hingga merata. Pada supernatan tersebut dilakukan inkubasi kembali selama 1 jam dengan suhu -20° C. Sampel disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, buang supernatannya dengan cara dituang kemudian pellet DNA yang sudah ada dikumpulkan. Sebanyak 500 µl etanol dingin 70 %, ditambahkan dan larutan disentrifius kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Pellet dikeringkan pada oven suhu 45°C selama 10 menit. Pellet sampel DNA selanjutnya dilarutkan kedalam 30 µl TE buffer. DNA siap digunakan untuk identifikasi molekuler, dimana DNA tersebut berfungsi sebagai cetakan molekul DNA baru yang sama.

3.2.3.2 Pengujian kualitas DNA

Salah satu cara untuk mengetahui kualitas DNA yang dihasilkan dapat dilakukan dengan metode elektroforesis, menggunakan spektrofotometer UV (Hudaya, 2009), sebanyak 5µl DNA nematode diambil dan ditambahkan loading buffer 2µl. DNA dirunning dengan konsentrasi 1% selama 45 menit dengan tegangan 75 volt. Setelah proses elektroforesis selesai dilakukan, visualisasi menggunakan pengecatan *ethidium bromida*. DNA yang berkualitas baik akan terlihat berpendar ketika diamati menggunakan mesin *Geldoc*.

3.2.3.3 Teknik PCR

Larutan primer yang digunakan dalam identifikasi molekuler nematoda parasit yaitu *Meloidogyne* spp. *Pratylenchus* spp. dan *Longidorus* spp. Identifikasi nematoda ini menggunakan 1 set primer untuk masing-masing spesies nematoda, yaitu primer F dan primer R. Bahan-bahan (komposisi) yang digunakan untuk membuat larutan PCR adalah PCR mix (kappa) (60 µl), ddH₂O (40 µl), Primer F (6 µl), Primer R (6 µl), Jumlah 112 µl. (*Meloidogyne* spp. F (5'-GGTCAATGTTC TCAGAAATTTGTGG-3') dan R (5'-TACCTTTGACCAATCACGCT-3'), *Pratylenchus* spp. F (5'-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3') dan R (5'-TCGG AAGGAACCAGCTA-3') dan *Longidorus* spp. F (5'-ACAAGTACCGTGAGGG GAAAGTTG-3'), R (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3').

Semua bahan-bahan tersebut dicampur kedalam tabung ependroft baru ukuran 1,5 ml. Untuk melakukan proses PCR maka bahan-bahan tersebut dicampur dengan DNA sempel. Adapun komposisi yang dibutuhkan adalah larutan PCR (8 µl), DNA sempel (2 µl), Jumlah (10 µl).

Waktu dan proses PCR dimulai dari *Denaturasi*, *annealing* dan *Elongation* yang dilakukan dalam 35 siklus pada semua spesies nematoda yaitu *Meloidogyne* spp. *Pratylenchus* spp. dan *Longidorus* spp. Waktu dan suhu yang diperlukan yaitu denaturasi awal/ pemanasan pada suhu 94° C selama 5 menit, *denaturasi* pada suhu 94° C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 55° C selama 15 detik., *Elongation* pada suhu 72° C selama 1 menit dan *Ekstensi* pada suhu 72° C selama 3 menit. Untuk mengetahui hasil PCR, kembali dilakukan running menggunakan elektroforesis gel dengan metode yang sama seperti saat pengujian kualitas DNA.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Keberadaan nematoda spesies *Meloidogyne* spp. *Pratylenchus* spp., dan *Longidorus* spp. Pada Kabupaten Lumajang, Probolinggo, dan Se-Keresidenan Besuki tidak terdeteksi menggunakan analisis PCR, kemungkinan dikarenakan jumlah sel yang didapat tidak mencukupi atau tidak memenuhi standart yang digunakan saat proses PCR, karena banyaknya nematoda jenis lain yang ikut tercampur saat ekstraksi DNA.

5.2 Saran

Perlu adanya pemisahan spesies nematoda patogenik (*Meloidogyne* spp. *Pratylenchus* spp., dan *Longidorus* spp.) dan nematoda non patogenik saat identifikasi morfologi, agar sel yang didapat mencukupi untuk masing-masing spesies nematoda target.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahurst, B. C. 1981. *Tobacco*. 2nded. Longman Inc. New York.
- Cahyono, B. 1998. *Tembakau” Budidaya dan Analisa Usaha Tani”*. Kanisius. Yogyakarta.
- Coyne, D.L., Nicol, J.M., and Cole, B.C. 2009. *Practical plant nematology: A field and laboratory guide*. International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). Benin.
- Dropkin, V.H. 1980. *Introduction to Plant Nematology*. John Wiley and Sons. New York.
- Fleming, C.C., and Thomas, O.P. 1998. Potato Cyst Nematode: Morphology, differential host and biochemical techniques. In: Marks, R.J., B.B. Brodie (Eds) potato cyst nematodes; Biology, Distribution and Control. *CAB International* : 91-114.
- Handoo, Z.A., Carta, L.K., Skantar, A.M., Robbins, R.T., Subbotin, S.A., Freadrich, S.W., and Cram, M.M. 2005. Morphological and molecular characterization of *Longidorus Americanum* sp. (Nematoda : Longidoridae), a needle nematode parasitizing pine in Georgia. *Entomologi*. 37(1): 94-104.
- Handoyo, D., dan Rudirenta, A. 2001. Prinsip umum dan pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Unitas*. 9(1):17-29.
- Hudaya, A. 2009. Identifikasi Spesies Nematoda Sista Kentang (*Globodera spp.*) Asal Kabupaten Banjarnegara dan Wonosobo. Tidak di terbitkan. *Skripsi*. Yogyakarta. Fakultas Pertanian. Universitas Gajah Mada
- Inserra, R. N., Duncan, L.W., Dunn, D., Kaplan, and Porazinska, D. 1998. *Pratylenchus pseudocoffeae* from Florida and its relationship with *P. gutierrezii* and *P. coffeae*. *Entomologi*. 1(44):683-712.
- Langga, I.F., Restu, M., dan Kuswinanti, T. 2012. Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi DNA tanaman bitti (*Vitex Cofassus Reinw*) Serta analisis keragaman genetik dengan teknik RAPD-PCR. *Sains & Teknologi*. 12 (3): 265-276.
- Luc, Sikora, and Bridge, 1995. *Nematoda Parasitik Tumbuhan di Pertanian Subtropik dan tropic*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

- Mekete, T., Dababat A., Sekora N., Akyazi F., and Abebe, E. 2012. Identification Key For Agriculturally important Plant-Parasitic Nematodes: A manual For Nematology.
- Milne, D.L. 1972. *Nematodes of Tobacco*. Dalam Webster J.M. ed. *Economic Nematology*. London. Academic press: 159-186
- Mulyadi. 1996. *Nematologi*. Jurusan Hama dan Penyakit. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Mustika, I. 2010. Konsepsi dan strategi pengendalian nematoda parasit tanaman di Indonesia. *Pengembangan Inovasi Pertanian*. 3(2): 81-101.
- Mustika, I., dan Nuryani, Y. 2003. Penyakit-penyakit Utama Tanaman yang Disebabkan Oleh Nematoda. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Makalah pada "Pelatihan Identifikasi dan Pengelolaan Nematoda Parasit Utama Tumbuhan". *Pusat Kajian Pengendalian Hama Terpadu (PKPHT)-HPT*. Institut Pertanian Bogor, 26-29.
- Natawigena, H. 1983. *Pengendalian Hama Secara Hayati*. Fakultas Pertanian, Universitas Padjajaran. Bandung.
- Newton, C.R., and Graham, A. 1994. *PCR*. UK: Bios Scientific Publisher.
- Newton, C. R., and Graham, A. 1997. *PCR*. Introduction to Biotechnology, Bios Scientific Publisher Ltd. Oxford.
- Norton, D.C., and Hoffmann, J.K. 1975. *Longidorus Breviannulatus* sp. (Nematoda: Longidoridae) associated with stunted corn in Iowa. *Entomology*. 7(2): 168-171.
- Oro, V., Ivanovic, Z., Nikolic, B., Barszi, L., Radivojevic, M., And Jovicic, B. 2010. Morphological and molecular identification of potato cyst nematode populations in Serbia. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*. 62(3):747-754.
- Prana, T. K., dan Hartati N.S. 2003. Identifikasi sidik jari DNA talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan teknik RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) : skrining primer dan optimalisasi kondisi PCR. *Natur Indonesia*. 5(2): 107-112.
- Quader, M., Nambiar, L., & Cunnington, J. 2008. Conventional and real time pcr-based species identification and diversity of potato cyst nematodes (*Globodera* spp.) from Victoria, Australia. *Entomology* 2 (1): 1-8.
- Ratnayani, K., Yowani, S.C., dan Liangky, S.S. 2009. Amplifikasi fragmen 0,4 kb daerah d-loop DNA mitokondrial lima individu Suku Bali tanpa hubungan

kekerabatan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). *Kimia*. 3(1):14-20.

Shireesha, R., dan Vanita, D. 2014. Identification of plant nematodes in sugarcane. *Pharmaceutical Sciences and Research*. 6(11): 389-39.

Soekarto. 1997. *Petunjuk Praktikum Nematologi Tumbuhan*. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan. Fakultas Pertanian Universitas Jember. Jember.

Steenis, V. 2005. *Flora Untuk Sekolah di Indonesia*. Penerbit Pradnya Paramita. Jakarta.

Swibawa, I.G., Amaliah, I., and Aeny, T.N. 2000. Pengaruh infestasi nematoda *pratylenchus* terhadap pertumbuhan tanaman nenas [*Ananas Comosus* (L.) Merr.]. *Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. 1(1): 25-28.

Taylor, C.E., dan Brown, D.J.F. 2001. *Nematode Vectors Of Plant Viruses*. CAB International. California.

Tenson. B. S. Ng. A . 1999. Identification of sources of resistance to four species of root-knot nematodes in tobacco. *Entomology*. 31(3):272–282.

Yuwono, T. 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

LAMPIRAN

FOTO PENGAMBILAN SAMPEL TANAH



FOTO SAMPEL TANAH DAN AKAR



FOTO EKSTRAKSI TANAH



FOTO ISOLAT NEMATODA

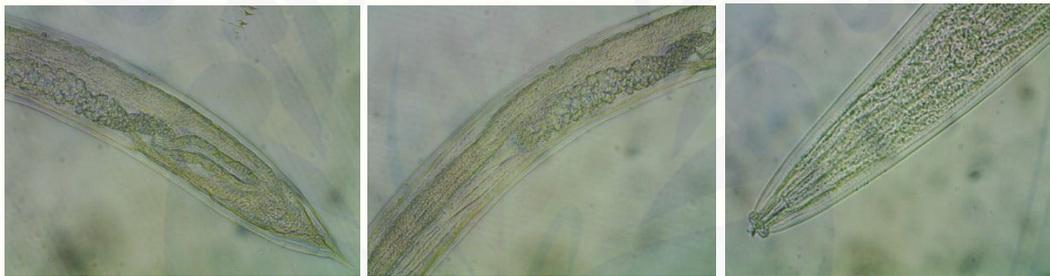


Foto yang diperkirakan nematoda *Meloidogyne* spp.



Foto yang diperkirakan nematoda *Pratylenchus* spp.



Foto yang diperkirakan nematoda *Longidorus* spp.

Kabupaten	NPT	NP
Probolinggo	89	20
Situbondo	154	26
Banyuwangi	358	9
Lumajang	200	46
Bondowoso	189	7
Jember	70	22

Populasi nematoda parasit tanaman dan nematoda predator

PLOT	LOK. (1)	LOK. (2)
1	15	2
2	0	2
3	9	0
4	8	0
5	10	3
6	0	4
7	6	2
8	0	0
9	3	3
10	6	5
11	5	2
12	3	0
13	7	0
14	0	3
15	5	6
TOTAL	77	32

PROBOLINGGO

PLOT	LOK. (1)	LOK. (2)
1	15	5
2	0	3
3	16	5
4	5	5
5	3	3
6	7	9
7	5	0
8	1	8
9	6	9
10	1	3
11	10	7
12	10	4
13	3	12
14	9	5
15	7	4
TOTAL	98	82

SITUBONDO

PLOT	LOK. (1)	LOK. (2)
1	5	30
2	9	15
3	12	30
4	5	5
5	30	3
6	2	30
7	1	30
8	5	20
9	10	5
10	10	10
11	15	20
12	2	10
13	12	3
14	15	10
15	3	10
TOTAL	136	231

BANYUWANGI

PLOT	LOK. (1)	LOK. (2)
1	2	6
2	6	10
3	11	14
4	9	10
5	7	2
6	2	4
7	4	2
8	1	7
9	0	8
10	1	4
11	2	12
12	8	18
13	14	10
14	10	3
15	7	2
TOTAL	84	112

BONDOWOSO

PLOT	LOK. (1)	LOK. (2)
1	3	5
2	10	10
3	7	25
4	3	5
5	5	5
6	5	3
7	4	18
8	2	5
9	8	10
10	9	15
11	10	5
12	13	12
13	10	7
14	3	20
15	2	7
TOTAL	94	152

LUMAJANG

PLOT	LOK. (1)	LOK. (2)
1	22	12
2	1	1
3	16	30
4	10	12
5	0	11
6	1	8
7	9	4
8	2	2
9	1	0
10	0	0
11	2	1
12	4	14
13	11	2
14	10	8
15	8	5
TOTAL	97	

JEMBER