IDENTIFIKASI BAKTERI *Ralstonia solanacearum* PENYEBAB PENYAKIT LAYU BAKTERI DAN UJI KETAHANAN BEBERAPA KULTIVAR KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) DI RUMAH KACA

SKRIPSI

Disusun untuk melengkapi syarat-syarat

Guna memperoleh gelar Sarjana Sains

HERY FEBRIANTO
3425120269

PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
2017

IDENTIFIKASI BAKTERI *Ralstonia solanacearum* PENYEBAB PENYAKIT LAYU BAKTERI DAN UJI KETAHANAN BEBERAPA KULTIVAR KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) DI RUMAH KACA

Nama : **Hery Febrianto**

No. Reg : **3425120269**

	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab Dekan	: Prof. Dr. Suyono, M.Si NIP. 19671218 199303 1 005		14/2/2017
Wakil Penanggung Jawab Pembantu Dekan	: Dr. Muktiningsih, M.Si NIP. 19640511 198903 2 001		13/2/2017
Ketua	: Dr. Dalia Sukmawati, M.Si NIP. 19730914 200604 2 001		6/2/17
Sekretaris/Penguji I	: Dr. Adisyahputra, M.S NIP. 19601111 198703 1 003		9/2 17
Anggota Pembimbing I	: Dr. Reni Indrayanti, M.Si NIP 19621023 199803 2 002		3/2 17
Pembimbing II	: Ir. Riza Desnurvia, M.Sc NIP. 1970319 199203 2 001		8/2 17
Penguji II	: Dra. Yoswita Rustam, M.Si NIP. 19530909 198010 2 002		6/2 17

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 24 Januari 2017

ABSTRAK

HERY FEBRIANTO. Identifikasi Bakteri *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri Dan Uji Ketahanan Beberapa Kultivar Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Di Rumah Kaca. Program Studi Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta. 2017.

Kentang (*S. tuberosum* L.) merupakan salah satu komoditas unggulan di Indonesia. Pertumbuhan kentang dapat terhambat dengan berbagai serangan penyakit. Penyakit layu bakteri dapat menyebabkan kerugian yang besar. Bakteri *R. solanacearum* memiliki intensitas serangan yang bervariasi antara 43% sampai 78% (Zulkarnain, 2007). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kultivar kentang yang tahan dari tiga kultivarkentang yang digunakan terhadap infeksi bakteri *R.solanacearum*. Tahapan penelitian yang dilakukan, yaitu: (1) Isolasi dan identifikasi *R. solanacearum* dari umbi kentang yang bergejala; (2) Uji efektivitas metode infeksi bakteri *R. solanacearum* pada tanaman kentang; (3) Uji ketahanan beberapa kultivar tanaman kentang terhadap infeksi bakteri *R. solanacearum* di rumah kaca. Uji fisiologis dan biokimia dengan hasil konfirmasi PCR menunjukkan RS1A merupakan bakteri *R. solanacearum*. Metode dan konsentrasi yang efektif untuk menginfeksi *R. solanacearum* adalah teknik perendaman akar dengan konsentrasi bakteri $5x10^8$. Uji ketahanan terhadap kultivar Medians, Atlantik, dan Granola dengan teknik dan konsetrasi terpilih menunjukkan tidak ada kultivar yang tahan dari serangan penyakit layu bakteri. Kultivar Medians menunjukkan gejala paling parah dengan nilai keterjadian penyakit 100% dan keparahan penyakit 90% dengan 80% kematian. Hasil reisolasi menunjukkan penyakit layu dan kematian pada tanaman kentang disebabkan oleh *R. solanacearum.*

Kata kunci: *infeksi, keparahan penyakit, keterjadian penyakit, rentan.*

ABSTRACT

HERY FEBRIANTO. Identification of the Bacteria *Ralstonia solanacearum* that Causes Bacterial Wilt Disease and Endurance Test Some Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars In Green House. Biology Study Program. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. State University of Jakarta. 2017

Potato (*S. tuberosum* L.) is one of the leading commodity in Indonesia. Potato growth may be hampered by a variety of diseases. Bacterial wilt disease can cause a great loss. *R. solanacearum* attack intensity that varies between 43% to 78% (Zulkarnain, 2007). This study aims to obtain varieties of potatoes that are resistant to bacterial infection *R.solanacearum*. Stages of the research, namely: (1) Isolation and identification of *R. solanacearum* from potato tubers were symptomatic; (2) Test the effectiveness of the method of *R. solanacearum* bacterial infection on potato; (3) Test the resistance of some varieties of potato plants against bacterial infections *R. solanacearum* in greenhouses. Physiological and biochemical test to confirm the results of PCR showed RS1A is *R. solanacearum*. Bacterial infection of potato plants using the technique of soaking the roots with a concentration of 5x108 bacteria. Medians endurance test of cultivars, Atlantic and Granola showed no resistant cultivars of bacterial wilt disease. Cultivars Medians showed the most severe symptoms with disease incidence value 100%, disease severity 90% and 80% of mortality. Results showed reisolasi wilt disease and death in potato plants caused by *R. solanacearum*.

Keywords : infection, disease incidence, disease severity, susceptible.

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. Yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian skripsi yang berjudul : "**Identifikasi Bakteri *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri Dan Uji Ketahanan Beberapa Kultivar Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Di Rumah Kaca"**

Penyusunan skripsi ini melibatkan banyak pihak didalamnya. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada berbagai pihak. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada,:

Dr. Reni Indrayanti M.Si sebagai dosen pembimbing I dan Ir. Riza Desnurvia M.Sc sebagai dosen pembimbing II yang selalu berbaik hati memberikan segala arahan, motivasi, kesabaran dan meluangkan waktu dari awal proses penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini. Dr. Adisyahputra M.S sebagai dosen penguji I dan Dra. Yoswita Rustam M.Si selaku dosen penguji II, atas segala saran, kritik dan masukan dalam penyempurnaan perbaikan skripsi ini.

Terimakasih pula untuk seluruh dosen Universitas Negeri Jakarta, khususnya Bapak dan Ibu dosen Jurusan Biologi, serta seluruh bapak/ ibu peneliti dan staff Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian (BBUSKP).

Papa, Mama, Koko Hendri, Ricky, Winda, Gibran dan seluruh keluarga tercinta yang senantiaasa memotivasi, mendo'akan serta memberi dukungan moril dan materil kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan.

Kakak dan adik di Kelompok Study Primata UNJ atas segala ilmu yang diberikan selama menjadi anggota dan pengurus KSP.

Sahabat-sahabat Biologi 2012 "Wisuda bersama" yang selalu menemani selama 9 semester ini, teman yang selalu menjadi tempat berbagi rasa. Khususnya Kuljar Genk (Puput, Ntep, Riza, Rani, Amel, Tiwi, debby, nium, ririn, novia, tiara, tri)

Sahabat-sahabat "Jum'at Bersalin" (Dicky, Citra, Fakhri, Helmi, Juki, Bagus, Bowo, Lukman, Dani, Deka) dan Heri P.S yang selalu berbagi keceriaaan dan tawa canda selama beberapa tahun ini. Sahabat-sahabat BHY (Ibiw, Uci, Yule, Me, Wayan, Aol, Afil) yang selalu menjadi tempat berbagi keluh kesah serta kebahagiaan selama ini.

Penulis menyadari penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, baik dari segi diksi, penyajian, dan pembahasan yang kurang komprehensif dikarenakan keterbatasan penulis. Penulis mengharapkan segala kritik dan saran yang sifatnya membangun untuk perbaikan di kemudian hari. Akhir kata, semoga Allah senantiasa memberikan Rahmat-Nya kepada kita dalam menuntut ilmu dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis maupun untuk kemajuan ilmu pengetahuan Indonesia., serta diharapkan menjadi referensi dan

rekomendasi bagi dinas terkait untuk memilih kultivar kentang yang dapat tahan terhadap penyakit layu bakteri.

Terimakasih

Jakarta, Desember 2016

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN ..... **Error! Bookmark not defined.**
ABSTRAK ii
ABSTRACT iii
KATA PENGANTAR iv
DAFTAR TABEL ix
DAFTAR GAMBAR xii
DAFTAR LAMPIRAN xiii
BAB I. PENDAHULUAN 1
A. Latar belakang 1
B. Rumusan Masalah 4
C. Tujuan 4
D. Manfaat 5
BAB II. KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA BERPIKIR DAN 6
PERUMUSAN HIPOTESIS 6
A. Kajian Pustaka 6
1. Tanaman Kentang (*S. tuberosum*) 6
2. Varietas Kentang Yang Digunakan Dalam Penelitian 9
3. Bakteri *R. solanacearum* 10
B. Kerangka Berfikir 14
C. Perumusan Hipotesis 15
BAB III. METODE PENELITIAN 16
A. Tujuan Operasional 16
B. Tempat dan Waktu Penelitian 16
C. Metode Penelitian 16
D. Prosedur Penelitian 17
1. Alat dan Bahan 17
2. Cara Kerja 18
Percobaan 1. Identifikasi bakteri *R. solanacearum* pada tanaman kentang terinfeksi penyakit layu bakteri 18

Percobaan 2. Efektifitas metode seleksi untuk uji ketahanan tanaman.... 20
Percobaan 3. Uji ketahanan beberapa kultivar kentang terhadap penyakit layu bakteri *R. solanacearum*. 22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 26
1. Identifikasi bakteri *R. solanacearum* pada tanaman kentang terinfeksi penyakit layu bakteri 26
2. Efektifitas metode seleksi untuk uji ketahanan tanaman..... 34
3. Uji ketahanan beberapa kultivar kentang terhadap penyakit layu bakteri *R. solanacearum*. 37
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN 44
DAFTAR PUSTAKA 46
LAMPIRAN 50
DAFTAR RIWAYAT HIDUP 50

DAFTAR TABEL

No		Hal
1.	Keragaman Morfologi Umbi Kentang……..	9
2.	Biovar *R. solanacearum* berdasarkan produktifitas asam dalam medium kultur……...	12
3.	Resep PCR……..	20
4.	Rancangan uji efektivitas metode infeksi suspensi *R. solanacearum* untuk uji ketahanan pada tanaman kentang…..	22
5.	Tingkat ketahanan klon kentang terhadap serangan bakteri layu *R. solanacearum* (Thaveechai, 1998)……	23
6.	Hasil sekuensing RS1A dengan NCBI……	27
7.	Hasil Uji Fisiologis dan Biokimia Rs-1A dan Rs-2A……..	32
8.	Hasil Pengujian Biovar kedua isolat bakteri……...	34
9.	Pengaruh metode untuk menginokulasi bakteri *R. solanacearum* pada tanaman kentang kultivar Atlantik……..	36
10.	Hasil Infeksi Bakteri *R. solanacearum* pada tanaman kentang……	38
11.	Keterjadian Penyakit pada Tanaman Kentang……..	39
12.	Keparahan Penyakit pada Kentang……..	41
13.	Hasil Pengujian Reisolasi……..	43
14.	Hasil uji anava dua arah pada uji efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu pertama……	56
15	Uji DMRT efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu pertama…….....	57

16. Hasil uji anava dua arah pada uji efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu kedua…….. 58

17. Uji DMRT efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu kedua……. 59

18. Hasil uji anava dua arah pada uji efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu ketiga…… 60

19. Uji DMRT efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu kedua……. 61

20. Hasil uji anava satu arah ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu pertama setelah inokulasi..... 62

21. Uji DMRT ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu pertama setelah inokulasi…… 62

22. Hasil uji anava satu arah ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu kedua setelah inokulasi…….. 63

23. Uji DMRT ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu kedua setelah inokulasi…… 63

24. Hasil uji anava satu arah ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu ketiga setelah inokulasi……... 64

25. Uji DMRT ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu ketiga setelah inokulasi…… 64

26. Hasil uji anava satu arah ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu keempat setelah inokulasi….. 65

27. Uji DMRT ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu keempat setelah inokulasi……... 65

28. Hasil uji anava satu arah pengukuran tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 1 MSI…….. 66

29. Uji DMRT tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 1 MSI…….. 66

30. Hasil uji anava satu arah pengukuran tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 2 MSI…….. 67

31. Uji DMRT tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 2 MSI…….. 67

32. Hasil uji anava satu arah pengukuran tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 3 MSI…….. 68

33. Uji DMRT tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 3 MSI…….. 68

34. Hasil uji anava satu arah pengukuran tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 4 MSI…….. 69

35. Uji DMRT tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 4 MSI…….. 69

DAFTAR GAMBAR

No		Hal
1.	Tanaman dan umbi kentang yang terserang *R. solanacearum*.....	13
2.	Alur penelitian…….	17
3.	Karakter skoring gejala penyakit layu bakteri pada tanaman kentang (*S. tuberosum*)…….	25
4.	Sample umbi kentang yang bergejala *R. solanacearum* dan isolat bakteri pada medium TZC……..	27
5.	Hasil uji biovar dan hasil uji urease……	29
6.	Hasil visualisasi PCR……	33
7.	Kurva standar *Ralstonia solanacearum*……...	35
8.	Teknik perendaman akar saat infeksi bakteri pada tanaman kentang……	37
9.	Diagram laju kematian tanaman kentang…….....	40
10.	Perkembangan laju gejala Per-minggu……...	42
11.	Pohon Filogeni Rs1A	58
12.	Teknik perendaman akar pada tahap infeksi bakteri……	59
13.	Tanaman kentang setelah dua hari infeksi bakteri……...	59
14.	Gejala layu pada tanaman kentang…….	60

DAFTAR LAMPIRAN

No		Hal
1.	Komposisi dan pembuatan media……	46
2.	Cara kerja uji fisiologis dan biokimia…….....	50
3.	Pohon Filogeni	
4.	Dokumentasi infeksi bakteri pada tanaman kentang……...	54
5.	Hasil analisis statistic dengan SPSS.16……..	56
6.	Surat keaslian skripsi……	66
7.	Riwayat hidup penulis……	67

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan salah satu komoditas unggulan di Indonesia. Tanaman Kentang menghasilkan umbi yang mengandung karbohidrat yang tinggi. Tingginya kandungan karbohidrat pada tanaman kentang menjadikan kentang sebagai subtitusi sumber karbohidrat selain beras, jagung dan gandum. Manfaat lain kentang adalah digunakan sebagai makanan olahan baik skala kecil maupun skala besar seperti pembuatan tepung dan keripik. Kentang memiliki nilai perekonomian yang cukup tinggi bila dibanding komoditas lain.

Luas lahan pertanaman kentang di Indonesia berdasarkan data Badan Pusat Statistik dan Direktorat Jenderal Holtikultura pada tahun 2014 sebesar 76,291 (Ha). Jumlah ini mengalami peningkatan dibanding dengan tahun-tahun sebelumnya. Produktifitas kentang di Indonesia hanya mencapai 17.6 ton/Ha dengan produktifitas optimal 25 ton per Ha. Jawa Barat merupakan salah satu sentra produksi kentang di Indonesia, dimana pada tahun 2014 luas pertanaman kentang mencapai 11.618 (Ha). Produksi kentang di Jawa Barat mencapai 130 ton per tahun. Beberapa wilayah di Jawa Barat merupakan wilayah penghasil kentang seperti, wilayah Garut menghasilkan kentang sebanyak 115 ton, wilayah Pengalengan 129 ton, Cimenyan 110 ton dan Cilengkang 112 ton kentang. Kultivar kentang yang diproduksi di wilayah Lembang umumnya adalah kentang kultivar Granola.

Pertumbuhan kentang dapat terhambat oleh berbagai serangan penyakit. Penyebab penyakit pada tanaman kentang dapat berupa virus, bakteri, nematoda serta cendawan (Agrios, 2005). Penyakit yang sering menyerang tanaman kentang adalah: penyakit busuk daun yang disebabkan oleh jamur *Phytopthora infestans*, penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum*, penyakit busuk umbi yang disebabkan oleh jamur *Colleotrichum coccades* dan penyakit fusarium yang disebabkan oleh jamur *Fusarium* sp. (Agrios 2005; Prabowo 2007; Sanabria *et al*.,2011). Hampir semua bagian tanaman kentang dapat terinfeksi oleh patogen, baik pada fase pertumbuhan primer maupun sekunder. Meminimalisir persebaran penyakit dapat dilakukan dengan pemberian pestisida. Penyakit pada kentang dapat dikendalikan dengan pemberian pestisida, namun pemberian pestisida dengan waktu yang panjang dan dengan konsentrasi yang tinggi dapat merusak ekosistem dan lingkungan.

Penyakit yang menyerang tanaman kentang dapat menurunkan angka produktifitas kentang. Penyakit layu bakteri dapat menyebabkan kerugian yang besar karena dapat menurunkan nilai ekonomi dan kualitas dari kentang tersebut. Bakteri *R. solanacearum* memiliki intensitas serangan yang bervariasi antara 43% sampai 78% (Zulkarnain, 2007). Penyakit ini cukup berbahaya karena pada tingkat serangan berat dapat menyebabkan kematian tanaman dan kegagalan panen. Kegagalan panen kentang akibat seranagan *R. solanacearum* mencapai 33-90% (Elphinstone,2008)

Beberapa kultivar kentang yang ditanam di Indonesia, antara lain, Granola, dan Medians. Kultivar Granola adalah jenis kentang yang banyak

ditanam di Indonesia sebagai kentang sayur, kultivar ini dikenal memiliki sifat agak tahan hawar daun dan layu bakteri. Selain itu kultivar Granola memiliki keunggulan lain seperti umur panen pendek, hasil tinggi, bentuk umbi yang baik, dan tahan terhadap beberapa jenis penyakit.

Kultivar Atlantik adalah kultivar yang dimanfaatkan untuk tujuan industri keripik dan *french fries* karena mempunyai kandungan gula yang rendah dibanding kultivar lain. Akan tetapi kultivar ini kurang tahan terhadap penyakit, dibandingkan kultivar Granola. Selain itu bibit kultivar Atlantik yang diproduksi didalam negeri belum mencukupi kebutuhan sehingga masih harus diimpor dari luar negeri. Impor bibit kentang yang terus menerus tentunya berpotensi terhadap masuknya hama dan penyakit baru ke wilayah Republik Indonesia yang akan merugikan petani untuk jangka waktu panjang.

Balai Penelitian Tanaman Sayur Lembang pada tahun 2013 telah menemukan kultivar Medians yang diharapkan dapat mengurangi ketergantungan terhadap impor bibit kentang industri. Kultivar Medians mulai diperkenalkan kepada petani kentang sebagai pengganti kultivar Atlantik dibeberapa sentra pertanaman kentang di Indonesia. Kultivar Medians lebih tahan terhadap penyakit busuk daun dari pada Atlantik, namun ketahanan terhadap layu bakteri *R. solanacearum* tidak diketahui.

Berdasarkan kondisi dan situasi tersebut, penelitian mengenai identifikasi penyakit kentang yang disebabkan oleh bakteri *R. solanacearum* perlu dilakukan, sehingga penanganan dini untuk mengeliminasi penyebaran penyakit tersebut dapat dilakukan. Identifikasi dilakukan dengan uji

fisiologiss biokimia dan konfirmasi dengan PCR menggunakan primer general 16 RNA. Selain itu perlu dilakukan identifikasi kentang kultivar tahan bakteri layu, sehingga dapat menjadi solusi pengendalian penyakit ini didaerah endemis.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah

1. Bagaimana cara mengidentifikasi bakteri *R. solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri pada kentang (*S. tuberosum*)?
2. Berapakah konsentrasi *R. solanacearum* yang tepat untuk digunakan dalam uji ketahanan tanaman kentang di rumah kaca?
3. Apakah tiga kultivar tanaman kentang yang digunakan dalam penelitian ini tahan terhadap infeksi *R. solanacearum?*

C. Tujuan

Tujuan penelitian ini, adalah :

1. Identifikasi bakteri penyebab penyakit layu bakteri pada tanaman kentang.
2. Mendapatkan konsentrasi subletal dan metode yang efektif dari bakteri *R. solanacearum* untuk menginfeksi tanaman kentang.
3. Identifikasi ketahanan tiga kultivar kentang terhadap penyakit layu bakteri di rumah kaca.

D. Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi masyarakat atau peneliti yang akan melakukan penelitian mengenai identifikasi bakteri peyebab penyakit layu bakteri pada tanaman kentang dan memberikan informasi mengenai tiga kultivar kentang yang tahan terhadap penyakit layu bakteri yang disebabkan *R. solanacearum.*

BAB II
KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA BERPIKIR DAN PERUMUSAN HIPOTESIS

A. Kajian Pustaka

1. Tanaman Kentang (*S. tuberosum*)

Kentang merupakan tanaman umbi-umbian dan tergolong tanaman berumur pendek. Tumbuhnya bersifat menyemak, menjalar serta memiliki batang berbentuk segi empat. Batang dan daunnya berwarna hijau kemerahan atau berwarna ungu. Umbinya berawal dari cabang samping yang masuk dalam tanah, yang berfungsi sebagai tempat menyimpan karbohidrat sehingga umbinya membengkak dan dapat mengeluarkan tunas yang nantinya akan membentuk cabang yang baru (Aini, 2012).

Taksonomi tanaman kentang (Sharma,2002) secara umum dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Class	: Dicotyledonae
Ordo	: Solanales
Family	: Solanaceae
Genus	: *Solanum*
Species	: *Solanum tuberosum* L.

Kentang terdiri dari beberapa jenis dan beragam kultivar. Jenis-jenis tersebut memiliki perbedaan bentuk, ukuran, daya simpan, warna kulit, sifat pengolahan serta umur panen. Kentang memiliki perbedaan berdasarkan

warna kulit dan daging umbi, yaitu kentang kuning, kentang putih dan kentang merah. Jenis kentang yang banyak digemari adalah kentang kuning yang memiliki rasa yang enak, gurih, empuk dan sedikit berair (Aini,2012). Berikut adalah deskripsi tanaman kentang :

a. Daun

Tanaman kentang umumnya berdaun rimbun. Helaian daun bulat lonjong dengan bagian ujung daun meruncing, memiliki anak daun primer dan sekunder, daun tersusun secara berhadapan (daun majemuk) yang menyirip ganjil. Warna daun hijau keputih-putihan. Tanaman kentang memiliki pucuk aksilar yang berkembang menjadi cabang sekunder (Rukmana,1997). Daun memiliki aksesori berupa rambut dengan bagian permukaan daun berkerut-kerut. Daun memiliki fungsi sebagai tempat asimiliasi untuk pembentukan karbohidrat, lemak, protein, dan vitamin yang digunakan untuk pertumbuhan vegetatif, respirasi dan persediaan tanaman.

b. Batang

Batang tanaman berbentuk segi empat atau segi lima, tergantung dari kultivar kentang tersebut. Batang tanaman berbuku-buku, berongga, dan tidak berkayu, namun agak keras bila dipijat. Tinggi tanaman kentang berkisar 50-120 cm, batang tanaman berfungsi sebagai jalan zat-zat hara dari tanah menuju daun dan untuk menyalurkan hasil fotosintesis dari daun ke bagian tanaman yang lain (Rukmana,1997).

c. Akar

Tanaman kentang memiliki sistem perakaran primer dan sekunder. Akar primer tersebut dapat menembus tanah hingga kedalaman 45 cm,

sedangkan akar sekunder tumbuh menyebar (menjalar) kearah samping dan menembus tanah dangkal. Akar tanaman berfungsi untuk menyerap zat-zat hara beserta air ditanah, dan sebagai penyokong berdirinya tanaman. (Samadi,1997)

d. Bunga

Bunga kentang tergolong *monoecious* atau berumah satu dengan dua kelamin didalam satu individu. Bunga tersusun didalam rangkaian bunga atau karangan bunga yang tumbuh pada bagian ujung batang. Setiap karangan bunga terdiri dari 7-15 kuntum bunga. Warna dari bunga kentang tersebut bervariasi, seperti : putih, merah, dan biru. Struktur bunga terdiri dari daun kelopak (*calyx),* daun mahkota (*corolla),* benang sari (*stamen)* berjumlah lima buah dan satu buah putik.

Penyerbukan tanaman kentang dapat dilakukan sendiri ataupun silang. (Rukmana,1997). Alat penyerbukan yang terinfeksi bakteri dapat menjadi salah satu sistem persebaran penyakit dan menurun ke anakannya. Bunga yang sudah mengalami pernyerbukan akan menghasilkan buah dan biji-biji. Buah kentang berbentuk bulat, berdiameter 2.5 cm, berwarna hijau tua sampai keungu-unguan dan tiap buah berisi 500 bakal biji. Biji kentang berukuran kecil, berwarna krem dan memiliki masa dormansi selama 6 bulan (Rukmana,1997).

e. Umbi

Umbi terbentuk dari cabang samping diantara akar-akar. Proses pembentukan umbi ditandai dengan terhentinya pertumbuhan memanjang dari akar sekunder yang diikuti pembesaran sehingga membengkak. Umbi

memiliki fungsi sebagai tempat penyimpanan cadangan seperti : karbohidrat, protein, lemak, vitamin, mineral dan air (Samadi, 1997). Umbi kentang memiliki morfologi yang bervariasi, dilihat dari bentuk, warna kulit, warna daging, dan mata tunasnya (Rukmana,1997). Keragaman morfologi tersebut dapat terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Keragaman Morfologi Umbi Kentang (Rukmana,1997).

No	Bagian Umbi	Ciri-ciri Visual
1.	Bentuk Umbi	Bulat, bulat lonjong, dan lonjong memanjang
2.	Warna kulit umbi	Putih, kuning, dan merah
3.	Warna daging umbi	Putih, putih kekuning-kuningan dan kuning
4.	Mata tunas	Dangkal, menengah (medium) dan dalam

2. Kultivar Kentang Yang Digunakan Dalam Penelitian

Kultivar kentang yang digunakan dalam penelitian adalah kultivar Atlantik, Medians dan Granola. Karakteristik yang dimiliki setiap kultivar tersebut adalah sebagai berikut (Anonim, 2011).

a. Kentang kultivar *Granola*

Granola memiliki batang yang cukup kuat, bunga berwarna ungu dan dapat berbuah. Kultivar ini lebih tahan terhadap penyakit yang menyerang kentang. Umur panen normalnya 90 hari, daging umbi berwarna kuning muda dengan bentuk umbi bulat dengan ukuran yang bervariasi.

b. Kentang kultivar Atlantik

Kentang kultivar Atlantik memiliki warna kulit umbi berwarna kuning yang lebih terang dan bersih dibanding dengan kultivar Granola. Warna daging umbi Atlantik berwarna putih dengan bentuk umbi bulat. Kentang kultivar Atlantik dapat dipanen setelah berumur 100 hari. Kekurangan dari kultivar ini adalah mudah terserang berbagai penyakit termasuk layu bakteri. Kultivar Atlantik cocok dijadikan sebagai keripik kentang karena memiliki kandungan gula yang cukup rendah dibanding kultivar lain.

c. Kentang kultivar Medians

Kentang kultivar Medians memiliki ciri-ciri warna kulit umbi berwarna kuning, sedangkan warna daging umbi kentangnya berwarna putih. Umur panen kultivar ini 100-110 hari. Bentuk umbi dari kultivar Medians adalah oval. Kultivar Medians lebih tahan terhadap penyakit busuk daun dibandingkan Atlantik. Ketahanan terhadap penyakit layu bakteri tidak diketahui.

3. Bakteri *R. solanacearum*

Ralstonia solanacearum merupakan penyebab penyakit layu bakteri pada tanaman suku Solanaceae, sebelumnya dikenal dengan *Pseudomonas solanacearum* merupakan bakteri tular tanah (Denny & Hayward, 2001; Sanabria et al., 2011). *Ralstonia solanacearum* dapat hidup di tanah dalam waktu yang cukup lama (Walker, 1957). Pada iklim tropis, subtropik, dan daerah beriklim hangat bakteri ini tergolong bakteri yang penting (Jeung *et al., 2007). Ralstonia solanacearum* menyerang berbagai

macam tanaman pertanian yang memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi, seperti tomat, kentang, lada, tembakau, terung, pisang, jahe, dan kacang (Jeung *et al.,* 2007). Patogen ini dapat menyebabkan kematian pada tanaman inangnya (Denny & Hayward, 2001). Menurut Bergey's (2005) *R. solanacearum* diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Divisio	: Proteobacteria
Class	: Betaproteobacteria
Ordo	: Burkholderiales
Family	: Burkholderiaceae
Genus	: *Ralstonia*
Species	: *R. solanacearum*

Ralstonia solanacearum tergolong bakteri gram negatif, berbentuk batang, memiliki flagel serta bersifat aerobik, tidak memiliki kapsul serta apabila dikultur dalam media pertumbuhan membentuk kolonisasi berlendir berwarna putih. Bakteri ini tergolong bakteri tular tanah yang menginfeksi pada bagian akar, bergerak secara sistemik melalui xylem, bersifat nonmotil pada tanaman, namun pada media pertumbuhan bersifat motil (Kersten *et al.,* 2001).

Bakteri *R. solanacearum*, menghasilkan ekstraseluler polisakarida yang berperan dalam aktifitas patogenis, terutama dalam menghambat translokasi unsur hara dan air, juga menjadi pelindung bakteri dari keadaan yang ekstrim, serta dapat menetralisir senyawa-senyawa yang dikeluarkan oleh tanaman (Wijono, 2009). Sel-sel tanaman yang rusak kemudian terisi oleh

massa bakteri (oose) sehingga menyebabkan terhambatnya translokasi hara dan mineral dari dalam tanah.

Berdasarkan patogenitas pada tanaman inang, *R. solanacearum* dibagai menjadi 3 (tiga) ras. Ras 1 menginfeksi banyak tanaman solanceae seperti tomat, tembakau, paprika dan gulma. Ras 2 menyebabkan kelayuan pada pisang triploid (*Musa* spp) dan *Heliconia* spp. Ras 3 menginfeksi tanaman kentang dan tomat tetapi memiliki virulensi lemah pada tanaman solanaceae lainnya (Buddenhagen *et al*., 1962).

Biovar merupakan variasi strain prokariotik yang memiliki perbedaan pada sistem fisiologi dan biokimia pada suatu spesies. Berdasarkan kemampuan menggunakan sumber karbohidrat disakarida (maltosa, laktosa, dan selobiosa) serta kemampuan mengoksidasi hexosa alkohol (manitol, sorbitol dan dulsitol) *R. solanacearum* dapat dibedakan menjadi 5 biovar. Beberapa strain dapat menghasilkan gas dari nitrat.

Tabel 2. Biovar *R. solanacearum* berdasarkan produktifitas asam dalam medium kultur (EPPO,2004)

Susunan Gula	Biovar				
	1	2	3	4	5
Maltosa	-	+	+	-	+
Laktosa	-	+	+	-	+
Selobiosa	-	+	+	-	+
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulsitol	-	-	+	+	-

4. Gejala penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum*.

Penyakit layu bakteri atau *Bacterial wilt* merupakan salah satu penyakit yang dapat menyerang tanaman kentang. Gejala serangan dapat muncul sejak umur tanaman lebih dari satu bulan. Gejala awal, terlihat dari adanya kelayuan pada pucuk muda, selanjutnya menjalar ke bagian bawah tanaman sampai seluruh daun layu dan mati. Jaringan pada bagian dalam umbi tampak busuk berwarna coklat. Indikator untuk mengetahui kelayuan yang muncul akibat dari *R. solanacearum* adalah dengan memotong batas pangkal batang dengan tanah, lalu batang tersebut dimasukkan kedalam tabung yang berisi aquades. Massa sel bakteri (*oose)* akan keluar melalui jaringan pembuluh pada batang tersebut.

Gambar 1.Tanaman dan umbi kentang yang terserang *R. solanacearum* (Suwandi 2001; Potatoes South Africa 2015)

Menurut Semangun (2006), gejala layu memiliki ciri-ciri seperti, daun bagian atas melengkung kebawah sedangkan pada daun bagian bawah berubah warna menjadi kecoklatan. Batang pada tanaman akan berubah kecoklatan, berlendir, mengeluarkan bau yang khas serta menjadi lunak dan kebasah-basahan. Umbi yang terserang layu bakteri memiliki gejala

perubahan warna coklat sampai keabu-abuan dan mengeluarkan lendir. Suhu optimum penyakit ini adalah 15°C – 27°C dengan kelembaban tanah yang tinggi.

B. Kerangka Berfikir

Kentang merupakan komoditas sayuran dengan berbagai macam manfaat, salah satunya sebagai sayuran dan subtitusi karbohidrat. Kentang digunakan sebagai makanan olahan, baik usaha skala kecil maupun skala besar seperti pembuatan tepung dan keripik. Berdasarkan manfaat dari kentang, kebutuhan kentang yang tinggi harus berbanding lurus dengan produktifitas kentang tersebut. Namun produktifitas kentang dapat terhambat dengan adanya serangan penyakit yang disebabkan bakteri.

Produktifitas kentang di Indonesia mengalami fluktuatif karena adanya serangan beberapa jenis penyakit yang disebabkan bakteri, seperti layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum.* Penyakit ini dapat menyebabkan kematian dan menurunkan nilai ekonomi dan kualitas kentang. Penyakit layu bakteri dapat menyebabkan penurunan jumlah panen mencapai 90% yang dapat menyerang berbagai kultivar kentang. Kultivar Granola adalah salah satu kentang kultivar unggul yang di tanam oleh petani sebagai kentang sayur. Kultivar Granola memiliki keunggulan, yaitu umur panen pendek, hasil panen tinggi, bentuk umbi yang baik dan tahan penyakit virus. Sedangkan kultivar Atlantik dan Medians adalah kultivar yang ditanam untuk tujuan industri. Kultivar Atlantik tergolong kultivar

yang tidak tahan penyakit, diantaranya adalah layu bakteri. Sehingga untuk memenuhi kebutuhan bibit kentang industri dilakukan impor dari Negara lain.

Aktivitas impor secara terus menerus dapat mengakibatkan masuknya patogen pembawa penyakit ke Indonesia yang dapat merugikan petani. Kultivar kentang Medians diharapkan dapat mengurangi aktivitas impor bibit kentang industri. Kultivar ini tergolong tahan terhadap penyakit busuk daun namun belum teridentifikasi untuk penyakit layu bakteri. Penggunaan kultivar tahan dapat mengendalikan penyakit tanaman terutama diwilayah endemis.

C. Perumusan Hipotesis

Rumusan hipotesis dalam penelitian ini adalah:

(1) Bakteri *R. solanacearum* dapat diperoleh dari hasil isolasi umbi tanaman kentang terinfeksi.

(2) Konsentrasi dan metode infeksi yang berbeda akan memberikan efektifitas yang berbeda terhadap persentase kematian tanaman yang diinfeksi.

(3) Uji ketahanan melalui infeksi akar tanaman dapat mengidentifikasi kultivar kentang yang tahan terhadap infeksi penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum*.

BAB III
METODE PENELITIAN

A. Tujuan Operasional

1. Memperoleh isolat *R. solanacearum* dari umbi kentang.
2. Menentukan kurva standar isolat *R. solanacearum*
3. Menghitung keterjadian penyakit pada tiga kultivar kentang
4. Menghitung keparahan penyakit pada tiga kultivar kentang.

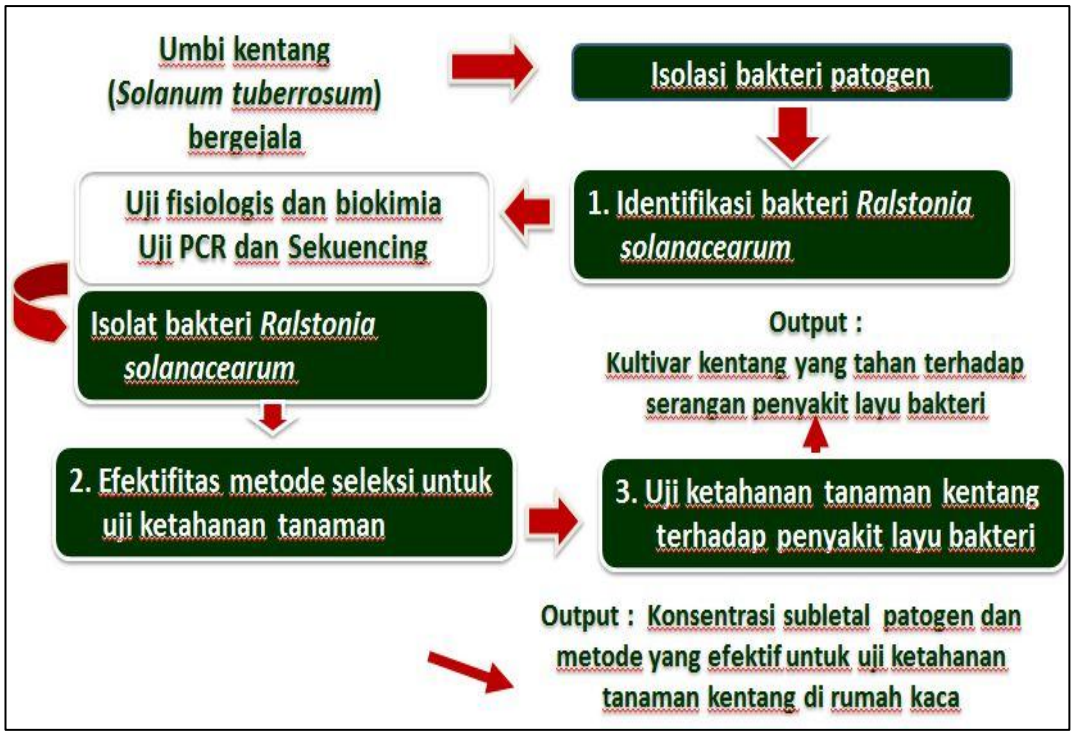
B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian, Rawamangun, Jakarta Timur dan rumah kaca di Universitas Negeri Jakarta pada bulan Januari – Oktober 2016.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen, dengan teknik Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor. Tanaman kentang yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultivar Granola, Atlantik dan Medians yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Sayur Lembang

Penelitian ini terdiri dari 3 (tiga) percobaan utama yaitu (1) Identifikasi bakteri *R. solanacearum* pada tanaman kentang terinfeksi; (2) Efektifitas metode seleksi untuk uji ketahanan tanaman terhadap penyakit layu bakteri; (3) Uji ketahanan beberapa kultivar kentang terhadap penyakit layu bakteri *R. solanacearum*. Alur penelitian disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Alur penelitian

D. Prosedur Penelitian

1. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, gelas beaker, *micropippet*, labu erlenmeyer, jarum ose, jarum tanam tajam, tusuk gigi, spatel *drygalski*, lampu spiritus, timbangan, *magnetic stirer, vortex*, inkubator, autoklaf, *microwave,* lemari pendingin, *waterbath, laminar air flow*, UV cabinet Camag, *platform shaker* Innova 2100, pH meter Schoot Lab 860, spektrofotometri Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis, *dry block heating thermostat* Biosan Bio TDB-100, PCR Thermalcycler AB Verity, *submarine electrophoresis system* Advanced

Mupid®-exU, Gel Logic Carestream 212 Pro, dan kamera digital Nikon coolpix L320 16.1 MP 26x zoom.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades steril, *Phospat Buffer Saline* (PBS), medium TZC (*Tetrazolium Chloride*) agar, medium King's B agar, medium CPG , medium Urea *Broth*, medium O/F (Oksidatif Fermentatif), medium NBY (*Nutrient Broth Yeast*), medium YDC (*Yeast-Dextrose-Calcium Carbonate*), medium *Nitrate Reduction,* medium *Polyhidroxy butyrate,* larutan *starch,* larutan HCl 35%, larutan *Sudan black,* larutan xylol*,* larutan safranin, larutan larutan KOH 3%, larutan gram, larutan H_2O_2 10%, larutan lugol iodine, larutan *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, paraffin oil,* Ethidium Bromide (EtBr), Tris Acetate EDTA (TAE) 1x, agarosa, PCR *cocktail,* alkohol 70%, klorox 1%, medium tanam (tanah humus).

2. Cara Kerja

Percobaan 1. Identifikasi bakteri *R. solanacearum* pada tanaman kentang terinfeksi penyakit layu bakteri

Bakteri *R. solanacearum* diisolasi dari umbi kultivar Granola bergejala busuk coklat asal Lembang. Sampel bergejala ditimbang sebanyak 10 gram, kemudian sampel digerus kasar dan ditambah 100 ml *Phospat Buffer Saline* (PBS) 1X steril. Setelah digerus, sampel di inkubasi pada *rotary shaker* selama 2 jam dengan kecepatan 150 rpm. Suspensi sampel diambil sebanyak 1 ml dan diencerkan dalam 9 ml akuades steril sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1}. Pengenceran dilanjutkan secara sekuensial sampai 10^{-5}.

Hasil pengenceran 10^{-1}, 10^{-3}, dan 10^{-5} diambil sebanyak 0,1 ml kemudian diinokulasikan ke medium TZC agar dengan menggunakan teknik *spread plate* dan diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 28°± 2° C. Koloni bakteri berwarna putih, *fluidal,* dengan bagian tengah berwarna merah muda, dipilih dan dimurnikan dengan melakukan beberapa kali subkultur pada media CPG agar.

Isolat yang diduga *R. solanacearum* diidentfikasi dengan uji fisiologis dan biokimia untuk mencocokkan karakter isolat dengan referensi Schaad *et al,.* (2001) dan Garrity *et al,.* (2005). Uji yang dilakukan diantaranya adalah uji gram, pertumbuhan aerob-anaerob, urease, oksidase, *arginine dihydrolase,* pertumbuhan pada suhu 40° C, fluoresensi pada medium King's B, pertumbuhan pada medium *Yeast extract dextrose CaCO3* (YDC), reduksi nitrat, dan akumulasi poly β hidroksi butirat.

Konfirmasi isolat dilakukan dengan dengan teknik PCR pada fragmen dengan ukuran 1500 bp menggunakan primer general 16 RNA, yaitu: 27F_8027: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R_1510_14920: (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Schaad *et al.*, 2001) dilanjutkan dengan *sekuencing*. Ekstraksi DNA menggunakan metode *blood and tissue kit Qiagen* sesuai dengan pedoman pabrikan. PCR menggunakan Maxima Hot Start Green PCR MasterMix Thermoscientific, dengan komposisi PCR yang digunakan tertera pada Tabel 3, amplifikasi menggunakan mesin *Esco Healthcare Swift Maxpro* dengan protokol,sebagai berikut: predenaturasi pada 95°C selama 5 menit, 35 kali siklus PCR (denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* 55°C selama 45 detik, *extention* 72°C selama 90 detik),

dan *final extention* pada 72°C selama 7 menit. Alat elektroforesis digunakan pada tegangan 70 volt selama 37 menit. Perendaman gel agarosa dalam etidium bromide 1 % selama 30 menit. Visualisasi fragmen DNA menggunakan sinar ultraviolet dengan Gel Logic Carestream 212 Pro.

Uji patogenitas dilakukan untuk mengetahui virulensi dan patogenitas isolat yang diperoleh dan efektifitas metode untuk seleksi tanaman terhadap ketahanan tanaman.

Tabel 3. Resep PCR *R. solanacearum*

Bahan	Volume
Maxima	12.5 µl
NFW	9.5 µl
27F	1.0 µl
142R	1.0 µl
DNA template	1.0 µl
Total	25.0µl

Percobaan 2. Efektifitas metode seleksi untuk uji ketahanan tanaman.

Percobaan ini membandingkan efektifitas metode infeksi dan konsentrasi inokulum yang efektif. Metode pertama adalah dengan menyiram suspensi bakteri *R. solanacearum* sebanyak 20 ml ke tanaman kentang yang berumur 21 HST. Suspensi bakteri disiram mengelilingi pangkal batang tanaman kentang. Bakteri pada metode penyiraman dapat masuk kedalam tanaman melalui percabangan akar muda akibat dari pembelahan perisekel yang mendesak korteks dan epidermis, dalam

pembentukan cabang akar tersebut dapat terjadi perlukaan. Perlukaan juga dapat timbul dari aktifitas hewan didalam tanah yang dapat melukai akar akibat dari gigitan semut atau hewan lain didalam tanah.

Metode kedua adalah dengan merendam akar kentang pada umur 21 HST. Tanaman kentang dicabut dari media tanam, lalu dibersihkan untuk memisahkan akar dengan tanah, selanjutnya dilakukan sterilisasi permukaan dengan chlorox 1% lalu dibilas dengan akuades steril. Sebagian ujung akar tanaman dipotong untuk memberi perlukaan. Perlukaan ini dijadikan sebagai area masuk bakteri ke dalam tanaman inang tanpa mengganggu aktivitas penyerapan air tanaman tersebut. Tanaman kentang yang telah dipotong sebagian ujung akarnya direndam dalam suspensi bakteri selama 2 jam dengan konsentrasi yang sama, selanjutnya tanaman ditumbuhkan di rumah kaca.

Bakteri menginfeksi tanaman melalui lubang-lubang alamiah atau perlukaan. *Ralstonia solanacearum* tergolong kedalam bakteri tular tanah sehingga dibutuhkan perlukaan pada sistem perakaran untuk bakteri dapat menginfeksi tanaman. *Ralstonia solanacearum* akan mengeluarkan extraseluler polisakarida sebagai aktifitas patogenesis pada permukaan sel tanaman. Bakteri *R. solanacearum* berpindah antara satu sel dengan sel lain melalui ruang antar sel, sehingga bakteri tersebut akan terakumulasi didalam jaringan pembuluh xylem. Bakteri berpindah dari akar menuju pucuk dengan bantuan translokasi air dixylem.

Kerapatan inokulum yang digunakan dalam percobaan adalah $5x10^6$, $5x10^7$, dan $5x10^8$ cfu ml^{-1} sebagai kontrol digunakan aquadest steril.

Pengamatan dilakukan 1 minggu setelah inokulasi (MSI) dan diamati persentase kematian tanaman. Metode dan konsentrasi yang dapat menimbulkan kematian tanaman sebesar 70-80% (konsentrasi subletal) akan digunakan untuk pengujian selanjutnya. Tanaman kentang yang digunakan untuk uji patogenitas ini yaitu tanaman kentang kultivar Atlantik. Pengujian dilakukan dengan 3 kali pengulangan.

Tabel 4. Rancangan uji efektivitas metode infeksi (penyiraman dan perendaman) suspensi *R. solanacearum* untuk uji ketahanan pada tanaman kentang.

Metode infeksi	Jumlah bakteri (cfuml^{-1})				Persentase kematian (%)
	Kontrol	5x10^{8}	5x10^{7}	5x10^{6}	
Penyiraman	AS0	AS1	AS2	AS3	
Perendaman akar	AR0	AR1	AR2	AR3	

Keterangan: kontrol = akuades steril

Percobaan 3. Uji ketahanan beberapa kultivar kentang terhadap penyakit layu bakteri *R. solanacearum*.

Uji ketahanan tanaman kentang dilakukan dengan menginfeksikan *R. solanacearum* terhadap tiga kultivar tanaman kentang dengan metode dan konsentrasi terpilih hasil percobaan 2. Kultivar yang digunakan yaitu Granola, Medians dan Atlantik. Tanaman yang digunakan sebanyak 10 tanaman ditiap kultivar kentang.

Infeksi penyakit dilakukan pada tanaman kentang umur 21 HST. Pengamatan dilakukan pada saat fase vegetatif dari tanaman kentang.

Pengamatan tanaman pada saat fase vegetatif dilakukan dengan mengukur tinggi tanaman, setelah 1 minggu inokulasi. Pengamatan gejala pada tanaman kentang berupa kelayuan pada daun atau seluruh tanaman. Pengukuran tinggi tanaman dilakukan pada tahap ini untuk mengetahui pengaruh infeksi terhadap pertumbuhan tanaman kentang. Untuk menentukan keterjadian penyakit tanaman kentang yang memiliki gejala dihitung jumlahnya, di bandingkan dengan seluruh tanaman kentang pada percobaan. Identifikasi ketahanan tanaman dilakukan dengan pengukuran Keterjadian Penyakit (*Disease Incidence*) dan Keparahan penyakit (*Disease Severity*) mengikuti Thaveechai (1989).

Rumus keterjadian penyakit : (Sinaga,2003)

$$\textbf{(KP)}\ \mathrm{KP} = \frac{\mathrm{n}}{\mathrm{N}} \times 100\%$$

Keterangan:
KP = keterjadian penyakit.
n = jumlah tanaman yang sakit.
N = jumlah tanaman yang diamati.

Tabel 5 Tingkat ketahanan klon kentang terhadap serangan bakteri layu *R. solanacearum* (Thaveechai, 1989).

Persentase kejadian Penyakit (%)	Tingkat Ketahanan
0 – 20	Tahan (T)
21 – 40	Agak Tahan (AT)
41 – 60	Agak Rentan (AR)
61 – 100	Rentan (R)

Keparahan penyakit (*Disease Severity*) menunjukkan keparahan gejala penyakit yang ditunjukkan tiap tanaman. Pengamatan skoring tanaman bergejala dilakukan dua dan empat minggu setelah inokulasi. Skor gejala penyakit tanaman kentang ditentukan dengan skala linear 0 hingga 4 (He *et al,1983 ;* Horita dan Tsuchiya,2001):

0 = tanaman tidak terserang penyakit sama sekali.

1 = satu daun bagian atas menguning dan layu.

2 = dua atau tiga daun layu.

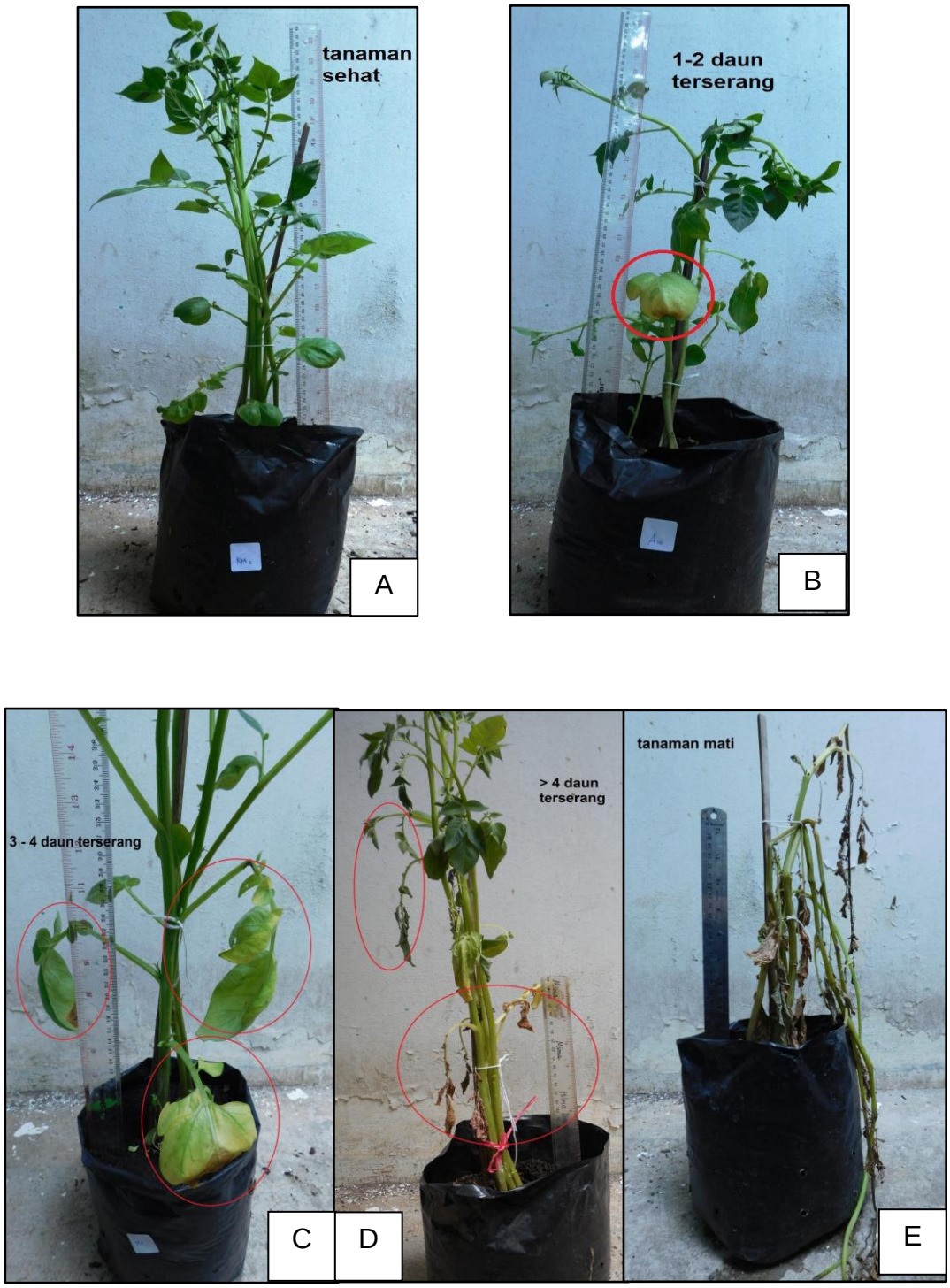
3 = empat atau lebih daun layu.

4. Tanaman mati.

Proporsi tanaman yang terkena penyakit dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Agrios,2005) :

$$\boldsymbol{KeP} = \frac{\sum(\mathbf{n}\ \boldsymbol{x}\ \mathbf{v})}{\mathbf{Z}\ \boldsymbol{x}\ \mathbf{N}}\ \boldsymbol{x}\ \mathbf{100}\%$$

Keterangan:
KeP : Keparahan Penyakit
n : jumlah jaringan terserang pada setiap kategori (skor)
v : kategori (skor) serangan
Z : nilai kategori serangan tertinggi
N : jumlah seluruh tanaman atau bagian tanaman yang diamati.



Gambar 3. Karakter skoring gejala penyakit layu bakteri pada tanaman kentang (*S. tuberosum*).

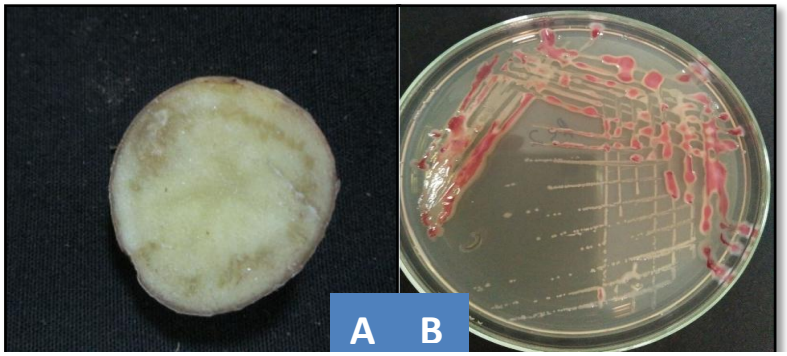
A = skor 0 B = skor 1
C = skor 2 D = skor 3
E = skor 4

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap penelitian, tahap pertama yaitu identifikasi bakteri dengan uji fisiologi, biokimia dan konfirmasi PCR. Tahap kedua yaitu mencari konsentrasi subletal dan metode yang efektif untuk menginfeksi tanaman kentang. Konsentrasi subletal merupakan konsentrasi bakteri yang dapat menyebabkan kematian 70% pada tanaman. Tahap ketiga adalah uji ketahanan pada tiga kultivar kentang, yaitu Medians, Atlantik dan Granola.

1. Identifikasi bakteri *R. solanacearum* pada tanaman kentang terinfeksi penyakit layu bakteri

Sample tanaman kentang kultivar Granola bergejala layu diperoleh dari pertanaman di daerah Lembang, Bandung pada Februari 2016. Potongan melintang umbi dari tanaman layu menunjukkan gejala busuk coklat (*brown rot*) di area jaringan pembuluh umbi tersebut. Bakteri diisolasi dari umbi kentang bergejala *brown rot* menggunakan medium TZC. Hasil isolasi diperoleh beberapa koloni sel, namun hanya dua isolat yang memiliki karakter seperti *R. solanacearum*. Dua isolat diperoleh dengan karakter menyerupai koloni *R. solanacearum*, berwarna putih dengan pigmen merah muda dibagian tengah koloni. Bakteri tersebut, diberi kode Rs1A dan Rs2A diidentifikasi dengan melakukan uji fisiologis dan biokimia.



Gambar 4. A. sample umbi kentang yang bergejala *R. solanacearum* dan B. Isolat bakteri 48 jam pada medium TZC

A. Uji Fisiologis dan Biokimia

Uji fisiologis dan biokimia dilakukan untuk mengetahui karakter dari isolat RS1A dan RS2A. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kemiripan karakter antara RS1A dan RS2A dengan *R. solanacearum*. Karakteristik isolat RS1A dan RS2A dapat dilihat pada Tabel 6 dibawah ini:

Tabel 6. Hasil Uji Fisiologis dan Biokimia Rs-1A dan Rs-2A

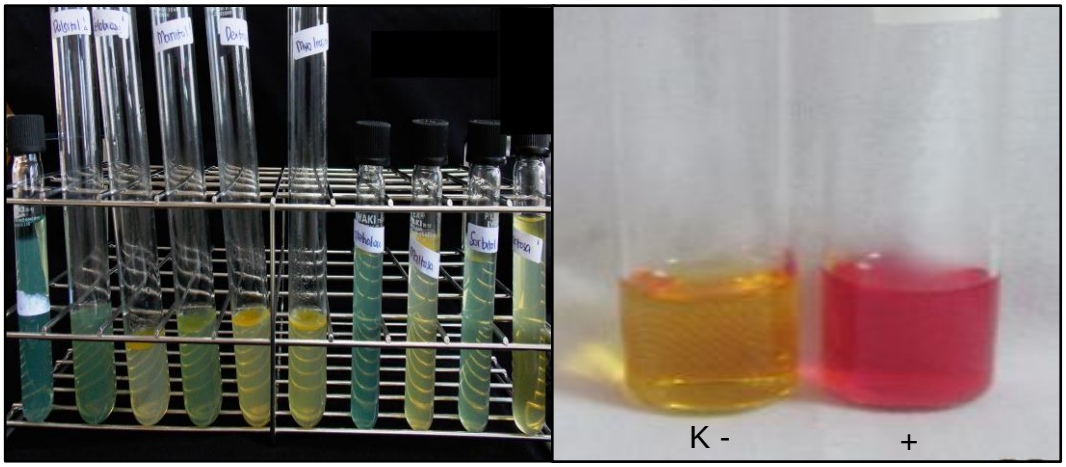
Uji Fisiologis dan Biokimia	Kode Isolat		Referensi Schadd (2001)
	Rs1A	Rs2A	
Gram	-	-	-
Motilitas	Non Motil	Non Motil	Non Motil
Urease	+	+	+
Katalase	+	+	+
Oksidati/fermentative	+/-	+/-	+/-
Oksidase	+	-	+
Akumulasi Poly β-hydroxybutirate	+	+	+
Nitrate Reduction	+	+	+
Pertumbuhan 40°	+	+	+
Fluoresensi	-	-	-

Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram, kedua isolat merupakan gram negatif, berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis sel bakteri warna merah.

Pemberian larutan methylene blue membuat sel bakteri berwarna biru, lalu larutan mordan akan mengikat warna tersebut pada sel bakteri. Pemberian alkohol pada sel bakteri mengakibatkan dinding sel bakteri luruh. Sel bakteri akan menyerap warna merah dari safranin yang akan mengubah sel bakteri menjadi merah. Lipid pada dinding sel bakteri akan larut setelah diberi alkohol sehingga dinding sel akan membesar dan terlepasnya kompleks kristal violet dan bakteri akan berwarna merah setelah diberi safranin. Bakteri gram negatif terlihat berwarna merah muda (Sunatmo,2007). Bakteri gram negatif mengandung lipid dan lemak dalam persentase yang lebih tinggi daripada bakteri gram positif (Sudarsono,2008).

Uji motilitas dilakukan dengan teknik *hanging drop.* Olesan suspensi bakteri pada kaca objek diamati dibawah mikroskop dengan melihat motilitas dua koloni tersebut. Hasil menunjukkan bahwa isolat RS1A dan RS2A non-motil.

Berdasarkan hasil pengujian urease kedua isolat menunjukkan hasil positif hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut memiliki enzim urease. Enzim urease digunakan untuk menguraikan mikromolekul urea ($(NH_2)_2CO$) menjadi karbondioksida (CO_2) dan ammonia (NH_3). Urea yang terdegradasi menjadi ammonia dan karbondioksida menyebabkan pH media menjadi basa sehingga terjadi perubahan media dari kuning menjadi pink (Duncan, 2005).



Gambar 5. A. Hasil uji biovar; B. Hasil uji urease.

Pengujian katalase dilakukan untuk mengetahui keberadaan enzim katalase yang dapat mendegradasi hidrogenperoksida yang terbentuk saat metabolisme aerob dan bersifat toksik, menjadi hidrogen dan oksigen. Kedua isolat baik RS1A ataupun RS2A menunjukkan hasil positif dalam pengujian ini. Enzim katalase dibutuhkan oleh bakteri yang hidup pada kondisi aerob. Indikator dalam pengujian ini adalah adanya gelembung udara disekitar koloni setelah ditambahkan larutan H_2O_2 3%.

Oksidasi dan fermentasi merupakan dua proses dalam metabolisme mikroorganisme dimana tujuan akhirnya adalah akumulasi energi, baik untuk aktivitas mikroorganisme maupun untuk proses-proses biologis lain. Oksidasi terjadi pada respirasi aerob menghasilkan CO_2 dan H_2O, sedangkan fermentasi terjadi pada kondisi anaerob menghasilkan etanol dan gas. Pengujian oksidasi fermentasi (O/F) dilakukan untuk mengetahui pemanfaatan karbohidrat oleh bakteri tersebut melalui proses fermentasi atau oksidasi. Kedua isolat menunjukkan perubahan warna pada medium OF dari biru kehijauan menjadi warna kekuningan hanya pada kondisi aerob.

Pengujian oksidase pada isolat RS1A menunjukkan hasil positif dan RS2A menunjukkan hasil negatif. Uji oksidase dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri menguraikan enzim oksidase. Indikator dalam pengujian ini adalah perubahan warna yang terjadi pada goresan isolat bakteri pada kertas saring menjadi ungu atau biru, maka bakteri tersebut dinyatakan positif. Keberadaan oksigen pada enzim oksidase akan mereduksi substansi organic diantaranya subtansi yang terdapat pada kertas saring. Reaksi tersebut akan menghasilkan molekul *indophenol blue* yang mengakibatkan warna kertas saring akan berwarna biru violet.

Pengujian akumulasi *Poly-hidroxybutirat* (PHB) menunjukkan hasil positif di kedua isolat bakteri. Akumulasi PHB dalam sel bakteri dipengaruhi oleh kondisi kultur dan dapat meningkat pada medium dengan sumber karbon yang berlebih serta terbatasnya salah satu nutrien seperti, nitrogen, oksigen, phospat atau sulfur. Byrom (1987), Anderson dan Dawes (1990), melaporkan bahwa PHB merupakan polimer yang disintesis oleh bakteri dan diakumulasi secara intraselular sebagai sumber karbon dan energi jika ditumbuhkan pada media dengan sumber karbon berlebih tetapi nutrien lainnya yaitu nitrogen atau fosfor terbatas. Penentuan akumulasi PHB dilakukan dengan menggunakan pengecatan *Sudan black* (Das, 2005 ; Visnuvardan,2008).

Uji reduksi nitrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam mereduksi nitrat, kedua isolat menunjukkan hasil yang positif. Nitrat merupakan senyawa yang sangat potensial untuk menggantikan peran oksigen sebagai akseptor akhir selama proses metabolisme (Cappuccino

dan Sherman, 2005). Bakteri pereduksi nitrat merupakan mikroorganisme heterotrof yang memerlukan sumber karbon organik seperti asam asetat, asam propionat, asam benzoat, gliserol, metanol dan glukosa untuk pertumbuhannya (Teixeira & Oliveira 2002). Berikut ini merupakan reaksi oksidasi senyawa nitrat menjadi nitrit oleh enzim nitrat reduktase :

$$NO^{3-} + 2H^{+} + e^{-} \xrightarrow{\text{Nitrat reduktase}} NO_2^{-} + H_2O$$

Uji fluoresensi merupakan uji yang dilakukan pada media King's B untuk mengetahui suatu bakteri tergolong kelompok bakteri berpendar atau tidak. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui keberadaan dari pigmen fluorescesin, yaitu pigmen yang dapat membuat sel bakteri berpendar pada medium yang miskin unsur Fe sehingga akan memicu bakteri menyerap Fe pada medium. Isolat menunjukkan hasil negatif dalam pengujian ini.

Berdasarkan hasil uji fisiologis dan biokimia menurut Schadd (2001), isolat RS1A memiliki karakter yang menyerupai *R. solanacearum*, sedangkan isolat RS2A memiliki perbedaan pada hasil pengujian oksidase.

B. Deteksi Biovar

Pengujian biovar dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam memanfaatkan sumber gula mengikuti Schaad (2001). Hasil pengujian menunjukkan isolat Rs1A tergolong kedalam biovar 2 sedangkan Rs2A tergolong biovar 3. Biovar 3 memiliki kemampuan untuk mereduksi seluruh kandungan gula dalam media, sedangkan biovar 2 tidak dapat mereduksi dulsitol, mannitol, trehalosa dan sorbitol (Tabel 7). Berdasarkan hasil

penelitian Gunawan (2006) di Pengalengan Bandung, biovar *R. solanacearum* yang menyerang kentang adalah biovar 2 sedangkan pada media tanam ditemukan biovar 3. *Ralstonia solanacearum* yang berasal dari kentang spesifik biovar 2 dan tergolong ras 3 dan memiliki virulen tertinggi (Kelman.1953) dan (French. 1979).

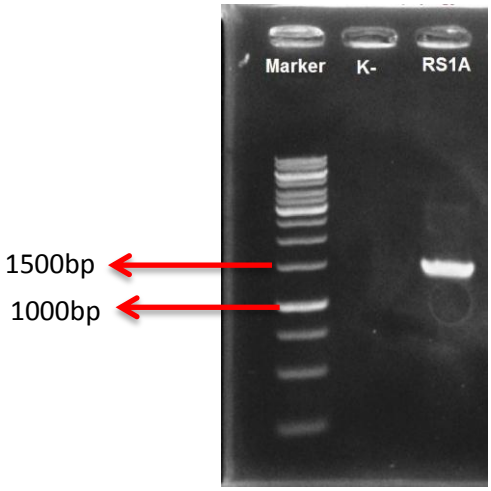
Tabel 7. Hasil Pengujian Biovar kedua isolat bakteri

Unsur Gula	Kode Sampel	
	RS1A	RS2A
Dulsitol	-	+
Selobiosa	+	+
Mannitol	-	+
Dextrosa	+	+
Myo-Inositol	+	+
Trehaliosa	-	+
Maltosa	+	+
Sorbitol	-	+
Laktosa	+	+
Biovar	2	3

C. Identifikasi Molekuler

Identifikasi dengan teknik PCR dan sekuensing dilakukan untuk mengkonfirnasi bahwa isolat RS1A merupakan bakteri *R. solanacearum.* Proses PCR menggunakan general primer bakteri yaitu: 27 F_8027 dan 1492R_1510 _14920 yang mengamplifikasi gen 16 RNA bakteri dengan amplikon 1500bp. Penggunaan general primer dilakukan karena ketika menggunakan primer spesifik *R. solanacearum* (RALSF/RALSR) tidak terjadi amplifikasi sehingga saat dilakukan visualisasi PCR tidak teramati pita DNA. Hal tersebut kemungkinan terjadi karena primer yang digunakan spesifik

untuk strain tertentu, sedangkan *R. solanacearum* adalah spesies kompleks yang memiliki keragaman tinggi dalam spesies.



Gambar 6. Hasil visualisasi PCR isolat dengan primer 27F / 142 R. Ladder 1kb.

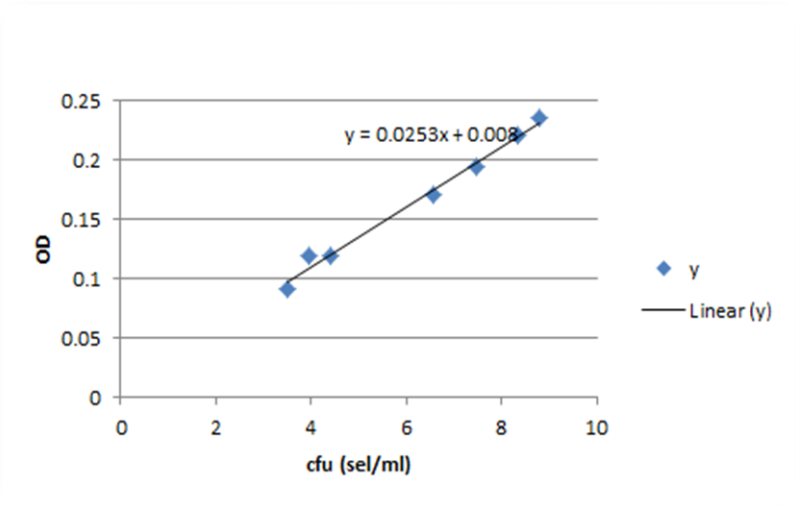
Sampel hasil PCR dikirim ke 1st Base Singapura untuk dilakukan sekuensing. Pembacaan hasil sekuensing menggunakan *software* cromaspro. Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan mencocokkan basa nitrogen dari RS1A dengan basa nitrogen *R. solanacearum* yang tersedia di *Genbank* menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang terdaftar dalam situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Hasil menunjukkan RS1A identik (homologi 100%) dengan *R. solanacearum* asesi KU132386.1 dengan *E value* 0.0 dan *Query cover* 100%. Analisis filogenetik dilakukan dengan membuat pohon filogeni dengan membandingkan *R. solanacearum* dengan beberapa spesies pada genus *Ralstonia.* Pohon filogeni menunjukkan kekerabatan RS1A dengan spesies lain. Hal ini ditunjukkan dengan RS1A berada didalam satu *clade* dengan *R. solanacearum.*

Tabel 8. Hasil sekuensing RS1A dengan NCBI

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Ident	Accession
Ralstonia solanacearum strain TW15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2440	2440	100%	0.0	100%	KU132286.1
Ralstonia solanacearum strain UYD31 complete genome	2440	7321	100%	0.0	100%	CP012687.1
Ralstonia solanacearum strainUQRS 652 16S ribosomal RNA gene. Partial sequence	2440	2440	100%	0.0	100%	KC757033.1

2. Efektifitas metode seleksi untuk uji ketahanan tanaman.

Infeksi bakteri pada tanaman kentang untuk uji patogenitas menggunakan konsentrasi inokulum *R. solanacearum* tertentu. Oleh karena itu dilakukan percobaan untuk menentukan kurva standar isolat RS1A, yang menunjukkan hubungan nilai kekeruhan (*Optical Density*) dengan konsentrasi bakteri. Persamaan yang diperoleh dari perhitungan kurva standar adalah $y = 0.025x + 0.008$.



Gambar 7. Kurva standar *R. solanacearum*

Inokulasi bakteri pada uji efektivias metode seleksi menggunakan tiga tingkat konsentrasi, yaitu $5x10^6$, $5x10^7$ dan $5x10^8$ cfu/ml. Berdasarkan persamaan kurva standar konsentrasi $5x10^8$ adalah setara dengan OD_{590} = 0.133. Suspensi bakteri kemudian disiapkan dengan melarutkan isolat berumur 24 jam didalam air steril dan diatur kerapatannya pada OD_{590} = 0.133 menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi $5x10^7$ dan $5x10^6$ diperoleh dengan mengencerkan inokulum $5x10^8$ dengan pengenceran masing-masing 1/10 dan 1/100.

Teknik infeksi akan memengaruhi keberhasilan infeksi bakteri. Penggunaan metode yang sesuai akan memberikan hasil yang baik. Dua teknik yang berbeda dibandingkan yaitu perendaman akar dan penyiraman media tanaman dengan inokulum. *Ralstonia solanacearum* merupakan bakteri tular tanah dimana bakteri tersebut terakumulasi dimedia tanah, sehingga untuk masuk kedalam jaringan tumbuhan melalui lubang-lubang alami atau melalui lubang akibat perlukaan. Teknik perendaman akar akan menimbulkan luka pada organ perakaran, bakteri akan masuk melalui

jaringan pembuluh yang ada diakar dan akan terakumulasi di jaringan tersebut.

Berdasarkan hasil perhitungan rerata keparahan penyakit, pada 1 MSI dengan teknik perendaman akar menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan teknik penyiraman pada ketiga konsentrasi. Namun pada 2 MSI tidak terjadi peningkatan yang signifikan pada teknik perendaman akar sehingga menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan teknik penyiraman. Pada minggu yang sama terjadi penurunan nilai rerata keparahan pada teknik perendaman akar, penurunan nilai ini dapat terjadi karena tanaman dapat menanggulangi resiko penyakit layu bakteri dengan sistem pertahanan tanaman tersebut.

Tabel 9. Pengaruh metode inokulasi terhadap keparahan dan persentase kematian *R. solanacearum* tanaman kentang kultivar Atlantik

Metode	Konsentrasi	N	Rerata keparahan			
			Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	% Kematian
			Rerata± SE	Rerata± SE	Rerata± SE	
Perendaman Akar	Kontrol	3	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.00^{a} \pm 0.00$	0%
	$5x10^{8}$	3	$3.00^{c} \pm 0.00$	$2.00^{b} \pm 0.00$	$3.67^{bc} \pm 0.33$	66%
	$5x10^{7}$	3	$2.00^{bc} \pm 0.58$	$2.00^{b} \pm 0.58$	$3.00^{bc} \pm 0.58$	0%
	$5x10^{6}$	3	$1.67^{b} \pm 0.89$	$2.33^{b} \pm 0.33$	$2.33^{b} \pm 0.00$	33%
Penyiraman	Kontrol	3	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.00^{a} \pm 0.00$	0%
	$5x10^{8}$	3	$0.33^{a} \pm 0.33$	$2.00^{b} \pm 0.58$	$2.33^{b} \pm 0.33$	66%
	$5x10^{7}$	3	$0.33^{a} \pm 0.33$	$0.67^{a} \pm 0.67$	$2.00^{b} \pm 1.15$	33%
	$5x10^{6}$	3	$0.00^{a} \pm 0.00$	$2.33^{b} \pm 0.33$	$2.33^{b} \pm 0.67$	0%

Keterangan : angka yang diikuti oleh huruf yang sama dan kolom yang sama tidak berbeda nyata dengan uji DMRT pada taraf 5%.

Pada teknik penyiraman terjadi peningkatan yang signifikan dibanding pada 1 MSI dengan konsentrasi $5x10^{8}$ dan $5x\ 10^{6}$. Nilai rerata keparahan tertinggi terjadi pada 3 MSI dengan teknik perendaman akar pada konsentrasi $5x10^{8}$ dengan nilai rerata keparahan 3.67 ± 0.33 dengan

presentase kematian tanaman 66% yang berbeda nyata dengan ketiga konsentrasi pada teknik penyiraman. Persentase kematian menunjukkan banyaknya tanaman yang mati, angka 33% menunjukkan satu individu yang mati sedangkan 66% menunjukkan dua individu tanaman yang mati. Berdasarkan hasil tersebut teknik perendaman akar dengan konsentrasi $5x10^8$ menjadi teknik dan konsentrasi terpilih yang akan digunakan pada uji ketahanan. Menurut Schaad (2001), konsentrasi yang efektif untuk menginokulasi *R. solanacearum* adalah 10^6 sampai 10^8.

Gambar 8. Inokulasi tanaman kentang dengan *R. solanacearum*umur 24 jam menggunakan teknik perendaman akar

3. Uji ketahanan beberapa kultivar kentang terhadap penyakit layu bakteri *R. solanacearum*.

Uji ketahanan dilakukan untuk mengetahui ketahanan tiga kultivar tanaman kentang terhadap penyakit layu bakteri. Kultivar kentang yang digunakan adalah Granola, Atlantik dan Medians. Uji ketahanan menggunakan konsentrasi subletal $5x10^8$ dengan teknik perendaman akar.

A. Skor Gejala Penyakit

Hasil pengamatan berdasarkan skor gejala penyakit dari ketiga kultivar tersebut menunjukkan tidak ada kultivar yang tergolong tahan terhadap penyakit layu bakteri (Tabel 10). Terjadi peningkatan nilai skor gejala penyakit dari 1 MSI sampai 4 MSI namun tidak nampak perbedaan yang signifikan dari ketiga kultivar tersebut.

Hasil pengamatan terhadap ketiga kultivar kentang yang diuji tidak berbeda nyata berdasarkan rerata skor gejala penyakit pada 1 MSI dan 2 MSI namun kultivar Medians menunjukkan nilai tertinggi. Pada 3 MSI nilai tertinggi rerata skor gejala penyakit terjadi pada kultivar Granola yang mengalami peningkatan yang cukup tinggi dibandingkan dengan 1 MSI dan 2 MSI. Peningkatan yang cukup tinggi ini diikuti dengan banyaknya tanaman kentang kultivar Granola yang mengalami kematian. Sedangkan pada 4 MSI peningkatan yang cukup tinggi terjadi pada kultivar Atlantik.

Tabel 10. Rata-rata skor gejala penyakit pada tanaman kentang setelah infeksi.

Kultivar	N	Skor Gejala			
		1 MSI	2 MSI	3 MSI	4 MSI
		Rerata±SE	Rerata±SE	Rerata±SE	Rerata±SE
Medians	10	1.7 [a] ±0.36	2.6 [a] ±0.33	3.1 [a] ±0.38	3.26 [a]±0.42
Atlantik	10	1.1 [a] ±0.31	1.7 [a] ±0.44	2.65 [a] ±0.56	3.65 [a]±0.35
Granola	10	1.1 [a] ±0.34	1.5 [a] ±0.26	3.3 [a] ±0.26	3.31 [a]±0.45

Keterangan : angka yang diikuti oleh huruf yang sama dan kolom yang sama tidak berbeda nyata dengan uji DMRT pada taraf 5%.

B. Keterjadian Penyakit

Nilai keterjadian penyakit menunjukkan banyaknya jumlah tanaman yang terserang penyakit dibanding dengan jumlah tanaman yang tidak terserang penyakit. Fluktuasi dari nilai keterjadian penyakit dikarenakan munculnya tunas baru yang menggantikan tanaman induk yang sudah mati. Penurunan dari nilai keterjadian penyakit dapat terjadi karena respon dari sistem pertahanan tanaman untuk meminimalisir serangan *R. solanacearum.* Kultivar Granola menunjukkan nilai yang lebih stabil dibandingkan dengan dua kultivar lainnya.

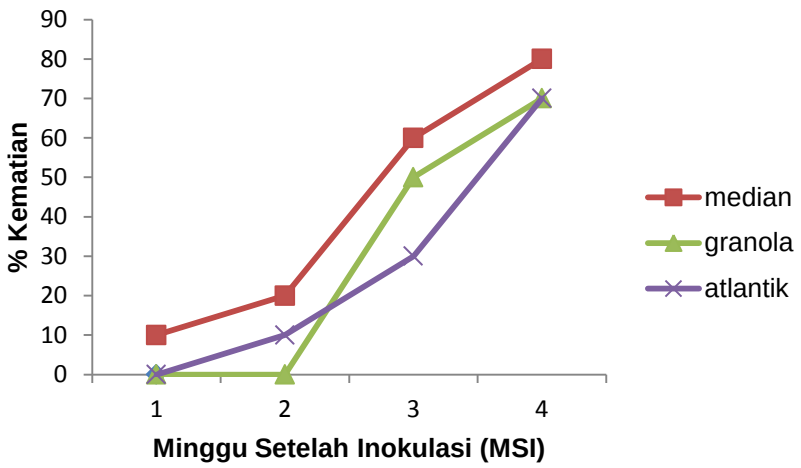
Tabel 11. Persentase Keterjadian Penyakit pada Tanaman Kentang

Kultivar kentang	N	Keterjadian Penyakit (%)			
		1 MSI	2 MSI	3 MSI	4 MSI
Medians	10	100.0	70.0	100.0	100.0
Atlantik	10	70.0	80.0	80.0	90.0
Granola	10	100.0	90.0	80.0	80.0

Medians menunjukkan persentase tertinggi sebesar 100% yang artinya semua tanaman terserang penyakit sedangkan pada Granola mengalami penurunan mulai dari minggu pertama sampai minggu ke empat. Ketiga kultivar tergolong rentan dengan keterjadian penyakit 61% -100% berdasarkan angka keterjadian penyakit menurut Thaveechai (1989).

Berdasarkan data kematian tanaman kentang (Gambar 9), kultivar Medians menunjukkan kematian yang tertinggi pada 4 MSI, diikuti dengan Atlantik dan Granola. Kematian kultivar Granola berjalan lebih lambat

dibandingkan dengan dua kultivar lainnya, dimana kematian terdeteksi setelah minggu ketiga. Pada kultivar Atlantik kematian terdeteksi pada minggu kedua dan pada kultivar Medians pada minggu pertama. Jumlah kematian tanaman pada kultivar Medians sebesar 80% sedangkan kultivar Atlantik dan Granola 70%. Dari data tersebut, dapat disimpulkan bahwa kultivar Medians lebih rentan dibandingkan dengan kultivar Atlantik dan Granola.



Gambar 9. Grafik Laju Kematian Tanaman Kentang terhadap infeksi *R. solanacearum*

C. Keparahan Penyakit

Hasil perhitungan keparahan penyakit dengan menggunakan rumus keparahan penyakit mengikuti Agrios (2005) seperti pada Tabel 13 dibawah ini, tingkat keparahan penyakit tertinggi adalah kultivar Medians dan Atlantik sebesar 90% dan Granola 80% setelah empat minggu inokulasi. Nilai keparahan penyakit menunjukkan parahnya gejala yang diperoleh pada tiap tanaman. Peningkatan nilai keparahan terjadi ditiap minggunya, menandakan

semakin parah gejala yang dimiliki oleh setiap tanaman. Penurunan nilai keparahan terjadi karena tanaman mengalami *recouvery* dengan sistem pertahanan yang dimiliki tanaman tersebut.

Tabel 12. Persentase Keparahan Penyakit pada Tanaman Kentang.

Kultivar kentang	N	Keparahan Penyakit (%)			
		1 MSI	2 MSI	3 MSI	4 MSI
Medians	10	66.0	62.5	70.0	90.0
Atlantik	10	42.0	65.0	75.0	90.0
Granola	10	40.0	67.5	80.0	80.0

Pengamatan dilakukan pada 1 MSI (Minggu setelah inokulasi) sampai 4 MSI. Pengamatan di 1 MSI menunjukkan persentase keparahan tertinggi ditunjukkan oleh kultivar Medians. Terjadi peningkatan persentase keparahan yang cukup tinggi pada kultivar Atlantik dan Granola di 2 MSI. Persentase keparahan tertinggi pada 4 MSI ditunjukkan oleh kultivar Medians dan Atlantik, hal ini menunjukkan bahwa kedua kultivar tersebut tergolong rentan.

Setiap kultivar menunjukkan gejala yang sama yaitu bagian daun akan menggulung kebawah dan kemudian akan layu, gejala dimulai dari bagian bawah tanaman. Gejala layu mulai tampak pada minggu ketiga setelah infeksi bakteri *R. solanacearum* pada tanaman kentang. Pada minggu pertama dan kedua hanya terlihat beberapa tanaman menunjukkan gejala seperti daun menggulung, nekrosis (denaturasi klorofil) hingga menjadi coklat. Gejala lain yang terlihat adalah batang tanaman menjadi kecoklatan dan tanaman mudah rebah. Banyak tanaman yang telah menunjukkan kelayuan tidak membutuhkan waktu lama akan mati.

Gambar 10. Perkembangan laju gejala pada kentang (*S. tuberosum*) cv. Medians

A 1 MSI B 2 MSI
C 3 MSI D. 4 MSI

D. Reisolasi *R. solanacearum*

Reisolasi dari tiga kultivar yang bergejala dilakukan pada tahap pengujian ini dilakukan untuk memastikan penyebab dari kematian tanaman kentang yang diuji pada penelitian ini adalah *R. solanacearum*. Sejumlah isolat diperoleh dari reisolasi, namun hanya 8 isolat yang diduga sebagai *R. solanacearum.* Koloni yang sudah dimurnikan selanjutnya dilakukan pengujian fisiologis dan biokimia.

Tabel 13. Hasil Pengujian Reisolasi

Kode Sample	Uji			
	Gram	Katalase	Oksidase	Pertumbuhan Medium TZC
ATL 1	-	++	++	+
ATL 3.1	-	+++	-	+
ATL 3.2	-	++	-	+
ATL 3.3	-	++	+	+
GRN 1	-	+	+	+
GRN 3	-	+	+	-
MDN 3.1	+	++	-	-
MDN 3.2	-	++	-	+

Keterangan
ATL : Isolat dari reisolasi kultivar Atlantik
GRN : Isolat dari reisolasi kultivar Granola
MDN : Isolat dari reisolasi kultivar Medians.

Pengujian yang dilakukan adalah uji gram, katalase dan oksidase dan pertumbuhan pada medium TZC. Karakter dari 8 isolat, hanya 3 isolat (ATL 1, GRN 1, dan ATL 3.3) memiliki karakter yang serupa dengan *R. solanacearum.* Ciri khas dari karakter *R. solanacearum* adalah bersifat fluidal ketika ditumbuhkan pada medium TZC**.** Pembuktian reisolasi menunjukkan bahwa kelayuan dan kematian yang terjadi pada tiga kultivar kentang merupakan serangan dari bakteri *R. solanacearum*. Hasil reisolasi dari Medians negatif *R. solanacearum* namun *oose* tetap keluar dari pangkal batang, hal ini dapat terjadi karena kesalahan saat memilih koloni ketika subkultur.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Isolat bakteri Rs1A merupakan bakteri *R. solanacearum* hal ini diperoleh berdasarkan hasil pengujian fisiologis, biokimia dan konfirmasi dengan teknik PCR. Hasil sekuencing menunjukkan Rs1A memiliki kemiripan 100% dengan bakteri *R. solanacearum.*

Teknik yang efektif untuk menginfeksi tanaman kentang adalah dengan teknik perendaman akar didalam inokulum bakteri dengan konsentrasi $5x10^8$ cfu/ml, berdasarkan hasil rerata keparahan tertinggi 3.67 ±0,33 dengan persentase kematian 66% pada minggu ketiga setelah inokulasi.

Kultivar yang Medians, Atlantik dan Granola dikategorikan sebagai kultivar yang tidak tahan terhadap serangan penyakit layu bakteri. Hal ini terlihat dari persentase keterjadian pada tiga kultivar sebesar 100% Medians, 90% Atlantik dan 80 % Granola. Persentase keparahan penyakit pada Medians dan Atlantik sebesar 90% dan 80% pada Granola. Medians memiliki nilai ketahanan paling rendah dibanding dengan Atlantik dan Granola berdasarkan jumlah kematian tanaman.

B. Saran

Penelitian selanjutnya sebaiknya menggunakan variasi kultivar yang lebih banyak karena tiga kultivar yang digunakan dalam penelitian ini

tergolong rentan sehingga dengan menambah variasi kultivar diharapkan akan diperoleh kultivar yang tergolong tahan dari penyakit layu bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

Agrios, N.G. 2005. *Plant Pathol. - fifth edition.* Dept of Pathol. University of Florida. United States of America.

Aini, K.H,. 2012. *Produksi tepung kentang*. UPI-Jakarta.

Anderson AJ dan Dawes E. A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol*. Rev. 54(4):450-472.

Anonim. 2011. Tanaman Kentang Indonesia. http://www.lablink.or.id/Env/Agro/Granola/cabe panen.htm.[Okt. 2011]

Buddenhagen, L., Sequiera, L., Kelman, A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum, (*Abstr.) *Phytopathol* 52:726

Beemster, A.B.R., A. Rozendaal. 1972. *Potato viruses : properties and symptoms*, hal: 115 – 134 dalam : *Viruses of potato and seed-potato prod*. Pudoc. Wageningen. Netherlands.

[BPS] Badan Pusat Statistik. 2014; DirjenHort Kementan.2014. *Luas Panen Kentang Menurut Provinsi, 2010-2014*. Indonesia

[BPS] Badan Pusat Statistik. 2014; DirjenHort Kementan.2014. *Produksi, Luas panen dan produktivitas sayuran di Indonesia.* Indonesia.

Champoiseau, P.G., Jones, J.B., and Allen, C.2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 caused tropical losses and temprate anxieties. Online. *Plant Health Progress* vol : 10

[CIP] International Potato Centre., [Balitsa] Balai Penelitian Tanaman dan Sayuran.1999. *Penyakit, hama dan nematoda utama tanaman kentang* : 124.

Das, Q., Chowdhury, J.U. dan Anwar, M.N. 2005. Isolation, Purification and Characterization of Biodegradable Polymer Producing Bacteria *Pseudomonas pseudomallei. Int. J. Agri. Biol*. 7(1):114-117

Denny, T.P., Hayward, A.C. 2001. *Ralstonia. in : Lab Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria 3rd ed*. N. W. Schadd, J.B. Jones, and W. Chun, eds, APS Press, St. Paul, MN. Pages 151-174.

Duncan, F. 2005. *MCB 1000L Application Microbiology Laboratory Manual* 4th Ed. New York: The McGraw-Hill Companies.

Duriat, A.S., T.A. Soetiarso, L. Prabaningrum, R. Sutarya. 1994. Penerapan pengendalian hama-penyakit terpadu pada budidaya kentang. *Balithort Lembang* : 25.

Elphinstone,J.G. 2005. The current bacterial wilt situation : a global overview, p. 9-28 *In C.* Allen P.Prior and A.C.Hayward (ed). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. American Phytopathol Society Press, St. Paul MN.

[EPPO] European and Mediterranean Plant Protection Organization,. 2004. *Ralstonia solanacearum. Diagn*. 34(157-157).

French, E.R. 1979. Classification, Distribution and Origin of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol*. 60 :506-512

Gunawan, O.S., E. Suryaningsih, A.S. Duriat. 1997. Penyakit-penyakit penting pada tanaman tomat dan cara pengendaliannya. Teknologi produksi tomat. *Balitsa*. 94-117.

Gunawan, O.S. 2006. Virulensi dan Ras Ralstonia solanacearum pada pertanaman kentang di Kecamatan Pengalengan, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. *J. Hort*. 16 (3).

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of Pseudomonas solanacearum. *J. Appl. Bacteriol*. 27:265-277

He, L. Y.; Sequeira, L., Kelman, A. (1983). Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis*. 67: 1357-1361.

Horita, M., Tsuchiya, K. (2001). Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathol*. 91: 399-407.

Jeong Y,Kim J, Kang Y, Lee Sm Hwang I, 2007. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum. Plant dis.* 91:1277-1287.

Kelman, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* North Caroline Agricultural Experiment Station. Tech. Bul. (99) 194

Momol, T., Ji., Jones, J., and Olson, S. 2005. *Recommended Management Stragles for Bacterial Wilt on Tomato caused by Ralstonia solanacearum.* NFREC Extension Report 8.

Novartis. 1998. *Hama dan penyakit utama tanaman kentang dan pengendaliannya.* Kerjasama Novartis Crop Protection dengan Balitsa. PT. Citaguna Saranatama, Jakarta. 4 hal.

Rukmana, R. 1997. *Kentang budidaya dan pasca panen*. Kanisius, Yogyakarta.

Potatoes South Africa. 2015. Factsheet:: Bacteria wilt. www.potatoes.co.za/research/factsheet [16 Juni 2016]

Samadi, B. 1997. *Usahatani Kentang*. Kanisius. Yogyakarta.

Sastrosiswojo, S., T.M. Moekasan, W. Setiawati, A. Adinata dan A. Sutiadi 1993. Pengendalian hama terpadu sayuran dataran tinggi. *Buku Panduan Teknis PHT-SDT*. Program Nasional Pelatihan dan Pengembangan PHT Bappenas. *Balithort Lembang* : 85.

Schaad, N.W., J.B. Jones, and W. Chun. 2001. *Lab Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed.. American Phytopathology Society, APS Press, St. Paul.

Semangun. 2006. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta

Setiawati, W., I. Sulastrini dan N. Gunaeni. 2001. Penerapan teknologi PHT pada tanaman tomat . Monografi No. 23. *Balitsa* : 50.

Sharma, O.P., 2002. *Plant taxonomy*. New Delhi: Mc-Graw-Hill Publishing Company Limited.

Siri,M.I., Sanabria, A., Pianzzola, M.J. 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strain causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Dis* :95. 1292-1301.

Stevenson, W.R., R. Loria, G.D. Franc, D.P. Weingartner. 2001. *Compendium of potato dis*. 2nd Edition. The American Phytophathology Society : 106.

Sudarsono, A. 2008. Isolasi dan karakteristik bakteri pada ikan laut dalam spesies ikan gindara (*Lepidocibium flavobronneum).* Skripsi, Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Sunatmo, T.I. 2007. Eksperimen mikrobiologi dalam laboratorium. Ardy Agency. Bogor

Suhardi, M. Bustamam, A. Boesro dan H. Vermeulen. 1977a. *Cendawan penyebab penyakit*, 39-52 dalam *hama dan penyakit pada kentang dan pemberantasannya*. Kerjasama Indonesia – Belanda: Balitsa.

Suwandi, W., M. Pradjadinata, D. Ruswandi, P. Leksono dan M. Nobuo. 2001. Visualisasi gejala infeksi penyakit dan hama pada tanaman dan

ubi kentang Varietas Granola. Edisi Kedua. BPSB-TPH-1 Jawa Barat. *JICA*. 19 hal.

Tans-Kersten J,Huang H, Allen C,2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.* 183(3597-3605).

Teixe ira P, Oliveira R. 2002. Metabolism of Alcaligenes denitrificans in bio film vs planktonic cells. *J. Appl. Microbiol*. 92: 256-260.

Thaveechai, N., G.L. Hartman, and W. Kosittratana. 1989. *Bacterial Wilt Resistance Screening.* Lab Course on Bacterial Wilt of Tomato. Kasetsart University, Thailand.

Visnuvardhan, R.S., Thirumala, M., Kishore R.T.V., dan Mahmood, S.K. 2008. Isolation of bacteria producing polyhydroxyalkanoates (PHA) from municipal sewage sludge. *W. J. Microbiol. Biotechno.* 10: 17.

Walker, John Charles. 1957. *Plant Pathol.* Kogakusha Company,Ltd.Tokyo.

Wisnuwardhana, A.W. 1977. *Nematoda Parasiter* : 57-66 dalam Hama dan Penyakit Pada Kentang dan Pemberantasannya. Kerjasama Indonesia – Belanda: Balitsa.

Wijono, Joko. 2009. *Manajemen Perbaikan Gizi Masyarakat.* Yogyakarta : Pustaka Rihana.

Yabuuchi,E, Kosako Y, Yano I, Hotta H & Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholdiera* and *Alicagenes* species to *Ralstonia* gen nov.:proposal of *Ralstonia picketii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb.nov.,*Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb.nov.& Ralstonia eutropha (Davis 1969)comb.nov. *Microbiol. Immuno.l* 39:897-904

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi dan pembuatan media

1. Medium TZC (*Tetrazolium Chloride Agar*)

Medium TZC dibuat dengan melarutkan 1 g Casamino, 10 g Pepton *bacterial,* 5 gr Glukosa dan 17 g Agar dilarutkan dalam 1000 ml akuades. Medium dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C dan pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

Medium yang telah disterilkan ditunggu hingga mencapai suhu ±40°C untuk ditambahkan 5 ml dari 1% larutan 2,3,5- *tripheny tetrazolium chloride* yang sudah disterilkan dalam autoklaf 110 ^{o} dalam 5 menit. Medium dihomogenkan dengan diaduk perlahan, medium siap dituang kedalam cawan petri.

2. Medium King's B agar

Medium King's B dibuat dengan melarutkan 33.5 g medium King's B agar dalam 1000 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [Merck]. Medium dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut. Medium disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C dan pada tekanan 2 atm selama 15 menit. Komposisi bahan per liter dari media ini ialah gliserol 10 g, protease pepton 20 g, $MgSO_4 7H_2O$ 1,5 g, K_2HPO_4 1,5 g, dan agar 15 g.

3. Medium Urea *broth*

Medium urea *broth* dibuat dengan melarutkan 0.8 g $NH_4H_2PO_4$, 0.5 g K_2HPO_4, 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$, 5 g NaCl, 1 g *yeast extract*, 16 mg *cresol red* dalam 800 ml akuades. Medium dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut. Medium disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium yang telah disterilkan, ditambahkan 200 ml urea (larutan stok) kedalam medium tersebut secara aseptis.

4. Medium *arginine dyhidrolase*

Medium *arginine dyhidrolase* dibuat dengan melarutkan 5 g pepton, 5 g *yeast extract*, 2 g K_2HPO_4, 50 g dextrose, 3 g arginine monohydrochloride dalam 1000 ml akuades. Medium dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut. Medium disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

5. Medium *Nutrient Broth Yeast* (NBY)

Medium NBY dibuat dengan melarutkan 8 g *Nutrient Broth* (Difco), 2 g *yeast extract*, 2 g K_2HPO_4, 0.5 g KH_2PO_4, 2.5 g glukosa, dan 15 g glukosa dalam 1000 ml akuades. Medium dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium yang telah disterilkan ditunggu hingga mencapai suhu ±40°C untuk ditambahkan 1ml larutan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1M kedalam medium.

6. Medium *Yeast extract dextrose* $CaCO_3$ (YDC)

Medium YDC dibuat dengan melarutkan 10 g *yeast extract,* 20 g $CaCO_3$, dan 15 g agar ke dalam 900 ml akuades. $CaCO_3$ yang telah ditimbang, ditumbuk halus untuk mendapatkan media yang berwarna putih seperti susu. *Dextrose* 20 g dilarutkan secara terpisah dalam 100 ml akuades. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah suhu ±40°C, medium dicampurkan dengan larutan *dextrose* dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* secara aseptis sebelum dituang kedalam cawan petri.

7. Medium *starch* agar

Medium *starch* agar dibuat dengan melarutkan 23 g *Nutrient Agar* (Difco) dan 10 g *soluble potato starch* ke dalam 1000 ml akuades. Medium dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut. Medium disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

8. Medium oksidatif/fermentatif (O/F)

Medium O/F dibuat dengan melarutkan 2 g pepton, 5 g NaCl, 0.3 g KH_2PO_4, 3 g agar, dan 3 g *bromthymol blue* 1% ke dalam 1000 ml akuades.. Semua bahan dilarutkan 1000 ml akuades dan dipanaskan. Medium diatur dengan pH 7.1, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium yang telah disterilkan ditunggu hingga mencapai suhu ±40°C dan ditambahkan 1 ml larutan glukosa 10%.

Larutan glukosa dibuat dengan melarutkan 10 g glukosa dalam 100 ml akuades dan disterilkan dengan *filtration sterilization*

9. *Phospat Buffer Saline* (PBS) 10x

Larutan PBS 10x dibuat dengan melarutkan 80 g NaCl, 11.5 g Na_2HPO_4, 2 g KH_2PO_4, 2 g KCl ke dalam 1000 ml akuades. Larutan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut. Larutan diatur dengan pH 7.4. larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

10. Media Reduksi Nitrat

Siapkan 0.5 g KH_2PO_4, 0.5 g K_2PO_4, 0.2 $MgSO_4.7H_2O$, 2 ml Glyserol, 3 g KNO_3, 5 gr Yeast Extrak, 1 g Agar larutan seluruh bahan dalam 1000 ml aquades. Homogenkan medium dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut. Sterilkan medium dengan autoklaf selama 15 menit dalam 121°. Tunggu hingga medium pada suhu 40°C untuk selanjutnya siap dituang pada tabung.

Lampiran 2. Cara kerja uji fisiologis dan biokimia

Rangkaian pengujian fisiologis dan biokimia bakteri *B. glumae* berdasarkan Schaad *et al.* (2001) dan Garrity *et al.* (2005) adalah sebgai berikut:

1. Uji Gram dengan larutan KOH 3%

Sebanyak 10 µL KOH 3% diteteskan pada kaca objek, sejumlah satu ose biakan murni bakteri dipindahkan dengan jarum ose, diaduk sampai sempurna. Jika ujung jarum ose diangkat ke atas akan terbentuk benang dan suspensi menjadi berlendir maka isolat bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif (-). Sebaliknya, jika tidak terbentuk lendir maka isolat tersebut merupakan bakteri gram positif (+).

2. Uji Gram dengan larutan gram

Isolat uji dioleskan ke gelas objek menggunakan ose, lalu ditetesi dengan larutan gram A (pewarna bakteri utama) sebanyak 2-3 tetes pada apusan bakteri. Diamkan selama 1 menit. Apusan bakteri tersebut dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Larutan gram B diteteskan pada apusan bakteri, lalu dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Cuci dengan larutan gram C (larutan peluntur) selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir kembali dan dikeringanginkan. Langkah selanjutnya, larutan gam D (larutan pewarna bakteri penutup) diteteskan pada apusan tersebut, dibiarkan selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop.

Bakteri positif (+) akan mengikat pewarna bakteri utama dengan kuat atau menunjukkan warna ungu. Bakteri negatif (-) tidak mampu mengikat pewarna bakteri utama dengan kuat, sehingga dapat diwarnai oleh larutan pewarna penutup atau menunjukkan warna merah.

3. Uji Katalase

Isolat uji dioleskan ke gelas objek menggunakan ose, lalu ditetesi dengan larutan H_2O_2 3% apabila muncul gelembung gas menunjukkan reaksi positif (+), sebaliknya apabila tidak terdapat gelembung gas menunjukkan reaksi negatif (-).

4. Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan menggunakan kertas saring steril yang telah ditetesi larutan *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride* 1%. Isolat uji digoreskan pada kertas saring tersebut, munculnya warna ungu setelah 10-60 detik menunjukkan reaksi positif (+), dan dikatakan negatif apabila setelah 60 detik tidak terbentuk warna ungu. Saat melakukan uji oksidase disarankan menggunakan jarum ose yang terbuat dari platina atau plastik atau menggunakan tusuk gigi steril.

5. Uji pertumbuhan pada suhu 40° C

Uji pertumbuhan pada suhu 40° C dilakukan dengan membuat suspensi bakteri dalam 1 ml akuades ditambah 1 ose kultur murni bakteri. Inokulasi suspensi *fresh culture* sebanyak 50-100 µl ke dalam medium NB (*Nutrient Broth*). Inkubasi pada suhu yang diinginkan (40^oC) selama 5 hari. Amati perubahan yang terjadi pada medium. Perubahan medium menjadi keruh menunjukkan hasil positif / bakteri uji dapat tumbuh pada suhu 40 ^oC.

6. Uji aerob dan anaerob

Uji aerob dan anaerob dilakukan dengan membuat suspensi bakteri dalam 1 ml akuades ditambah 1 ose kultur murni bakteri. Inokulasi suspensi tersebut dengan menusukkan ke bagian tengah medium fermentatif oksidatif. Tambahkan 2 ml *paraffin oil* pada uji anaerob. Amati perubahan warna setelah 5 hari. Warna kuning pada bekas tusukan menunjukkan reaksi positif.

7. Warna koloni dan koloni mukoid pada medium YDC

Inokulasi kultur murni ke medium YDC dengan metode gores. Inkubasi selama 48 jam. Amati warna koloni yang tumbuh dan tekstur koloni, apakah mukoid atau tidak.

8. Uji pada medium King's B agar

Inokulasi kultur murni ke medium King's B agar dengan metode gores. Inkubasi selama 2x24 jam. Amati warna koloni pada medium, serta mengamati apakah koloni pada medium tersebut *diffusible pigmen non-fluorecent* atau tidak. Kemudian diamati dibawah sinar UV.

9. Uji urease

Uji urease dilakukan dengan membuat suspensi bakteri dalam 1 ml akuades ditambah 1 ose kultur murni bakteri. Inokulasi 100µL suspensi ke dalam 5 ml medium urea *broth*. *Shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 5 hari. Perubahan warna merah magenta menunjukkan reaksi positif.

10. Uji Akumulasi Poly β-hydroxybutirat (PHB)

Tumbuhkan pada media Nutrient Agar dengan ditambahkan 5% sukrosa. Inkubasi bakteri selama 24-48 jam. Menyiapkan larutan sudan

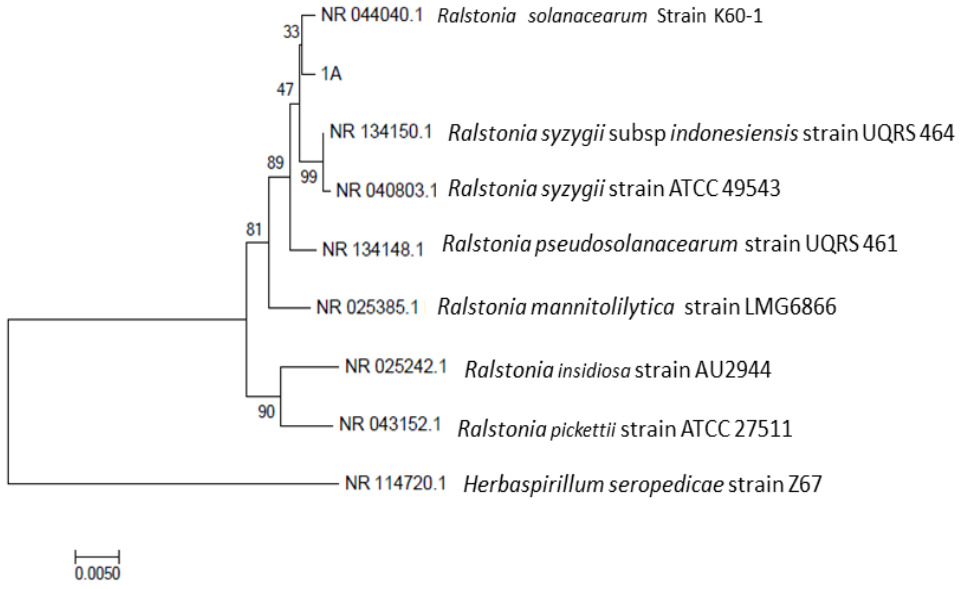
black solution sebanyak 0.3 g dalam 100 ml 70% ethanol. Membuat usapan bakteri dikaca objek lalu fiksasi. Basahi slide dengan sudan black solution dan biarkan selama 10-15 menit. Keringkan dengan tisu dan bersihkan dengan xylol sampai bersih di cawan petri. Basahi slide dengan safranin (0.5%) kemudian diamkan selama 5-10 detik. Cuci dengan air dan diamati dibawah mikroskop. Warna biru kehitaman didalam sel menunjukkan hasil positif terdapat akumulasi PHB granul.

11. Uji Reduksi Nitrat

Siapkan media reduksi nitrat lalu inokulasikan isolat pada media menggukan oose jarum sebanyak 2-3 kali. Tambahkan 2-3 ml *Water Agar* 3%. Inkubasi 3-7 hari pada 28°-32°C. Pengujian dilakukan dengan menambahkan *Starch Iodid* pada inokulum yang tidak ditambahkan water agar, *Starch Iodid* terdiri dari *Starch Iodid Solution* dan *Hydrochloric Acid*. Tambahkan 50µl dari reagen ke tube yang tidak disealed, warna biru menunjukkan keberadaan Nitrit.

Reaksi negatif untuk keberadaan nitrit apabila nitrat tidak tereduksi atau nitrat tereduksi menjadi nitrit. Jika nitrat tidak tereduksi setelah ditambahkan zink akan menjadi biru. Reaksi lemah apabila nitrat sudah tereduksi menjadi nitrit. Tabung di sealed akan menunjukkan gelembung pada media setelah inkubasi 1 minggu, menandakan nitrat pada media terangkat atau terdorong menuju *Water Agar*.

Lampiran 3. Pohon Filogeni Rs1A dengan *R. solanacearum*



Lampiran 4. Dokumentasi Infeksi Bakteri Pada Tanaman Kentang

Gambar 11. Teknik perendaman akar pada tahap infeksi bakteri

Gambar 12.Tanaman kentang setelah dua hari infeksi bakteri.

Gambar 13. Gejala layu pada tanaman kentang

Lampiran 5. Hasil analisis statistic dengan SPSS 16.0

Tabel 14. Hasil uji anava dua arah pada uji efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu pertama

ANOVA					
SKORING					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27.833	7	3.976	7.952	.000
Within Groups	8.000	16	.500		
Total	35.833	23			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat perbedaan antar perlakuannya

H1 = terdapat perbedaan antar perlakuannya

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 15. Uji DMRT efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu pertama.

SKORING				
Duncan				
METODE_KONSENTRASI	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
S0	3	.0000		
S3	3	.0000		
R0	3	.0000		
S1	3	.3333		
S2	3	.3333		
R3	3		1.6667	
R2	3		2.0000	2.0000
R1	3			3.0000
Sig.		.609	.572	.102

Tabel 16. Hasil uji anava dua arah pada uji efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu kedua

ANOVA					
SKORING					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21.833	7	3.119	6.238	.001
Within Groups	8.000	16	.500		
Total	29.833	23			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat perbedaan antar perlakuannya

H1 = terdapat perbedaan antar perlakuannya

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 17. Uji DMRT efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu kedua.

SKORING			
Duncan			
METODE_KONSENTRASI	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
S0	3	.0000	
R0	3	.0000	
S2	3	.6667	
S1	3		2.0000
R1	3		2.0000
R2	3		2.0000
S3	3		2.3333
R3	3		2.3333
Sig.		.290	.609

Tabel 18. Hasil uji anava dua arah pada uji efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu ketiga

ANOVA					
SKORING					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	53.333	7	7.619	8.707	.000
Within Groups	14.000	16	.875		
Total	67.333	23			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat perbedaan antar perlakuannya

H1 = terdapat perbedaan antar perlakuannya

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 19. Uji DMRT efektifitas metode dan konsentrasi untuk menginfeksi bakteri *R. solanacearum* minggu kedua.

SKORING				
Duncan				
METODE_KONSENTRASI	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
S0	3	.0000		
R0	3	.0000		
S2	3		2.0000	
S3	3		2.3333	2.3333
S1	3		2.3333	2.3333
R3	3		2.3333	2.3333
R2	3		3.0000	3.0000
R1	3		3.6667	3.6667
Sig.		1.000	.065	.065

Tabel 20. Hasil uji anava satu arah ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu pertama setelah inokulasi

ANOVA					
Skoring					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.467	3	2.156	1.624	.208
Within Groups	34.500	26	1.327		
Total	40.967	29			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat perbedaan antar perlakuannya

H1 = terdapat perbedaan antar perlakuannya

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 21. Uji DMRT ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu pertama setelah inokulasi

Skoring		
Duncan		
Kultivar	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Granola	8	1.5000
Atlantik	10	1.7000
33	2	2.0000
Medians	10	2.6000
Sig.		.185

Tabel 22. Hasil uji anava satu arah ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu kedua setelah inokulasi

ANOVA					
Skoring					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.717	2	.858	.287	.753
Within Groups	80.650	27	2.987		
Total	82.367	29			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat perbedaan antar perlakuannya

H1 = terdapat perbedaan antar perlakuannya

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 23. Uji DMRT ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu kedua setelah inokulasi

skoring		
Duncan		
kultivar	N	Subset for alpha = 0.05
		1
atlantik	10	2.1500
Medians	10	2.6000
granola	10	2.7000
Sig.		.509

Tabel 24. Hasil uji anava satu arah ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu ketiga setelah inokulasi

ANOVA					
Skoring					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.405	2	1.202	.544	.586
Within Groups	59.649	27	2.209		
Total	62.054	29			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat perbedaan antar perlakuannya

H1 = terdapat perbedaan antar perlakuannya

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 25. Uji DMRT ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu ketiga setelah inokulasi

Skoring		
Duncan		
Kultivar	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Atlantik	10	2.6500
Medians	10	3.1000
Granola	10	3.3320
Sig.		.342

Tabel 26. Hasil uji anava satu arah ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu keempat setelah inokulasi

ANOVA					
Skoring					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.872	2	.436	.255	.777
Within Groups	46.160	27	1.710		
Total	47.032	29			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat perbedaan antar perlakuannya

H1 = terdapat perbedaan antar perlakuannya

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 27. Uji DMRT ketahanan tiga kultivar kentang terhadap *R. solanacearum* minggu keempat setelah inokulasi

Skoring		
Duncan		
Kultivar	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Medians	10	3.2660
Granola	10	3.3160
Atlantik	10	3.6500
Sig.		.542

Tabel 28. Hasil uji anava satu arah pengukuran tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 1 MSI

ANOVA					
TINGGI					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	59.267	2	29.633	.057	.945
Within Groups	14042.100	27	520.078		
Total	14101.367	29			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat penghambatan pada tinggi tanaman

H1 = terdapat penghambatan pada tinggi tanaman

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 29. Uji DMRT tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 1 MSI

TINGGI		
Duncan		
		Subset for alpha = 0.05
KULTIVAR	N	1
MEDIANS	10	47.8000
GRANOLA	10	50.5000
ATLANTIK	10	51.0000
Sig.		.770
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.		

Tabel 30. Hasil uji anava satu arah pengukuran tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 2 MSI

ANOVA					
TINGGI					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	281.267	2	140.633	.187	.830
Within Groups	20300.600	27	751.874		
Total	20581.867	29			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat penghambatan pada tinggi tanaman

H1 = terdapat penghambatan pada tinggi tanaman

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 31. Uji DMRT tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 2 MSI

TINGGI		
Duncan		
		Subset for alpha = 0.05
KULTIVAR	N	1
GRANOLA	10	46.5000
MEDIANS	10	50.3000
ATLANTIK	10	54.0000
Sig.		.570

Tabel 32. Hasil uji anava satu arah pengukuran tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 3 MSI

ANOVA					
Tinggi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	606.786	2	303.393	.831	.448
Within Groups	8392.795	23	364.904		
Total	8999.581	25			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat penghambatan pada tinggi tanaman

H1 = terdapat penghambatan pada tinggi tanaman

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 33. Uji DMRT tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 3 MSI

Tinggi		
Duncan		
		Subset for alpha = 0.05
Kultivar	N	1
Granola	9	51.6667
Atlantik	9	59.9711
Median	8	63.1350
Sig.		.250

Tabel 34. Hasil uji anava satu arah pengukuran tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 4 MSI

ANOVA					
Tinggi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	65.382	2	32.691	.061	.941
Within Groups	4293.690	8	536.711		
Total	4359.072	10			

Keterangan α = 0.05

H0 = tidak terdapat penghambatan pada tinggi tanaman

H1 = terdapat penghambatan pada tinggi tanaman

Kriteria :

Terima H0 jika α < sig

Tolak H0 jika α > sig

Tabel 35. Uji DMRT tinggi tanaman setelah inokulasi *R. solanacearum* pada 4 MSI

TINGGI		
Duncan		
		Subset for alpha = 0.05
KULTIVAR	N	1
ATLANTIK	4	60.4150
GRANOLA	4	63.6025
MEDIANS	3	66.5533
Sig.		.742

LABORATORIUM BIOLOGI
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
Gedung C Kampus B UNJ Rawamangun. Jl. Pemuda No. 10 Jakarta 13220.
Telp. 021- 4894909

SURAT KETERANGAN

Nomor : 09/Lab_Bio.B/KP/II/2017

Yang bertandatangan di bawah ini, Kepala Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Jakarta, dengan ini menerangkan bahwa :

Nama : Hery Febrianto

NIM : 3425120269

Program Studi : Biologi

Telah melakukan kegiatan penelitian di Laboratorium Rumah Kawat, Laboratorium Biologi, FMIPA Universitas Negeri Jakarta dengan judul penelitian "Identifikasi Bakteri *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri dan Uji Ketahanan Beberapa Kultivar Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum*) Di Rumah Kaca" pada bulan Januari-November 2016, dibimbing oleh Dr. Reni Indrayanti. M.Si dan Ir. Riza Desnurvia, M.Sc.

Demikian surat keterangan ini kami buat untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Jakarta, 8 Februari 2017
Kepala Laboratorium Biologi
FMIPA Universitas Negeri Jakarta

Agung Sedayu, M.Sc
NIP. 19750911 200112 1 004

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta:

Nama	: Hery Febrianto
No. Registrasi	: 3425120269
Jurusan	: Biologi
Program Studi	: Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul " IDENTIFIKASI BAKTERI *Ralstonia solanacearum* PENYEBAB PENYAKIT LAYU BAKTERI DAN UJI KETAHANAN BEBERAPA KULTIVAR KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) dirumah kaca" adalah

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri, berdasarkan data yang diperoleh dari hasil percobaan pada bulan Januari – November 2016.
2. Bukan merupakan duplikat skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain atau jiplakan karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sesungguh-sungguhnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan saya tidak benar.

Jakarta, Januari 2017

Pembuat pernyataan

METERAI TEMPEL

A81EBAEF408693326

6000

ENAM RIBU RUPIAH

Hery Febrianto

NRM. 3425120269

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

HERY FEBRIANTO, lahir di Jakarta pada tanggal 19 Februari 1994. Penulis adalah anak kedua dari tiga bersaudara. Anak dari pasangan Alex Susanto dan Karinih. Penulis bertempat tinggal di Jalan Cakung Clilincing Pos V Rt 02 Rw 010 No: 27 Semper Timur, Cilincing. Penulis mengawali pendidikan di TK Nurul Falah pada tahun 1999 sampai tahun 2000, melanjutkan pendidikan dasar di SDI Teladan Nurul Falah pada tahun 2000 sampai tahun 2006. Selanjutnya, pada tahun 2006 hingga tahun 2009 menempuh pendidikan di SMP Negeri 266 Jakarta. Kemudian, meneruskan pendidikan di SMA Negeri 52 Jakarta pada tahun 2009 sampai 2012. Pada tahun yang sama, penulis berhasil diterima di Universitas Negeri Jakarta Program Studi Biologi melalui jalur SBMPTN.

Selama masa perkuliahan, penulis mengikuti kegiatan Cakrawala Biologi di Gunung Bunder pada tahun 2012 dan Studi Ilmiah Biologi di Halimun 2014. Pada tahun 2013, penulis menjadi asisten Botani Kriptogram, dan ditahun 2014 menjadi asisten Botani Fanerogram. Penulis mengikuti kegiatan Kuliah Kerja Lapangan (KKL) pada tahun 2015 dengan judul "Struktur Dan Komposisi Vegetasi Pada Dua Blok Tanaman Di Hutan Wanagama, Gunung Kidul, Yogyakarta" dan Praktek Kerja Lapangan (PKL) dengan judul penelitian "Tindakan Karantina Media Pembawa Pakan Ternak Jagung (*Zea mays)* Import Thailand pada Balai Besar Karantina Pertanian

Tanjung Priok”. Di tahun terakhir menjadi Mahasiswa Penulis mengikuti ajang pemilihan Duta UNJ, penulis berhasil lolos hinggal 20 besar finalis Duta.