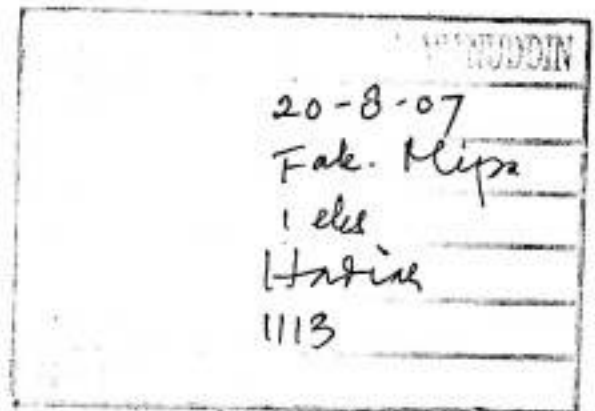




DETEKSI *Ralstonia solanacearum*  
PENYEBAB PENYAKIT LAYU BAKTERI PADA KENTANG  
(*Solanum tuberosum*. L) DENGAN MENGGUNAKAN METODE PCR  
(POLYMERASE CHAIN REACTION)

Oleh  
Andi Muh Munawier Usman  
H41102005



JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2007

**DETEKSI *Ralstonia solanacearum***  
**PENYEBAB PENYAKIT LAYU BAKTERI PADA KENTANG**  
**(*Solanum tuberosum*. L) DENGAN MENGGUNAKAN METODE PCR**  
**(POLYMERASE CHAIN REACTION)**

***SKRIPSI INI DIBUAT UNTUK MELENGKAPI TUGAS DAN MEMENUHI SYARAT***  
***UNTUK MEMPEROLEH GELAR SARJANA SAINS BIOLOGI***

**OLEH :**  
**ANDI MUH MUNAWIER USMAN**  
**H41102005**

**JURUSAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS HASANUDDIN**  
**MAKASSAR**  
**2007**

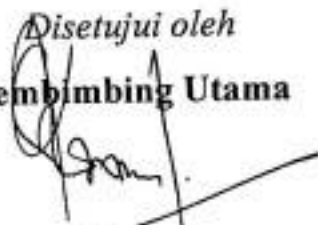
## HALAMAN PENGESAHAN

DETEKSI *Ralstonia solanacearum*  
PENYEBAB PENYAKIT LAYU BAKTERI PADA KENTANG  
(*Solanum tuberosum*. L) DENGAN MENGGUNAKAN METODE PCR  
(POLYMERASE CHAIN REACTION)

Oleh :

**ANDI MUH MUNAWIER USMAN**  
(H41102005)

Disetujui oleh  
Pembimbing Utama

  
(Drs. As'adi Abdullah MSi.)  
NIP. 131 846 414

Pembimbing Pertama

  
(Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, MSc.)  
NIP. 131 862 603

Pembimbing Kedua

  
(Dra Rosana Agus, MSi.)  
NIP. 131 959 055

## KATA PENGANTAR



*Alhamdulillahirabbil'alamin.* puji syukur kehadiran Allah Azza wa jalla atas keluasan rahmat, karunia serta pertolongan-Nya sehingga serangkaian amanah untuk penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Deteksi *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri Pada Kentang (*Solanum tuberosum* L) dengan Menggunakan Metode PCR ”** dapat terselesaikan, sebagai syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Shalawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada baginda Nabiullah Muhammad SAW sebagai suri tauladan yang baik, begitupula kepada keluarga, sahabat, dan orang – orang yang senantiasa konsisten dalam mengikuti dan memperjuangkan Risalah beliau

Penulis menyadari menyadari bahwa dengan selesianya penulisan Skripsi ini, tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih dan semoga Allah memberikan pembalasan yang lebih baik dan lebih banyak serta menjadi amal jariah kepada:

- Bapak Drs As'Adi Abdullah, M.Si sebagai pembimbing utama, Ibu Dr Ir Tutik Kuswinanti, M.Sc sebagai pembimbing pertama dan Ibu Dra Rosana

Agus., M.Si sebagai pembimbing kedua yang senantiasa Ikhlas meluangkan waktu, menyumbangkan pikiran dan tenaga, mulai saat perencanaan penelitian hingga penyusunan skripsi ini terselesaikan. Insya Allah, semoga menjadi amal jariah di mata Allah Azza Wa jalla.

- Drs H.Andi Azis Mattimu.,M.S sebagai Penasehat Akademik, yang telah memberi nasehat dan bimbingan akademik serta penuh tanggung jawab memonitoring dan mengarahkan penulis sejak menjadi mahasiswa hingga selesai,
- Drs Karunia Alie, M.Si, Ibu Dra Syafaraenan M.Si sebagai Ketua dan Sekretaris Jurusan Biologi dan Seluruh Dosen yang telah mendidik dan membimbing selama penulis menuntut ilmu di perguruan tinggi ini serta staf pegawai yang telah membantu,
- Kepala Lab. Bioteknologi Pertanian Unhas, yang telah memberikan bantuan penggunaan fasilitas selama penulis melaksanakan penelitian, Kakak Gusmi, kawan – kawan peneliti, Kakak Ahmad, Mas, Kakak uni, Kakak Chi, Kakak Ida, Adik Sarman serta rekan – rekan yang lain yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini,
- Ir Muhibuddin, MP., Ir Ansyar, MP. Yang senantiasa memberikan nasehat, motivasi dan saran selama penelitian dan penyelesaian skripsi,

- Rekan – rekan Mahasiswa F. MIPA UNHAS pada umumnya angkatan 2002 Mahasiswa Biologi F. MIPA UNHAS pada khususnya atas dukungan dan motivasinya,
- Ust. Rahmat, Ust Rafiq, Ust. Rustan, Ust Ali, dan rekan – rekan LK – Uswah dan Gema Pembebasan yang senantiasa memberikan nasehat spiritual selama ini.

Terhusus untuk almarhumah Ibunda Andi Faidawati dan almarhum Ayahanda Drs Usman Manru lantunan doaku senantiasa teriring untukmu dalam shalatku, dzikir munajahku *Allahummagfirlil waliwalidayyah warhamhuma kama Rabbayani Saghira* semoga Allah Azza Wa jalla memberikan keselamatan dan kedudukan yang tinggi dengan pembalasan surga yang mulia atas pengorbanan dan ketulusan kasih sayangnya sejak penulis kecil hingga kini. Dan untuk saudaraku semua adikku Andi Zulfadli U, Andi Fachuru Razi U, Andi Zaenal Husni U, Andi Muh Zafarullah U, yang senantiasa memberikan motivasi dan support baik secara material maupun moril serta doa munajah kepada Allah Azza wa Jalla.

Demikianlah skripsi ini kami persembahkan dengan ketulusan kepada almamater yang telah memberi tempat kepada penulis untuk menuntut ilmu dan meraih gelar Sarjana. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua khususnya pengembangan Biologi Sains dan Teknologi *Insy Allah SWT.*

Makassar, Agustus 2007

Penulis

## ABSTRAK

Penelitian Deteksi Bakteri *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri Pada Kentang (*Solanum tuberosum*. L) Dengan Menggunakan Metode PCR dengan bertujuan untuk mengetahui keberadaan *Ralstonia solanacearum* pada kentang (*Solanum tuberosum*.L) varietas Atlantik, Granola, Bejo, dan Raja dengan metode PCR. Pada tahap awal, penelitian ini difokuskan pada isolasi bakteri *Ralstonia solanacearum* umbi kentang varietas atlantik sebagai kontrol positif dan planlet kentang semua varietas dengan mengambil sampel pada tanaman yang terindikasi untuk diisolasi, kemudian dilanjutkan dengan analisis molekuler melalui ekstraksi dan purifikasi DNA dengan metode Lie and Boer, setelah itu kemudian diamplifikasi dengan metode PCR dengan menggunakan primer OLI 1 dan Y2. Selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose dan divisualisasi dengan Ethidium Bromida, kemudian diamati dan dianalisis pada gel documenter (UVP UPLAND CA UK). Hasil yang diperoleh membuktikan bahwa kontrol positif tanaman yang bergejala dijumpai adanya pita spesifik berukuran 287 bp, sedangkan pada planlet tanaman kentang semua varietas hasilnya negatif.

Kata Kunci : Kentang, *Ralstonia solanacearum*, PCR.

## ABSTRACT

Research for an early detection of *Ralstonia solanacearum* the causal agent of bacterial wilt on potato was conducted by using of PCR (Polymerase Chain Reaction) method. The aim of this research aim of detect the presence of *Ralstonia solanacearum* on planlet of cultivar Atlantic, Granola, Bejo, and Raja. In the first step, we focused to isolate *Ralstonia solanacearum* from infected Atlantic potato tuber, identified the isolate by identified biochemical characters. This isolate was used as positive control in further step for PCR detection. DNA was isolate from all samples of cultivars tested and amplified with OLI 1 and Y2 primer. PCR product was separated through electrophoresis followed by visualization with Ethidium bromide and detection under gel documenter (Geldoc UVP-UPLAND CA UK). The result showed that using of OLI 1 and Y2 primer could detect the presence of *Ralstonia solanacearum*. In positive control, indicated by the appearance of specific at the size of 287 bp, whereas from all planlet sample showed a negative result.

Keyword ; *Ralstonia Solanacearum*, PCR, and, Potato.



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Tujuan Penelitian.....	4
I.3 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 Karakteristik Tanaman Kentang ( <i>Solanum tuberosum</i> .L).....	5
II.2 Penyakit Layu Bakteri.....	7
II.3 Teknik Deteksi Bakteri.....	12
II.4 Metode PCR (Polymerase Chain Reaction).....	13

II.4.1 Denaturasi.....	16
II.4.2 Annealing (Penempelan Primer).....	16
II.4.3 Extension (Pemanjangan Primer).....	17
II.5 Elektroforesis Gel.....	17
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>20</b>
III.1 Pengambilan Sampel.....	20
III.2 Tempat dan Waktu.....	20
III.3 Alat.....	20
III.3.1 Alat-alat untuk Ekstraksi dan Purifikasi.....	20
III.3.2 Alat-alat untuk PCR.....	21
III.3.3 Alat-alat untuk Elektroforesis gel agarose.....	21
III.4 Bahan.....	21
III.4.1 Bahan untuk Ekstraksi dan Purifikasi.....	21
III.4.2 Bahan-bahan untuk PCR.....	22
III.4.3 Bahan-bahan untuk Elektroforesis gel agarose.....	22
III.5 Cara Kerja.....	22
III.5.1 Ekstraksi dan Purifikasi DNA.....	22
III.5.2 PCR (polymerase Chain Reaction).....	23
III.5.3 Elektroforesis DNA Total dan Produk PCR.....	24
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>26</b>
IV.1 Isolasi Bakteri.....	26

IV.2 Deteksi <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	28
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	33
V.1 Kesimpulan.....	33
V.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34

## DAFTAR TABEL

Tabel	Hal
Tabel 1. Urutan Basa Nukleotida pada Primer Spesifik .....	24
Tabel 2. Uji Biokimia Bakteri <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	27

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Hal
Gambar 1. Bakteri <i>Ralstonia solanacearum</i> menyerang daun dan umbi pada kentang a. Layunya daun pd tanaman kentang, b. Bercak kehitaman pada umbi, c. Irisan bagian dalam umbi yang bergejala .....	8
Gambar 2. Tahap-tahap PCR.....	20
Gambar 3. Alat Elektroforesis.....	23
Gambar 4. Biakan <i>Ralstonia solanacearum</i> Pada Medium TTC.....	31
Gambar 5. Hasil Elektroforesis DNA Total Planlet Kentang .....	32
Gambar 6. Elektroforesis Produk PCR Kultur Bakteri.....	33
Gambar 7. Hasil elektroforesis produk PCR.....	35
Gambar 8. Hasil Elektroforesis Produk PCR pada Planlet Kentang .....	36

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Hal
Lampiran 1. Skema Kerja.....	37
Lampiran 2. Pembuatan Medium TTC.....	39
Lampiran 3. Skema Identifikasi secara Biokimia <i>Ralstonia solanacearum</i>	40
Lampiran 4. Bahan-bahan Ekstraksi dan purifikasi DNA.....	41
Lampiran 5. Bahan-bahan untuk PCR.....	42
Lampiran 6. Bahan-bahan untuk Elektroforesis dan pewarnaan.....	43

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan salah satu tanaman pangan yang bernilai ekonomi tinggi dan makin populer saat ini. Kentang mempunyai rasa yang enak, mudah dan tahan disimpan serta dapat diolah menjadi beraneka ragam produk makanan seperti keripik, kentang goreng dan aneka macam makanan ringan. Tanaman kentang memiliki prospek yang baik seiring dengan permintaan konsumen akan makanan ringan yang bervariasi (Rukmana, 1997).

Produksi kentang di Indonesia masih rendah. Misalkan saja produktivitas kentang di Sulawesi Selatan pada tahun 2002, produksi kentang mencapai 9,86 ton ha<sup>-1</sup>. Sedangkan menurut Rukmana (1997) bahwa dengan pemeliharaan yang intensif, sebenarnya produktivitas kentang dapat mencapai (30 - 35) ton ha<sup>-1</sup> (Anonim<sup>b</sup>, 2006). Diketahui tanaman kentang masuk ke Indonesia sekitar abad 17. Tanaman ini sengaja dibawa bangsa Eropa sebagai makanan pokok mereka. Dibanding jagung dan padi, kentang memproduksi kalori dua kali lebih banyak. Untuk setiap 100 gram, kentang mengandung kalori 347 kal, protein 0,3 gram, lemak 0,1 gram, karbohidrat 85,6 gram, kalsium (Ca) 20 gram, fosfor (P) 30 mg, besi (Fe) 0,5 mg dan vitamin B 0,04 mg (Anonim, 2007).

Kendala utama produksi kentang di negara-negara tropis termasuk Indonesia adalah adanya penyakit-penyakit berbahaya yang diketahui berakibat terhadap penurunan hasil yang nyata dan penggunaan benih yang turun temurun. Beberapa hasil penelitian di luar negeri menunjukkan bahwa kehilangan hasil akibat penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Hooker, 1983 dan Suhardi 1989), penyakit ini dapat menimbulkan kerugian yang besar, karena dapat mengurangi kualitas dan kuantitas kentang, bahkan mematikan tanaman (Rukmana, 1997). Bakteri ini tercatat menyerang beratus-ratus spesies tanaman yang tercakup dalam 44 famili (Hayward, 1991). Rendahnya produktivitas tersebut disebabkan oleh berbagai hal yaitu penggunaan bibit unggul yang kurang bermutu, pemeliharaan yang tidak intensif dan serangan berbagai hama dan penyakit (Setiadi dan Nurulhuda, 2001).

*Ralstonia solanacearum* merupakan penyebab penyakit layu bakteri yang sampai saat ini masih merupakan faktor pembatas produksi tanaman utama seperti pada kacang tanah, tomat, dan kentang. Patogen ini mempunyai inang lebih dari 200 spesies tanaman yang tergolong kedalam 44 famili. Berdasarkan hasil survei di Indonesia, penyakit ini tersebar luas, berbagai usaha pengendalian telah dilakukan, namun penyakit layu masih sulit dikendalikan karena keragaman patogennya sangat luas (Rukmana, 1997). Salah satu cara memperoleh kentang yang bermutu tinggi dapat dilakukan dengan perbanyakan tanaman secara *in vitro* atau kultur jaringan. (Soelarso, 1997).



Teknik deteksi patogen pada benih kentang dapat dilakukan dengan metode konvensional melalui penumbuhan pada media yang dilanjutkan dengan pengamatan mikroskopis. Metode ini membutuhkan waktu yang lama dan dilakukan pada benih yang menampakkan gejala. Metode lainnya adalah dengan ELISA yang memanfaatkan antibodi spesifik dalam proses pengerjaannya (Manzila, 2003). Teknik baru yang sekarang dikembangkan adalah dengan metode PCR (Polimerase Chain Reaction). Teknik ini terutama cocok digunakan pada patogen yang sifatnya laten. Dengan teknik ini keberadaan bakteri patogen pada jaringan tanaman walaupun dalam konsentrasi yang sangat kecil (0,02 pg) masih dapat dideteksi (Anonim, 2005).

Dengan berkembangnya bioteknologi di bidang fitopatologi yang meliputi teknik-teknik sederhana, seperti kultur jaringan tanaman sampai pada rekayasa genética, maka berkembanglah teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik ini dimanfaatkan untuk deteksi patogen pada tingkat genom atau molekuler. (Muladno, 2002, Firdiah, 2005). Salah satu metode yang digunakan dalam mengetahui ras dari bakteri *Ralstonia solanacearum* yaitu dengan menggunakan metode PCR. Metode ini digunakan karena infeksi *Ralstonia solanacearum* sifatnya sistemik yaitu dapat menular melalui benih, dimana pada konsentrasi kecil belum menimbulkan gejala, dengan deteksi PCR menggunakan primer spesifik, maka keberadaan *Ralstonia solanacearum* pada konsentrasi yang sangat kecil sudah dapat dideteksi, kemudian dengan menggunakan metode PCR akan menghasilkan bibit

kentang yang bebas patogen. Pengamatan morfologi baik bentuk maupun warna koloni bakteri tersebut dapat diisolasi dengan baik pada medium yang mengandung 2, 3, 5- trifenil-tetra sodium klorida (Medium TTK) tetapi belum mampu memberikan hasil yang lebih akurat, disebabkan karena tingginya variasi dalam spesies (Anonim<sup>d</sup>, 2006).

Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan deteksi bakteri *Ralstonia solanacearum* pada umbi kentang dengan metode PCR menggunakan primer spesifik OLI 1 dan Y2.

### **I.2 Tujuan Penelitian**

Mengetahui Keberadaan *Ralstonia solanacearum* pada umbi batang kentang varietas Atlantik, Granola, Bejo, dan Raja dengan metode Polimerase Chain Reaction (PCR).

### **I.3 Manfaat Penelitian**

Sebagai langkah preventif untuk mencegah penyebaran patogen *Ralstonia solanacearum* pada umbi kentang dan untuk proses seleksi mendapatkan bibit kentang yang sehat dan bebas dari kontaminasi patogen.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Karakteristik Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L)

Kentang merupakan tanaman dikotil, dengan klasifikasi berdasarkan Gembong Tjitrosoepomo, 2002 yaitu :

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledoneae
Subclassis	: Sympetalae
Ordo	: Tubiflorae/Solanales/Personatae
Familia	: Solanaceae
Genus	: <i>Solanum</i>
Spesies	: <i>Solanum tuberosum</i> . L

Kentang termasuk tanaman semusim yang berbentuk semak dan berumur 90 hari – 180 hari, tergantung varietasnya (Rukmana, 1997).

Tanaman kentang memiliki sistem perakaran tunggang, pertumbuhan akar dapat mencapai 45 cm kebawah dan menjalar kesamping. Akar tanaman berwarna keputih-putihan, halus dan ukurannya sangat kecil (Samadi, 1997).

Pertumbuhan batang tegak atau menjalar dengan tinggi 0,5 m – 1,2 m, tergantung varietasnya. Bentuk batang bulat, bersegi berbuku-buku dan berongga. Warna batang hijau kemerah-merahan atau hijau keungu-unguan (Rukmana, 1997).

Berdaun rimbun dan letak daun tersusun dalam tangkai daun secara berhadapan (daun majemuk) yang menyirip ganjil. Warna daun hijau atau hijau keputih-putihan. Posisi tangkai daun terhadap batang tanaman berbentuk sudut kurang lebih dari 45°. Pada dasar tangkai daun terdapat tunas ketiak yang berkembang menjadi cabang sekunder (Rukmana, 1997).

Bunga kentang bersifat hermaprodit (berkelamin dua), berwarna putih. Tersusun dalam satu karang bunga yang tumbuh pada ujung batang dan terdiri dari daun kelopak, daun mahkota, benang sari dan putik (Soleh, 1992). Bunga kentang bersifat protogini yaitu putik lebih cepat masak dari pada serbuk sari. Sistem penyerbukan dapat menyerbuk sendiri ataupun silang (Rukmana, 1997).

Umbi terbentuk dari cabang samping diantara akar-akar. Proses pembentukan umbi ditandai dengan terhentinya pertumbuhan memanjang dari rizome atau stolon yang diikuti pembesaran (Samadi, 1997). Bentuknya ada yang bulat, dan bulat lonjong, lonjong, dan memanjang. Warna kulit umbi kuning, putih dan merah. Warna daging umbi putih, putih kekuning-kuningan dan kuning, tergantung varietasnya (Rukmana, 1997).

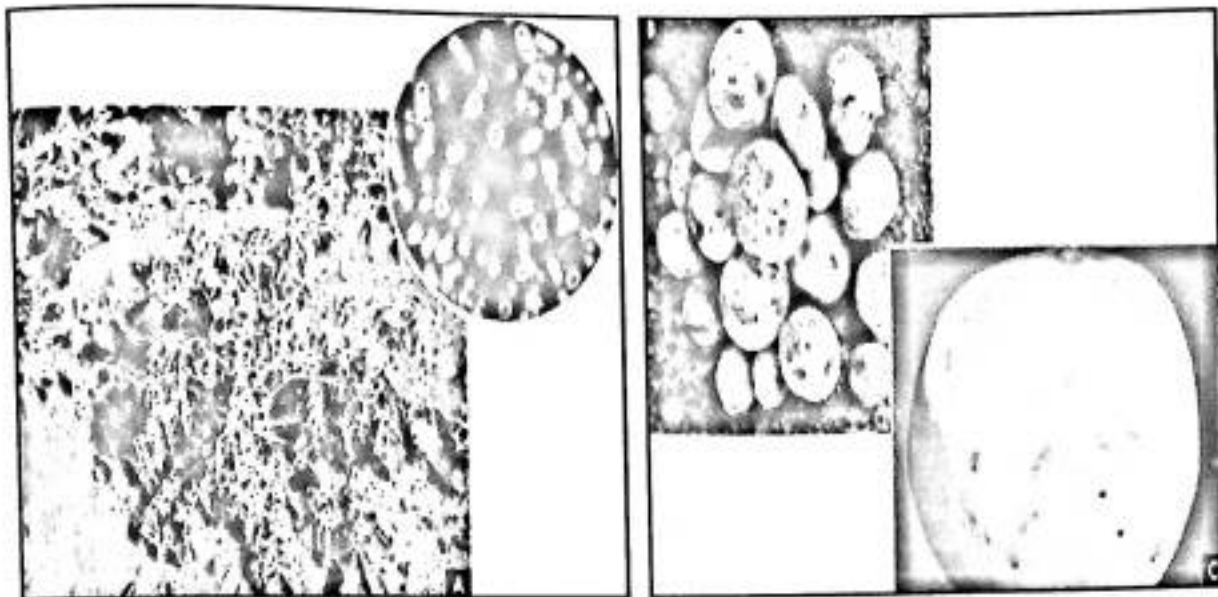
## II.2 Penyakit Layu Bakteri

Penyebab penyakit layu bakteri adalah *Ralstonia solanacearum*. Gejala khas pada tanaman terserang adalah daun layu, menguning, dan kering. Rimpang dan batang busuk dan berbau. Batang semu mudah dilepas dari pangkalnya. Berkas pembuluh menjadi berwarna coklat tua atau hitam. Bila rimpang atau batang semu dipotong akan keluar cairan kental berwarna putih susu dari bagian permukaan potongan. Bila potongan rimpang atau batang semu direndam di dalam air jernih maka warna air akan berubah menjadi keruh. Bakteri berkembang biak di dalam pembuluh kayu. Bakteri masuk ke dalam jaringan tanaman melalui luka-luka pada akar akibat serangan nematoda atau faktor lainnya. *R. solanacearum* mempunyai banyak tanaman inang. Penyebaran penyakit terutama melalui bibit (rimpang) yang sudah mengandung bibit penyakit (dipanen dari tanaman yang sudah sakit). Bakteri bertahan lama di dalam tanah. Gejala awal adalah tanaman mulai layu. Kemudian menjalar ke daun bagian bawah. Gejala yang lebih lanjut : seluruh tanaman layu, daun menguning sampai coklat kehitam-hitaman, dan akhirnya tanaman mati. Serangan pada umbi menimbulkan gejala dari luar tampak bercak-bercak kehitam-hitaman, terdapat lelehan putih keruh (massa bakteri) yang keluar dari mata tunas atau ujung stolon (Rukmana, 1997).

Virulensi merupakan kapasitas relatif patogen untuk merusak tanaman inang. Virulensi penyakit tanaman berhubungan dengan sifat-sifat bakteri yang menentukan kecepatan pertumbuhan dan penyebarannya pada inang dan meningkatkan kerusakan

pada jaringan tanaman. Faktor virulensi yang disekresikan dapat berupa toksin termasuk Ekstraseluler Polisakarida, enzim, dan hormon tumbuh yang menginduksi seperti jenis gejala seperti menguning, busuk lunak, hiperplasia, nekrosis dan layu (Habazar dan Rivai, 2000). Pada bakteri *Ralstonia solanacearum*, ekstraseluler Polisakarida sangat berperan dalam patogenis, utamanya dalam menghambat translokasi unsur hara dan air, juga menjadi pelindung bakteri dari keadaan yang ekstrim, dapat menetralkan senyawa-senyawa yang dikeluarkan oleh tanaman (Wydra dan Rudolph, 1993). Beberapa mekanisme kerusakan Ekstraseluler Polisakarida sebagai penyebab layu antara lain : penyebaran patogen dalam xylem, pembentukan senyawa ekstraseluler polisakarida hanya pada isolat yang virulen dan pemberian dengan senyawa metabolit dari patogen pada tanaman. Aspek-aspek penyebab layu adalah : pengaliran terbatas dan transportasi air ke daun menjadi terhambat, viskositas cairan dalam jaringan pembuluh meningkat, terjadi penyumbatan terhadap transport air, bagian yang paling kritis adalah tangkai dan tulang daun, terjadinya kerusakan pada membran luar dan membran dalam sel dan keluarnya elektrolit dari dalam sel (Habazar dan Rivai, 2000).

Pada gambar 1 akan memperlihatkan gejala-gejala yang akan menyerang tanaman kentang seperti daun bagian bawah menguning ;



Gambar 1. Bakteri *Ralstonia solanacearum* menyerang daun dan umbi pada kentang  
 a. Layunya daun pd tanaman kentang, b. Bercak kehitaman pada umbi, c. Irisan bagian dalam umbi yang bergejala (Anonim<sup>6</sup>, 2006)

Adanya daun muda pada pucuk dan daun tua tanaman akan menjadi layu, daun bagian bawah menguning merupakan ciri khas gejala penyakit layu bakteri. Meskipun tak sebanyak penyakit akibat jamur yaitu 38 spesies dibandingkan Bakteri yang hanya 7 spesies menurut Mendoza, 1987., namun secara umum penyakit bakteri lebih sukar dikendalikan. Cara paling efektif untuk mengendalikan penyakit-penyakit bakteri yaitu dengan penggunaan kultivar yang resisten atau toleran terhadap penyakit tersebut, sertifikasi benih dan rotasi tanaman (Anonim, 2007).

Adapun Klasifikasi dari bakteri *Ralstonia solanacearum* penyakit layu pada kentang menurut E.F. Smith dalam Buchman dan Gibbions (1974), Yabuuchi, *et al* (1995) adalah :

Kingdom	: Prokariotik
Divisio	: Gracilicutes
Classis	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Ralstonia</i>
Spesies	: <i>Ralstonia solanacearum</i>

*Ralstonia solanacearum* adalah bakteri aerobik, berbentuk batang, berukuran (0,5 – 1,0 x 1,5 – 2,5)  $\mu\text{m}$ , gram negatif, bergerak dengan satu flagel yang terletak diujung sel. Umumnya isolat yang virulen memiliki flagella sedangkan isolat non virulen flagelnya panjang (Goto, 1992). Bakteri ini diketahui mempunyai banyak ras yang berbeda virulensinya. Ras 1 menyerang terung-terungan dan tanaman lain, seperti tomat, tembakau, dan kacang tanah. Ras 2 menyerang pisang dan Heliconia. Ras 3 khususnya menyerang tanaman kentang (Semangun, 1996). Bakteri ini mampu menghidrolisa gelatin dan twin 80, mampu mereduksi nitrat, dapat menghasilkan asam sukrosa, arginin, dehidrolase negatif, jumlah guanin, dan sitosin dalam DNA 66-69%. Mengandung poly B-hidroksibutirat. Beberapa strain dapat menghasilkan gas dan nitrat (Hayward 1983).

Bakteri mempunyai generasi waktu yang sangat pendek pada keadaan optimal < 20 menit. Selama pertumbuhan, bakteri dalam media cair akan membentuk suspensi yang keruh sedangkan pada media padat akan membentuk koloni yang



bervariasi bergantung pada jenisnya (Habazar dan Rivai, 2000). Strain virulen dengan koloni berlendir atau fluidal yang kemudian berubah menjadi tidak virulen dengan koloni yang berbintik kecil-kecil, perbedaan bentuk koloni dengan derajat virulensinya dihubungkan dengan produksi cairan yang mengandung polisakarida. Pembentukan pigmen seringkali dihasilkan dalam media yang mengandung tirosin (Hutagalung, 1984).

Bakteri ini mempunyai banyak ras dan dapat diisolasi dengan baik pada medium yang mengandung 2, 3, 5- trifenil-tetra sodium klorida (Medium TTK). Infeksi terutama melalui luka pada bagian tanaman. Bakteri terangkut dalam pembuluh kayu dan pada batang yang lunak, masuk dalam ruang antar sel dalam kulit dan empulur, menguraikan sel-sel sehingga terjadi rongga-rongga. Suhu yang relatif tinggi mendukung perkembangan penyakit. Di dataran rendah penyakit timbul lebih berat karena suhu udara relatif tinggi. Bakteri berkembang baik di tanah alkalis yang suhunya agak tinggi di saat banyak hujan. Intensitas penyakit sangat dipengaruhi oleh tanaman terinfeksi pada musim sebelumnya. Penyakit ini banyak dijumpai di Jawa, Sumatera dan Sulawesi khususnya di Sulawesi Utara (Anonim<sup>a</sup>, 2006).

Kultivar baru yang memiliki resistensi tinggi terhadap serangan penyakit bisa diperoleh melalui persilangan konvensional dan teknik rekayasa genetika. Sayangnya teknik persilangan konvensional terbentur pada masalah gen resisten. Umumnya pemuliaan mengambil gen-gen resisten dari tanaman lain (Anonim, 2007).



### II.3 Teknik Deteksi dan Identifikasi Bakteri

Diagnosa penyakit bakteri biasanya dilakukan berdasarkan suatu gejala dan munculnya eksudat bakteri dari jaringan makanan. Pengamatan lebih lanjut masih diperlukan untuk mengkonfirmasi hasil diagnosis. Identifikasi ialah proses yang diterapkan terhadap suatu isolat, sehingga melalui proses tersebut isolat dapat dirujuk kepada taksa yang telah diketahui. Sifat-sifat yang telah dikembangkan untuk identifikasi ke tingkat taksa, diantaranya ciri fenotif, biologi, dan genetik. Ciri fenotip misalnya pewarnaan gram, morfologi koloni, dan tipe metabolisme secara umum. Patogenisitas yang berkaitan dengan hubungan antara inang dan patogen merupakan salah satu ciri biologis, sedangkan ciri genetik berkaitan dengan sifat-sifat materi genetik sel (asam nukleat). Ada beberapa cara tradisional untuk deteksi dan isolasi bakteri dari contoh. Perkembangan metode deteksi dan isolasi bakteri dari contoh. Perkembangan metode deteksi *Ralstonia solanacearum* diantaranya dengan menggunakan media selektif untuk menghitung populasi bakteri dari dalam tanah. Pendekatan untuk mendeteksi layu bakteri telah dilakukan dari berbagai aspek metodologi, yang pada prinsipnya bertujuan untuk menentukan identitas *Ralstonia solanacearum* diantaranya melalui pendekatan biokimia, profil kromatografi asam lemak, profil metabolit, dan teknik Immunologi (Seal, 1994). Pendeteksian *Ralstonia solanacearum* dapat juga dilakukan dengan metode PCR, dengan melihat ukuran gennya melalui elektroforesis. Keberadaan *Ralstonia solanacearum* ditandai dengan munculnya pita dengan ukuran  $\pm 287$  bp.

## II.4 Metode PCR (Polimerase Chain Reaction)

PCR merupakan singkatan dari Polymerase Chain Reaction atau reaksi rantai polimerase ditemukan pertama kali oleh Kary B. Mullis tahun 1985, adalah konsep yang memungkinkan pelipatgandaan segmen DNA dalam tabung dengan bantuan enzim DNA Polimerase (Cold, 1994). Keunggulan PCR dikatakan tinggi, hal ini berdasarkan spesifitasnya, efisiensi, dan keakuratannya, spesifitas. PCR terletak pada kemampuan mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus (Michael, dkk., 1986). Keakuratan yang tinggi karena DNA Polimerase mampu mengurangi kesalahan pada amplikasi produk. Melalui PCR, identifikasi suatu mikroorganisme dari suatu sampel dapat dilakukan dengan cepat dan spesifik. (Blazer, 1998).

Prinsip terjadinya reaksi akibat adanya sifat komplementasi (berpadanan) rantai DNA dengan pasangannya dan dimanipulasi melalui tiga tahapan suhu: denaturasi (pemisahan rantai), *annealing* (penempelan primer), dan perpanjangan rantai oleh DNA Polimerase (Hans, 1994). Materi awal untuk PCR adalah suatu larutan DNA untai ganda yang mengandung urutan nukleotida yang "ditargetkan" untuk disalin (Campbell, 1999). Primer adalah potongan rantai DNA antara 18 – 24 nukleotida yang didesain berkomplemen dengan rantai DNA templat dan menjadi titik batas multiplikasi segmen DNA target. DNA target adalah segmen DNA yang dimultiplikasi dalam reaksi PCR dengan titik batas primer kiri dan primer kanan. Secara teoritik, jika efisiensi reaksi pelipatgandaan seratus persen, dalam putaran ke-

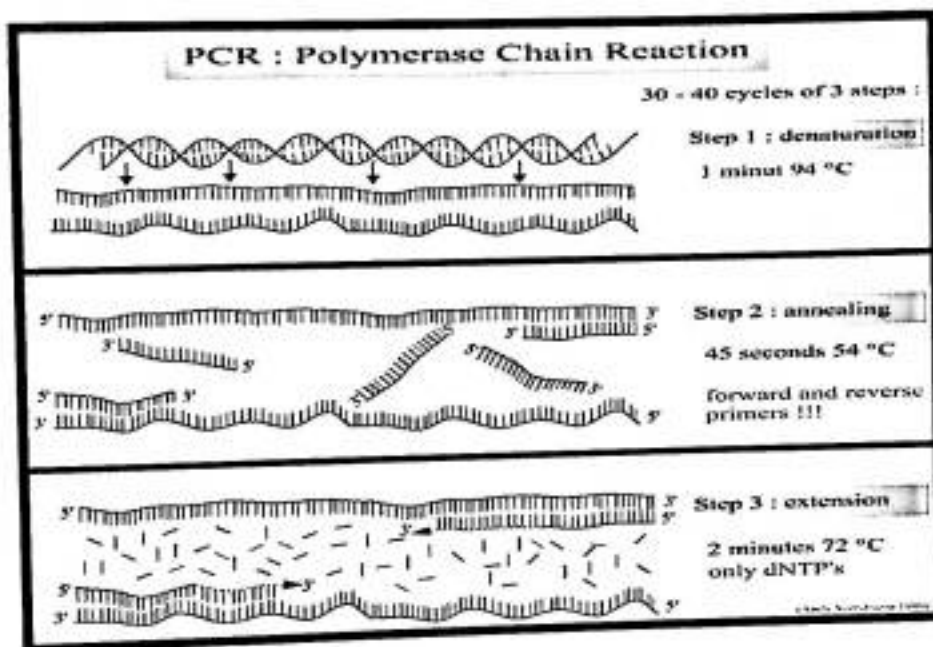
30 siklus reaksi rantai (denaturasi-penempelan-perpanjangan) PCR akan dihasilkan sebanyak kurang lebih satu milyar molekul DNA target. Reaksi komplementasi DNA terjadi sangat spesifik sedemikian rupa sehingga dapat dipakai dalam diagnosis pendeteksian adanya kontaminasi virus dalam sampel biologis yang diteliti. (Anonim<sup>f</sup>, 2006).

PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai *primer* dalam suatu *thermocycler*. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit oleh sepasang primer. Primer yang berada sebelum daerah target disebut sebagai primer *forward* dan yang berada setelah daerah target disebut primer *reverse*. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru dikenal sebagai enzim polymerase. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP (nukleotida berbasis *Adenin*), dCTP (*Cytosine*), dGTP (*Guanine*) dan dTTP (*Thymine*) (Muladno, 2002).

Proses PCR biasanya berlangsung 35-40 siklus. Beberapa komponen penting yang dibutuhkan dalam reaksi PCR adalah DNA target, primer, enzim Taq DNA Polymerase, Deoxynukleoside, triphosphat (dNTP), dan larutan penyangga (buffer) (Muladno, 2002).

Pada akhirnya siklus pertama, satu molekul DNA untai ganda dilipatgandakan jumlahnya menjadi dua molekul DNA untai ganda. Dua molekul DNA untai ganda hasil amplifikasi pada siklus pertama menjadi DNA target dan dilipatgandakan menjadi empat molekul DNA, dan selanjutnya empat molekul baru ini dilipatgandakan lagi jumlahnya menjadi delapan dan seterusnya (Muladno, 2002).

Pada gambar 2 dibawah ini menunjukkan tahapan-tahapan dari proses PCR (Polymerase Chain Reaction), dimana terdiri atas tiga tahap yaitu tahap denaturasi, kemudian tahap annealing atau tahap penempelan primer, serta tahap extension atau pemanjangan primer :



Gambar 2. Tahap PCR

#### II.4.1 Denaturasi

Di dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim *Taq Polymerase* ditambahkan dalam tabung reaksi. Ini biasanya berlangsung selama 3 menit untuk menyakini bahwa molekul DNA yang ditargetkan ini dilipatgandakan jumlahnya benar-benar telah terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Untuk denaturasi berikutnya, diperlukan hanya 30 detik pada suhu 95°C atau 15 detik pada suhu 97°C. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama mungkin mengurangi aktivitas enzim *Taq Polymerase*. Aktivitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5, 95 dan 97,5°C (Muladno, 2002).

#### II.4.2 Penempelan primer (*Annealing*)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G + C, dan  $T_m$  (°C) terhitung untuk kedua primer sebaiknya sama. Selain itu sekuens DNA kedua primer tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Temperatur penempelan yang digunakan biasanya 5°C dibawah  $T_m$  dimana formula untuk menghitung  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ . Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperatur penempelan yang digunakan antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu biasanya antara 50-60°C (Muladno, 2002).

### II.4.3 Pemanjangan Primer (*Extension*)

Selama tahap ini, *Taq Polymerase* memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida per detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian, untuk produk PCR sepanjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap pemanjangan primer ini. Biasanya, diakhir siklus PCR, waktu yang digunakan pada tahap ini diperpanjang sampai lima menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan berbentuk DNA untai ganda (Muladno, 2002).

### II.5 Elektroforesis Gel

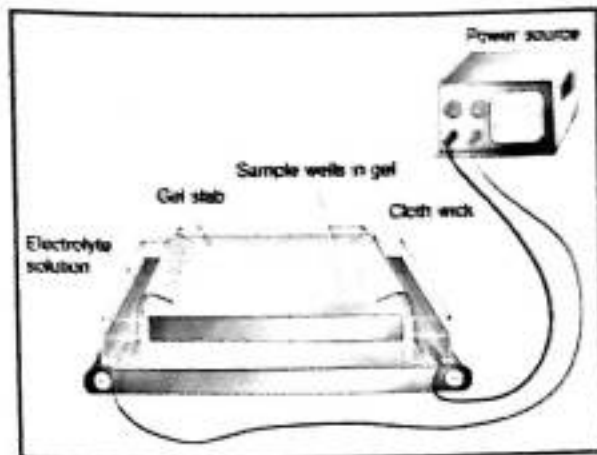
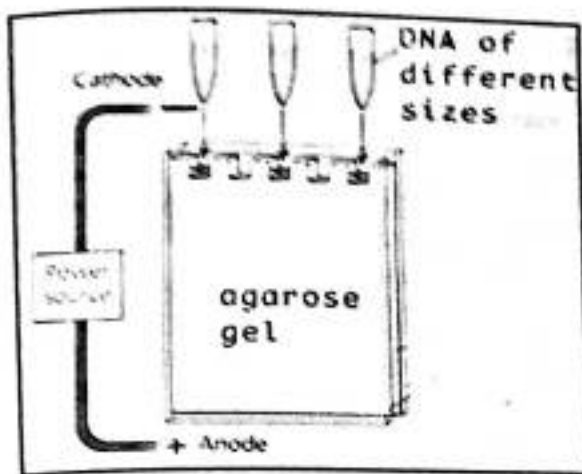
Elektroforesis gel merupakan salah satu teknik utama dalam biologi molekular. Prinsip dasar teknik ini adalah bahwa DNA, RNA, atau protein dapat dipisahkan oleh medan listrik. Dalam hal ini, molekul-molekul tersebut dipisahkan berdasarkan laju perpindahannya oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekul bersangkutan. Elektroforesis gel biasanya dilakukan untuk tujuan analisis, namun dapat pula digunakan sebagai teknik preparatif untuk memurnikan molekul sebelum digunakan dalam metode-metode lain seperti spektrometri massa, PCR, kloning, sekuensing DNA, atau *immuno-blotting* yang merupakan metode-metode karakterisasi lebih lanjut (Anonim<sup>a</sup>, 2006).

Dalam proses elektroforesis, sampel molekul ditempatkan ke dalam "sumur" (*well*) pada gel yang ditempatkan di dalam larutan penyangga, dan listrik dialirkan

kepadanya. Molekul-molekul sampel tersebut akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai dengan muatannya. Dalam hal asam nukleat, arah pergerakan adalah menuju elektroda positif, disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya. Untuk menjaga agar laju perpindahan asam nukleat benar-benar hanya berdasarkan ukuran (yaitu panjangnya), zat seperti natrium hidroksida atau formamida digunakan untuk menjaga agar asam nukleat berbentuk lurus. Sementara itu, protein didenaturasi dengan deterjen (misalnya natrium dodesil sulfat, SDS) untuk membuat protein tersebut berbentuk lurus dan bermuatan negatif. (Anonim<sup>a</sup>, 2006).

Setelah proses elektroforesis selesai, dilakukan proses pewarnaan (*staining*) agar molekul sampel yang telah terpisah dapat dilihat. Etidium bromida, perak, atau pewarna "biru Coomassie" (*Coomassie blue*) dapat digunakan untuk keperluan ini. Jika molekul sampel berpendar dalam sinar ultraviolet (misalnya setelah "diwarnai" dengan etidium bromida), gel difoto di bawah sinar ultraviolet. Jika molekul sampel mengandung atom radioaktif, autoradiogram gel tersebut dibuat. (Anonim<sup>a</sup>, 2006).





Gambar 3. Alat Elektroforesis

(Anonim<sup>e</sup>, 2006 dan Anonim<sup>e</sup>, 2006)

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### III.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah planlet tanaman kentang varietas Atlantik, Granola, Raja, dan Bejo yang diambil keseluruhannya sebanyak 20 planlet, lalu dipilih secara acak sebanyak masing-masing 2 planlet setiap varietas untuk diseleksi keberadaan patogennya. Sebagai kontrol positif digunakan umbi yang berasal dari pertanaman petani yang memperlihatkan gejala layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) varietas Atlantik.

#### III.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Pusat Kegiatan Penelitian (PKP) Universitas Hasanuddin, Makassar, berlangsung Desember 2006 sampai Februari 2007

#### III.3 Alat

##### III.3.1 Alat – alat untuk ekstraksi dan purifikasi

Alat – alat yang digunakan untuk ekstraksi dan purifikasi DNA yaitu : erlemeyer (pyrex), shaker (Ika Labortechnik KS 501 digital), mikrotip (eppendorf), vortex (labinco), sentrifugasi tanpa suhu, sendok tanduk, mortar, tabung eppendorf ukuran besar, rak tabung eppendorf, mikropipet (eppendorf), penangas air, (Dr.

Lange universal Thermostat), gelas ukur (pyrex), botol reagen, hot plate magnetic (labinco), magnetic stirrer, neraca analitik (Denver instrumen M – 220), lemari pendingin (sharp), termometer, dan blok heater (stuart scientific), Water bath.

### **II.3.2 Alat – alat untuk PCR**

Alat – alat yang digunakan untuk PCR yaitu freezer -20°C, laminary air flow (labconco), mesin PCR (Robocycler stratagena), tabung eppendorf ukuran sedang, rak tabung eppendorf, mikropipet (eppendorf), dan mikrotip (eppendorf).

### **II.3.3 Alat – alat untuk Elektroforesis gel agarosa**

Alat – alat yang digunakan untuk elektroforesis gel agarosa yaitu : elektroforesis vertikal (Biorad), power supplay (power pac 100 biorad), neraca analitik (Denver Instrumen M-220), gelas ukur (pyrex), erlenmeyer (pyrex), mikrowave (sharp), mikropipet (eppendorf), mikrotip (eppendorf), botol reagen, lemari pendingin (sharp), dan perangkat UV light.

## **II.4 Bahan**

### **III.4.1 Bahan untuk ekstraksi dan purifikasi pada Kultur**

Bahan – bahan yang digunakan untuk ekstraksi dan purifikasi DNA yaitu : Umbi tanaman kentang bergejala varietas Atlantik sebagai kontrol positif dan planlet tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L) varietas Atlantik, Granola, Raja, Bejo, kertas saring whatman 10 mmΦ no. 14, bides steril, buffer TE (10 mM Tris – 1 mM EDTA pH 7,6), proteinase K (promega), CTAB 15 % (dalam 0,7 M NaCl dan 1 x TE buffer), kloroform : isoamilalkohol (24 : 1), NH<sub>4</sub> asetat 7,5 M (ammonium

asetat), isopropanol dingin, etanol 70 % dingin, kloroform : isoamilalkohol (24 : 1), acetone dingin, 14% SDS, Isopropanol.

### III. 4.2 Bahan – bahan untuk PCR

Bahan – bahan yang digunakan untuk PCR yaitu ekstrak DNA (template), PCR mix, PCR buffer 10x (dengan 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), dNTPs Mix ( dGTP, dCTP, dATP, dTTP), primer sense

OLI 1 = (5' GGGGGTAAGCTTGCTACGCC 3')

Y2 = (5' CCCACTGGCTGCCTCCCGTAGGAGT 3')

, Enzim taq DNA polimerase (finnzyme), mineral oil, Bides steril PCR Grade.

### III.4.3 Bahan – bahan untuk elektroforesis gel agarosa dan gel polyacrilamid

Bahan – bahan yang digunakan untuk elektroforesis gel agarosa yaitu : agarosa 0,8 % dan 1,5 % buffer TAE 1x (Tris Acetate acid EDTA), loading buffer 6x (promega), Ladder DNA size standar (marker Finnzymes), Etidium bromida (EtBr) 10 µg/ml, bides steril, loading dye Blue orange.

### III.5 Cara kerja

#### III.5.1 Ekstraksi dan Purifikasi DNA

Sampel diambil dari Umbi tanaman kentang yang bergejala dan planlet kentang, terdiri dari 4 varietas yaitu Atlantik, Granola, Raja, dan Bejo, ditimbang sebanyak 1 gram, Kemudian Digerus dengan mortar, diambil air ekstrak tanaman sebanyak 1,5 ml dimasukkan kedalam tabung eppendorf, kemudian disentrifugasi pada 6000 rpm dalam waktu 3 menit, kemudian supernatan dibuang. Pellet yang

terbentuk dibekukan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk 1 jam dan disimpan di dalam ruang temperatur. Kemudian ditambahkan dengan  $100\ \mu\text{l}$  aceton dingin (disimpan  $-20^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 menit. Pellet disuspensi dalam  $500\ \mu\text{l}$  buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,6). Kemudian ditambahkan  $50\ \mu\text{l}$  250 mM EDTA pH 8,0, ditambahkan  $50\ \mu\text{l}$  14 % SDS, dan  $10\ \mu\text{l}$  0,1 % Proteinase K dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu  $55^{\circ}\text{C}$ . Dicukupkan volume 7,5 M Ammonium acetate yang ditambahkan pada DNA Pellet. Kemudian kembali disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 20 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan dipindahkan ke tabung eppendorf. Ditambahkan sebanyak 0,8 volume Isopropanol (disimpan dalam suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ ), dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . DNA Pellet kembali disentrifugasi 15.000 rpm selama 20 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dan dibersihkan dengan ethanol 70% sebanyak 2 kali dan buka eppendorf dalam ruang temperatur. DNA disuspensi kedalam  $25\ \mu\text{l}$  Buffer TE pH 7,6 dan diinkubasi semalaman pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Kemudian didinginkan dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ , kemudian dicek DNA totalnya dengan menggunakan 0,8% Agarose pada elektroforesis.

### III.5.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Prosedur ini dikerjakan pada sampel hasil ekstraksi DNA. Sebelumnya dibuat campuran reaksi PCR (PCR mix) untuk volume  $25\ \mu\text{l}$  pada masing-masing tabung ;, ditambah dengan;  $2,5\ \mu\text{l}$  buffer PCR 10x  $0,5\ \mu\text{l}$  dNTPs 2 mM;  $1\ \mu\text{l}$  tiap primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) yang terdiri dari Primer OLI 1 dan Primer Y2,  $2\ \mu\text{l}$  DNA template; dan  $0,25\ \mu\text{l}$  Taq DNA Polimerase.(5v/ $\mu\text{l}$ ),  $17\ \mu\text{l}$  biocex steril PCR Grade Amplifikasi dilakukan

sebanyak 35 siklus dengan menggunakan mesin PCR thermal cycler. Kondisi amplifikasi yaitu :

Denaturasi 94°C	5 menit	}	1 Siklus
Denaturasi 94°C	2 menit		35 siklus
Annealing 59°C	2 menit		
Extension 72°C	30 detik		
	Final Extension 72°C	10 menit	

### Primer

Untuk deteksi Bakteri *Ralstonia solanacearum* maka digunakan dua primer spesifik. Berikut dua jenis primer yang digunakan dalam mendeteksi bakteri *Ralstonia solanacearum* :

Tabel 1. Urutan Basa Nukleotida pada Primer Spesifik

Primer spesifik	Urutan Basa Nukleotida
OLI 1	(5' GGGGGTAAGCTTGCTACGCC 3')
Y2	(5' CCCACTGGCTGCCTCCCGTAGGAGT 3')

Dimana Keberadaan Bakteri *Ralstonia solanacearum* ditandai dengan munculnya pita dengan ukuran  $\pm 287$  bp

### III.5.3 Elektroforesis DNA total dan Produk PCR

Elektroforesis Produk PCR yaitu dengan menggunakan 1,7 % Agarose, 90 volt selama 20 menit, sedangkan Elektroforesis DNA total yaitu 0,8 % Agarose, 90

volt selama 30 menit. Visualisasi profil DNA dilakukan dengan pewarnaan etidium bromide ( $1\mu\text{g/ml}$ ) selama 15 menit, dilanjutkan pencucian dengan bides steril selama 5 menit, kemudian dideteksi dengan menggunakan sinar UV pada UV-cabinet. Dokumentasi gel kemudian dilakukan dengan menggunakan Geldoc (UVP UPLAND CA UK).



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

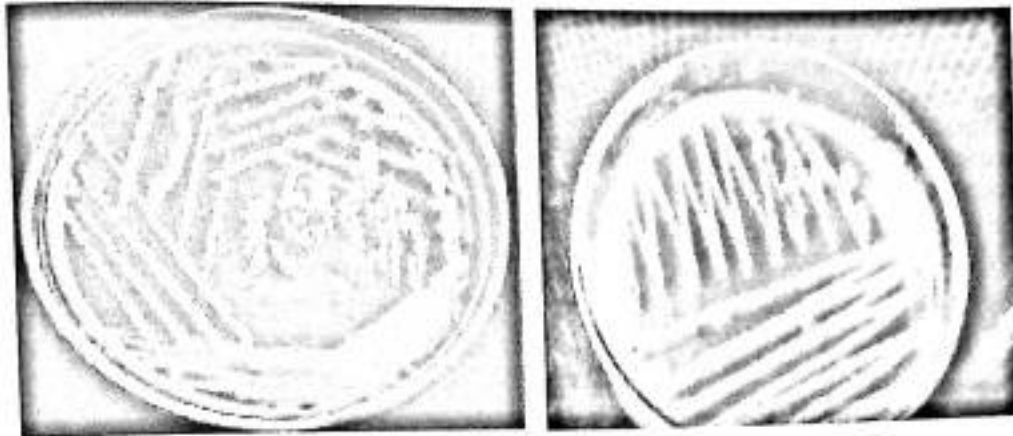
#### IV.1. Isolasi Bakteri

Penyebab penyakit layu bakteri adalah *Ralstonia solanacearum*. Gejala khas pada tanaman terserang adalah daun layu, menguning, dan kering. Rimpang dan batang busuk dan berbau. Batang semu mudah dilepas dari pangkalnya. Berkas pembuluh menjadi berwarna coklat tua atau hitam. Infeksi terutama melalui luka pada bagian tanaman. Bakteri terangkut dalam pembuluh kayu dan pada batang yang lunak, masuk dalam ruang antar sel dalam kulit dan empulur, menguraikan sel-sel sehingga terjadi rongga-rongga. Untuk melihat morfologi dari Bakteri *Ralstonia solanacearum* ini maka dilakukan Isolasi Bakteri.

Tahap pengisolasian bakteri *Ralstonia solanacearum* dari tanaman bergejala bertujuan untuk mendapatkan biakan murninya yang nantinya digunakan sebagai kontrol positif *Ralstonia solanacearum* mula-mula ditumbuhkan pada Medium TTC (2,3,5 -Triphenyl- tetra Sodium Clorida), dan diamati ciri-cirinya secara visual. Bakteri *Ralstonia solanacearum* yang tumbuh pada medium TTC ditandai dengan koloni yang berwarna merah ditengahnya dan tidak berflouorecens, serta disekitarnya berwarna bening (gambar 4). Bakteri *Ralstonia solanacearum* adalah Bakteri aerobik, berbentuk batang, gram negatif (Goto, 1992). Umumnya isolat virulen



memiliki flagella dan bergerak lambat. Strain virulen dengan bentuk koloni berlendir atau fluidal, kemudian berubah menjadi tidak virulen dengan bentuk koloni yang berbintik kecil-kecil (Hutagalung, 1984). Dapat dilihat hasil isolasi bakteri *Ralstonia solanacearum* dari tanaman kentang varietas Atlantik yang bergejala pada pada gambar 4 :



Gambar 4. Biakan *Ralstonia solanacearum* Pada Medium TTC

Hasil pengujian secara Biokimia dapat dilihat pada Tabel dibawah ini :

Tabel 2. Uji Biokimia Bakteri *Ralstonia solanacearum*

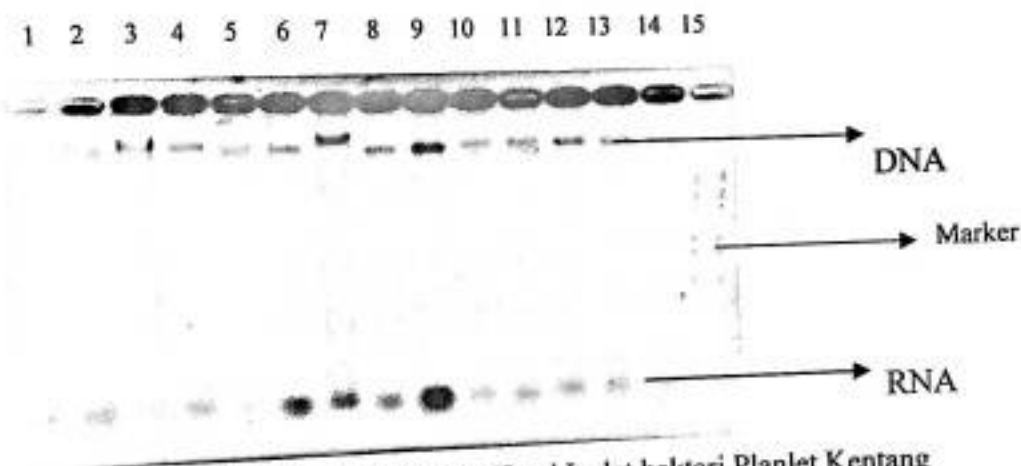
No	Uji Perekasi	Hasil					
		Berlendir	Tidak	Gelembung	Tidak	Warna Merah	Warna Ungu
1.	Uji KOH	✓	-	-	-	-	-
2.	Uji d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	-	-	✓	-	-	-
3.	Uji Kovac	-	-	-	-	-	✓

Dari tabel dapat kita lihat bahwa Uji *Ralstonia solanacearum* dengan KOH hasilnya berlendir, dimana KOH merupakan uji terhadap reaksi gram negatif, kemudian uji  $d_2H_2O$  hasilnya bergelembung, kemudian uji Kovac menghasilkan warna ungu.

#### IV.2. Deteksi *Ralstonia solanacearum*

Metode Ekstraksi dan Purifikasi DNA pada planlet Kentang (*Solanum tuberosum* L) dilakukan berdasarkan modifikasi dari metode Li dan De Boer (1995). Dimana pada metode ini sejumlah komponen harus dihilangkan seperti RNA, protein, dan polisakarida, sehingga akan diperoleh DNA yang murni.

Hasil elektroforesis DNA total planlet Kentang dan kultur dengan menggunakan gel agarose 0,8% dapat di lihat pada gambar 5 di bawah ini :



Gambar 5. Hasil Elektroforesis DNA Total Isolat bakteri Planlet Kentang

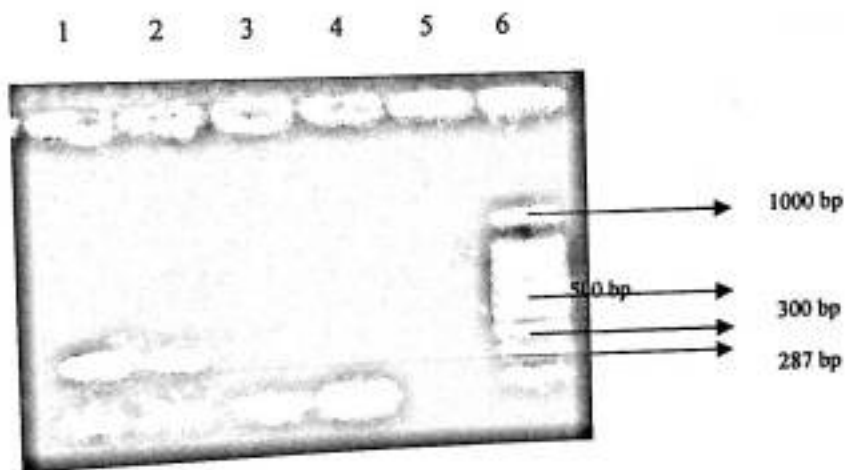
Keterangan : Slot 1-4: A1-A4 (Varietas Atlantik), Slot 5-8: B1-B4 (Varietas Bejo), Slot 9-12 : G1-G4 (Varietas Granola), Slot 13-14: R1-R2 (Varietas Raja), Slot 15 : Marker

DNA total hasil ekstraksi baik pada planlet kentang umumnya memperlihatkan hasil DNA yang jelas, pada proses ini memperlihatkan DNA yang

bervariasi, sedangkan yang ditunjukkan dengan terbentuknya pita yang terkumpul pada bagian bawah gel adalah RNA.

Pada gambar 5 dapat dilihat adanya pita yang tebal ada pula yang tipis, pada pita yang tebal seperti pada B2 dan B4 (Varietas Bejo) membuktikan bahwa pada pita tersebut DNANYa banyak, sedangkan pita yang tipis, DNA yang ada hanya sedikit, namun pada slot 1 tidak memperlihatkan adanya pita DNA.

Setelah proses amplifikasi dengan mesin PCR, tiap sampel diambil sebanyak 8  $\mu$ l lalu dicampur dengan 4  $\mu$ l Loading dye dimana loading dye berfungsi sebagai penanda dan pemberat pada saat dielektroforesis, kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 1,7% pada voltase 90 volt selama 30 menit, hasil elektroforesis produk PCR dapat dilihat pada gambar 6 :



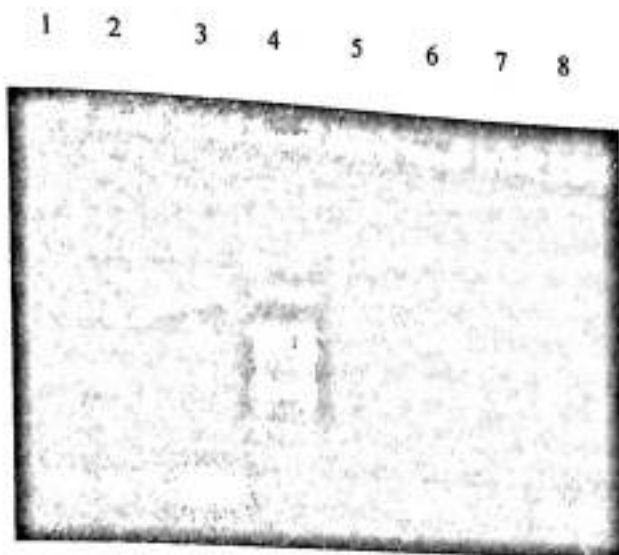
Gambar 6. Elektroforesis Produk PCR Kultur Bakteri.

Keterangan : Slot 1-5 : (Kultur Bakteri), Slot 6 Marker (DNA Ladder 100bp)

Pada gambar 6 terlihat bahwa pada sampel yang berasal dari kultur bakteri (K1 dan K2) terjadi amplifikasi dan menghasilkan produk sebesar 287 bp dengan

menggunakan primer OLI 1 dan Y2. Pada slot nomor 4 dan 5 yang merupakan kultur bakteri lain tidak menghasilkan pita. Penggunaan primer spesifik untuk mikroorganisme tertentu saat ini telah banyak digunakan. Gusmiaty (2007) menggunakan primer spesifik untuk mengetahui virus pada kentang, virus kentang X dan virus kentang Y pada planlet dan umbi kentang varietas Atlantik, Raja, bejo, sedangkan Subandiyah (2007) menggunakan primer spesifik untuk mendeteksi pathogen CVPD pada jeruk. Metode ini relatif mudah dan cepat dan akurat karena jumlah sampel yang digunakan untuk satu kali pengujian dapat mencapai 46 sampel. Penggunaan primer dengan sequens yang homolog untuk patogen tertentu, menyebabkan tidak terjadinya reaksi silang dengan patogen lainnya. Namun syarat yang harus dipenuhi adalah kualitas DNA harus murni dan memerlukan alat dan bahan yang relatif mahal. Terdapatnya pita pada bagian bawah dengan ukuran kurang dari 100 bp diduga adalah RNA yang tidak terurai pada proses pemurnian

Hasil dari elektroforesis produk PCR dari tanaman planlet dapat kita lihat pada gambar 7 :



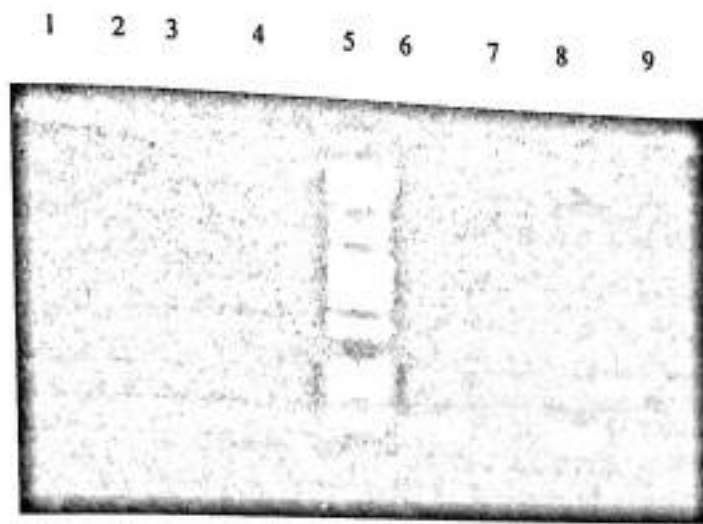
Gambar 7. Hasil elektroforesis produk PCR,

Keterangan : Slot 1-3 ; Kultur bakteri Planlet Kentang Varietas Bejo, Slot 4 Marker (DNA Ladder 100 bp), Slot 5 : Bidest (Kontrol negatif), Slot 6-8 : Kultur bakteri Planlet Varietas Atlantik

Hasil Pengujian pada planlet kentang varietas Atlantik, Bejo, menunjukkan hasil yang negatif. Hal ini ditunjukkan dengan tidak munculnya pita pada kisaran 287 bp. Keberadaan *Ralstonia solanacearum* pada kultur jaringan sebetulnya dapat dideteksi dengan munculnya koloni bakteri pada media tanaman. Namun hal ini dapat dideteksi jika infeksi berasal dari luar. Pada kasus dimana infeksi berasal dari indukan yang sakit dan konsentrasi bakteri masih sedikit maka gejala tanaman atau planlet tidak akan terlihat. *Ralstonia solanacearum* adalah salah satu jenis patogen yang sifatnya sistemik.

Penggunaan metode PCR dengan primer spesifik dapat mendeteksi keberadaan patogen yang sangat kecil hingga kurang dari 5 pikogram/gr sampel. Hal

ini jauh lebih akurat dengan metode Elisa dengan antibody monoclonal yang membutuhkan jumlah konsentrasi bakteri yang lebih besar dari penggunaan PCR tersebut.



Gambar 8 . Hasil Elektroforesis Produk PCR pada Planlet Kentang

Keterangan : Slot 1-4 ; Kultur bakteri Planlet Kentang varietas Granola Slot 5 :  
Marker  $\lambda$ , Slot 6-9 ; Kultur bakteri Planlet kentang varietas Raja.

Pada gambar di atas menunjukkan bahwa dengan menggunakan marker  $\gamma$  dimana marker  $\lambda$  merupakan marker yang berukuran 100 bp sampai 1500 bp, Hasil pengujian pada planlet kentang varietas Granola, dan Raja juga menunjukkan hasil yang negatif. Hal ini ditunjukkan dengan tidak munculnya pita pada kisaran 287.

Berdasarkan hasil ini, membuktikan bahwa planlet kentang varietas Atlantik, Raja, Bejo dan Granola, bebas dari kontaminasi patogen dan dapat digunakan sebagai bibit untuk pertanaman kentang kentang di lapangan.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil hasil yang diperoleh pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

- Hasil uji PCR pada seluruh sampel planlet tanaman kentang varietas Atlantik, Bejo, Granola, dan Raja adalah negatif, tidak mengandung *Ralstonia solanacearum*
- Penggunaan primer spesifik OLI 1 dan Y2 dapat mendeteksi keberadaan *Ralstonia solanacearum* dengan munculnya pita berukuran 287 bp
- Berdasarkan identifikasi secara morfologi dan biokimia dilanjutkan dengan hasil uji PCR pada sampel umbi kentang yang bergejala terdeteksi terinfeksi bakteri *Ralstonia solanacearum*.

#### V.2 Saran

- Sebaiknya perlu dilakukan pengujian lebih lanjut pada umbi kentang Generasi G0, G1, dan G2, untuk mengidentifikasi adanya infeksi yang berasal dari luar tanaman .

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2005. **Benih Kentang**. Laboratorium Bioteknologi Pertanian Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Anonim<sup>a</sup>. [www.wikipedia.org/wiki/biologi\\_molekuler.html](http://www.wikipedia.org/wiki/biologi_molekuler.html), diakses tanggal 12 Maret 2006
- Anonim<sup>b</sup>. [www.deptan.go.id/infoeksekutif/horti/lp-prod-kentang.htm](http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/horti/lp-prod-kentang.htm) diakses tanggal 2 Mei 2006
- Anonim<sup>c</sup>. [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2250/Week\\_Three/1GeneW3.html](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2250/Week_Three/1GeneW3.html) diakses tanggal 20 Agustus 2006.
- Anonim<sup>d</sup>. [http://www.deptan.go.id/ditlinhorti/opt/tomat/layu\\_bakteri.htm](http://www.deptan.go.id/ditlinhorti/opt/tomat/layu_bakteri.htm) diakses tanggal 20 Agustus 2006).
- Anonim<sup>e</sup>. <http://persoout.curie.fr/Claus.Fuetterer/ELEKTROPHORESIS/longdna.html> diakses tanggal 20 Agustus 2006.
- Anonim<sup>f</sup>. [http://sentrabd.com/main/info/P3/Pengertian\\_PCR.htm](http://sentrabd.com/main/info/P3/Pengertian_PCR.htm) diakses tanggal 31 Agustus 2006.
- Anonim<sup>g</sup>. [www.redepapa.org/murchal.html](http://www.redepapa.org/murchal.html) diakses tanggal 17 Desember 2006
- Anonim<sup>h</sup>. [www.jvpresearch.org/nested\\_pcr.htm](http://www.jvpresearch.org/nested_pcr.htm) diakses tanggal 17 Desember 2006.
- Anonim. 2007, [www.Cybernews.co.id/Hordothionin\\_Membuat\\_Kentang\\_Tahan\\_Penyakit/htm](http://www.Cybernews.co.id/Hordothionin_Membuat_Kentang_Tahan_Penyakit.htm) diakses tanggal 14 January 2007).
- Buchman, R.E. and N.E. Gibbons, 1974. **Bergeys Manual of Determinative Bacteriology**. The William and Wilkins Company Baltimore, USA. 219 – 223.
- Campbell, N.A., Mitchell, L.G. and Reece, J.B. 2002. *Biologi*, Jilid I Edisi Kelima. Penerbit Erlangga, Jakarta. Terjemahan dari ITB
- Cold Spring Harbor Laboratory. 1994. **Polimerase Chain Reaction**. DNA Learning Centre.
- Duriat S Ati Srie., 1983. **Pengenalan Penyakit Patogen dalam Pengembangan Kentang di Indonesia** Penerbit Ghalia Indonesia



- Dwidjoseputro, D., 1994. **Dasar – Dasar Mikrobiologi**. Penerbit Djambatan. Jakarta
- Firdiah, 2005. **Efektivitas dan efisiensi 3 Metode ekstraksi DNA cendawan *Phoma Lingan* (Tode ex Fr) Sebagai template untuk Proses PCR (Polimerase Chain Reaction) Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian dan Kehutanan Universitas Hasanuddin. Makassar**
- Goto, M., 1992. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**, Academic Press. Inc, Tokyo.
- Habazar, T. dan F. Rivai, 2000. **Pengantar Pemuliaan Tanaman**. Badan Kerjasama Perguruan Tinggi Negeri, Indonesia Timur.
- Hans G. Schlegel. 1994. **Mikrobiologi Umum**, Edisi keenam. Gajah Mada University. Yogyakarta
- Hartus, T., 2001. **Usaha Pembibitan Kentang Bebas Virus**. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Hayward, A.C., 1983. **Pseudomonas, The Non-Flouescens**, In : Fahy, P.C and Preslay, G.J. **Plant Bacterial Disease, A Diagnostic guide**. Academic Press Sidney, Australia
- Hutagalung, L., 1984. **Beberapa Aspek Penularan Bakteri Layu *Pseudomonas solanacearum* melalui umbi Kentang dan Kemungkinan Penanggulungannya**. Fakultas Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Manzila. Machmud, Jumanto, Yadi., 2003. **Teknik Produksi Antibodi Monoklonal (McAb) untuk Deteksi dan Identifikasi *Ralstonia solanacearum*** Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman Bogor, 23-24 September 2003
- Michael J. Pelzcar , Jr., ECS Chan., 1986. **Dasar – Dasar Mikrobiologi**. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Muladno, 2002. **Seputar teknologi rekayasa Genetika**. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor
- Pitojo, S., 2004. **Benih Kentang**. Kanisius. Yogyakarta
- Rukmana, R., 1997. **Budidaya Kentang dan Pasca Panen**. Kanisius. Jakarta.

- Samadi B., 1997, **Usaha Tani Kentang** Penerbit Kanisius, Yogyakarta
- Semangun, H., 1996. **Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan**. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Setiadi dan Nurya Fitri N., 1997. **Kentang: Varietas dan Pembudidayaan**. Penebar Swadaya. Jakarta. Hal. 45-51.
- Soelarso B. R., 1997. **Budidaya Kentang Bebas Penyakit** Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Soleh, M., 1992. **Pemuliaan Tanaman Kentang**. Prosiding Simposium Pemuliaan Tanaman I. Perhimpunan Pemulia Tanaman Indonesia : 157.
- Tjitrosoepomo, G., 2002. **Taksonomi Tumbuhan Spermatophyta**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Wydra, K. and K. Rudolph, 1993. **Analisis of Toxic Extracellular Polysaccharides**. In : **Modern Methods of Plant Analysis** (Linskens, H.F. and Jackson, Feds) New Series. Vol 13. Spriger Verlag Berlin.
- Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta, and Y. Nishiuchi. 1995. **Transfer of two *Burkholderia* and an *alcaligenes* species to *Ralstonia* nov. Proposal of *R. pickettii* (Ralston, Palleroni, and Doudoroff, 1973) comb. *Ralstonia soalanacearum* (Smith, 1986) comb. Microbiology and Immunology. 39 (11) : 897 - 904.**