

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) merupakan salah satu komoditi yang tergolong dalam kelompok hortikultura yang digunakan sebagai bumbu dengan memanfaatkan umbi (Aini et al., 2019). Bawang merah diperdagangkan sebagai komoditas berharga secara mendunia. Umbi tanaman bawang mengandung senyawa yang dapat berperan sebagai antibiotik dan dapat menambahkan nilai cita rasa dalam masakan (Mardani et al., 2023; Simarmata et al., 2023). Tanaman ini ditanaman pada negara-negara beriklim subtropis dan sedang (Chakraborty et al., 2022). Salah satu faktor penting dalam menghasilkan bawang merah yang unggul adalah sistem perbanyakan yang dilakukan. Teknologi perbanyakan bawang merah menjadi alternatif yang digunakan dalam mengembangkan bibit bawang merah (Syam'un et al., 2017). Salah satunya dengan pemanfaatan benih biji bawang merah untuk perbanyakan (Sudaryono, 2018). Akan tetapi, disisi lain para petani lebih banyak mengembangkan perbanyakan bawang merah secara vegetatif dengan memanfaatkan umbi untuk menghasilkan bibit. Tanaman bawang merah juga memiliki tingkat keragaman genetik yang tinggi (Pratiwi et al., 2020). Selain itu, bawang merah juga mengandung berbagai macam senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, saponin, minyak atsiri, kaempferol, flavonglikosida, floriglusin, dihidroaliin, sikloaliin, metiallin, quercetin, polifenol, serta ditemukan sulfur pada bagian umbinya yang memiliki peran penting dalam proses pembentukan umbi tanaman bawang merah (Kristiananda et al., 2022; Narsa et al., 2022; Suryandari et al., 2022).

Konsumsi bawang merah masyarakat Indonesia selama periode 2019–2023 menunjukkan pola yang berfluktuasi, namun secara umum mengalami kecenderungan peningkatan. Rata-rata konsumsi bawang merah pada tahun 2019 tercatat sebesar 2,802 kg/kapita/tahun dan meningkat menjadi 2,861 kg/kapita/tahun pada tahun 2023. Selama periode 2019–2023, terdapat enam provinsi utama sebagai sentra produksi bawang merah yang secara kumulatif menyumbang 90,22% dari total produksi nasional, dengan capaian produksi pada tahun 2023 sebesar 1,98 juta ton. Jawa Timur tercatat sebagai produsen terbesar dengan kontribusi 24,41%, diikuti oleh Jawa Tengah dan Sumatera Barat yang masing-masing berkontribusi sebesar 24,13% dan 11,78%. Selanjutnya, Nusa Tenggara Barat menyumbang 10,71%, Sulawesi Selatan 10,15%, serta Jawa Barat 9,03% terhadap total produksi bawang merah Indonesia. Sementara itu, provinsi lainnya secara keseluruhan memberikan kontribusi sebesar 9,78% (Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian, 2024).

Meningkatnya permintaan global yang pesat, membuat produksi sering kali tidak dapat memenuhi kebutuhan pasar. Oleh karena itu, peningkatan produktivitas dalam budidaya bawang merah menjadi sangat penting. Salah satu cara untuk mencapainya adalah dengan menggunakan strategi ekstensifikasi lahan. Namun,

pemanfaatan lahan salin menjadi pilihan akibat adanya persaingan penggunaan lahan dengan komoditas lain. Tantangan dalam hal ini adalah penggunaan lahan dengan kondisi lingkungan yang tercekam salin disebabkan oleh aktivitas antropogenik (Dúranová et al., 2023; Miller & Nielsen, 2021; Zhang et al., 2023) karena dapat mengurangi hasil panen pada budidaya bawang merah (A. Anjum et al., 2023).

Masalah salinitas merupakan salah satu kendala dalam peningkatan produktivitas. Semakin tinggi tingkat salinitas memberikan pengaruh besar terhadap turunnya produktivitas tanaman. Beberapa penyebab tanah menjadi salin sangat bervariasi seperti air irigasi yang mengandung garam, intrusi air laut atau penguapan yang tinggi dengan curah hujan yang rendah memungkinkan garam naik ke zona perakaran (Handoyo et al., 2018). Cekaman salinitas menyebabkan penurunan yang signifikan pada potensi fisiologis, biokimia, dan genetik suatu tanaman (Dúranová et al., 2023; Ansari et al., 2019; Atkinson et al., 2013; Coêlho et al., 2021; Iyer et al., 2013; Jha & Mishra, 2022; W. Li et al., 2018; Sardar et al., 2023; Shrivastava & Kumar, 2015).

Cekaman salinitas menyebabkan terjadinya cekaman osmotik yang cepat pada akar tumbuhan, sehingga dapat mengakibatkan berkurangnya jumlah daun dan pertumbuhan tunas. Selain itu cekaman salinitas juga dapat menyebabkan ketidakseimbangan ion yang ada pada tumbuhan, kemudian membuat tumbuhan menjadi nekrosis dan mengalami kematian dini daun. Salinitas mempengaruhi proses fotosintesis terutama mengenai pengurangan luas daun karena terjadinya ekspansi sel pada daun muda, kandungan klorofil, konduktansi stomata, dan pada tingkat yang lebih rendah dapat mengakibatkan penurunan efisiensi fotosistem. Selain itu salinitas juga dapat mempengaruhi aktivitas enzim, DNA, RNA, protein dan mitosis (Shrivastava & Kumar, 2015). Cekaman salinitas memberikan pengaruh yang sangat besar terhadap produktivitas tanaman bawang merah, juga dapat menyebabkan gangguan dan perubahan pada pertumbuhan dan proses metabolisme pada tanaman. Peningkatan kadar garam menurunkan kandungan K, Ca, N, P, Mg, Fe, Zn, Cu, dan B pada umbi bawang merah, sekaligus meningkatkan kandungan Na^+ dan Cl^- (Solouki et al., 2023). Konsentrasi garam yang tinggi dapat menyebabkan hilangnya ketersediaan air tanah dan dapat menjadi racun bagi tanaman itu sendiri (Meriem, 2020).

Lima kelas utama salinitas tanah adalah non-salin ($\text{EC} = 0\text{--}2 \text{ dS m}^{-1}$), salin rendah ($\text{EC} = 2\text{--}4 \text{ dS m}^{-1}$), salin sedang ($\text{EC} = 4\text{--}8 \text{ dS m}^{-1}$), sangat salin ($\text{EC} = 8\text{--}16 \text{ dS m}^{-1}$), dan sangat tinggi salinitasnya ($\text{EC} = \geq 16 \text{ dS m}^{-1}$) (Zhang et al., 2023). Sebagian besar tanah salin menunjukkan Na^+ sebagai anion dan Cl^- sebagai kation. Namun, Na^+ , Ca^{2+} , dan Mg^{2+} adalah komponen kation utama dari total garam terlarut dalam tanah, sedangkan Cl^- , SO_4^{2-} , dan karbonat (CO_3^{2-} dan HCO_3^-) merupakan anion utama dalam total garam terlarut di tanah. Baik ion Na^+ maupun Cl^- adalah penyebab paling umum terjadinya salinitas tanah, tetapi Cl^- dianggap lebih berbahaya daripada Na^+ karena dapat menyebabkan berbagai gangguan fisiologis pada tanaman (Mangena, 2023; Ntanasi et al., 2023; Pu et al., 2022; Younis & Mansour, 2023). Kondisi tanah digolongkan sebagai salin Ketika *Electrical Conductivity* (EC) yang

dihasilkan mencapai 4 dS m^{-1} atau lebih setara dengan 40 mM NaCl^- dan menyebabkan stres osmotik pada tanaman (Munns & Tester, 2008).

Kinerja tanaman umumnya menurun pada tingkat salinitas yang lebih tinggi hingga 12 dS m^{-1} . Konsentrasi salinitas berdampak negatif terhadap bawang merah dalam hal perkecambahan, perkembangan dan pertumbuhan daun, tinggi tanaman, ukuran dan bentuk umbi, serta berat umbi (Alam et al., 2023) dan memengaruhi ekspresi gen (Ali et al., 2023; Alshami et al., 2023; Alshegaihi & Alshamrani, 2023; Caamal-Chan et al., 2023; Mishra & Tanna, 2017; Razzaque et al., 2019; Salvatierra et al., 2023; Solouki et al., 2023). Dampak cekaman salinitas dapat dikurangi dengan menggunakan strategi tertentu, salah satunya adalah menggunakan bakteri untuk menginduksi ketahanan terhadap salinitas. Studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa mikroorganisme seperti bakteri, dapat membantu pertumbuhan tanaman, pengelolaan nutrisi, dan pengendalian penyakit. Sehingga dapat digunakan untuk mengurangi cekaman pada tanaman dan meningkatkan toleransi terhadap cekaman biotik maupun abiotik (Shrivastava & Kumar, 2015). Hal ini berarti bahwa bantuan eksternal akan membantu tanaman yang tumbuh di bawah tekanan salinitas untuk mengatasi cekaman akibat salinitas. Oleh karena itu, penggunaan mikroba yang tahan terhadap salinitas perlu ditingkatkan (Singh et al., 2017), seperti rhizobakteri pemacu pertumbuhan tanaman yang toleran terhadap garam (H-PGPR), mikroba holobiont yang mendukung pertumbuhan tanaman dalam kondisi cekaman salin. Mikroba ini dapat bertahan hidup dan berkembang di sekitar akar tanaman serta membentuk mikrobioma di wilayah rizosfer (Gowtham et al., 2017; Khumairah et al., 2022). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa strain bakteri seperti *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, dan *Arthrobacter* dapat meningkatkan pertumbuhan dalam kondisi salin (Khan et al., 2021).

PGPR dapat mensintesis enzim yang memodulasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Hal ini karena beberapa PGPR mengandung enzim 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase (ACCD) (Brijesh Singh et al., 2019; Gamalero & Glick, 2015). Enzim ini dapat menguraikan prekursor etilen pada tanaman, sehingga mengurangi kadar etilen selama pertumbuhan atau saat tanaman mengalami cekaman (Penrose & Glick, 2003). Enzim ACCD mengubah ACC menjadi α -ketobutirat dan amonia, yang mencegah sintesis etilen secara berlebihan di bawah berbagai kondisi cekaman (Bomle et al., 2021; Brijesh Singh et al., 2019; Farajzadeh et al., 2010; A. Gupta et al., 2021; Tiwari et al., 2018). Oleh karena itu, mekanisme ini dapat menjadi cara yang efisien untuk menginduksi toleransi terhadap cekaman salinitas. Enzim ACCD yang dihasilkan dari induksi bakteri berpotensi membantu dalam merespons cekaman salinitas. Dalam hal ini, tanaman dapat bertahan hidup di tanah yang salin. Enzim ACCD juga ditemukan pada berbagai spesies bakteri, seperti *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, and *Pseudomonas*, yang dapat bertahan dalam kondisi cekaman salinitas dan mengurangi toksisitas tanah dengan kadar garam tinggi (Bai et al., 2018; Orozco-mosqueda et al., 2019; Peng et al., 2021).

Tanaman merespon cekaman salinitas secara berbeda, tergantung pada kemampuan tanaman untuk beradaptasi. Sehingga hal ini akan menyebabkan

perubahan morfologi dan fisiologi pada gen tanaman. Bahkan, cekaman salinitas merupakan faktor utama dalam pemrograman ulang ekspresi gen, salah satunya adalah gen aquaporin (Bai et al., 2018). Gen ini dapat ditemukan pada beberapa tanaman, yang membantu melindungi mereka dari cekaman lingkungan. Gen ini adalah protein transmembran yang dikenal sebagai protein intrinsik utama (MIP) yang membentuk saluran di membran sel (Afzal et al., 2016; Mohammadkhani, 2014; Yepes-Molina et al., 2020). MIP termasuk dalam keluarga protein kuno dan dapat ditemukan di semua jenis organisme hidup, seperti bakteri, jamur, hewan, dan tumbuhan (Johanson et al., 2001; Sakurai et al., 2005). Gen ini juga terlibat dalam pengangkutan gas, nutrisi, ion, dan air. Gen ini berperan penting dalam membantu fungsi biologis tanaman serta responnya terhadap cekaman akibat salin (G. Li et al., 2014; Shao et al., 2008; Xu et al., 2013). Aquaporin mengangkut zat netral seperti urea, silikon, boron, hidrogen peroksida, atau gas seperti amonia dan karbon dioksida (Maurel et al., 2008, 2015; Y. Wang et al., 2020). Saat terjadi pengangkutan, membran sel gen membentuk pori heterotetramer yang menghasilkan pori saluran air yang memungkinkan molekul substrat melewatinya.

Aquaporin merupakan protein transmembran yang berperan dalam transportasi air dan zat terlarut, memediasi respon tanaman terhadap salinitas (Bai et al., 2018; Y. Wang et al., 2020). Namun, ekspresi dan peran regulasinya pada bawang merah di bawah kondisi salin masih belum dipahami secara mendalam. *Halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria* (H-PGPR) merupakan pendekatan biologis yang menjanjikan untuk mengurangi dampak negatif cekaman salinitas pada tanaman (Khumairah et al., 2022). Mikroba menguntungkan ini meningkatkan ketahanan tanaman melalui berbagai mekanisme, terutama produksi enzim 1-aminosiklopropana-1-karboksilat (ACC) deaminase, yang menurunkan kadar etilen dan memfasilitasi adaptasi terhadap cekaman (Bomle et al., 2021; Brijesh Singh et al., 2019; A. Gupta et al., 2021; Peng et al., 2021).

Masalah cekaman salinitas menjadi tantangan signifikan dalam bidang pertanian, mempengaruhi pertumbuhan dan produktivitas tanaman, terutama pada tanaman pangan seperti bawang merah. Sementara beberapa tanaman menunjukkan ketahanan terhadap cekaman salinitas, yang lain justru lebih rentan. Hal ini menyoroti pentingnya penelitian mengenai mekanisme toleransi tanaman serta strategi alternatif untuk mitigasi cekaman. Meskipun H-PGPR telah terbukti meningkatkan toleransi salinitas pada beberapa spesies tanaman, peran spesifiknya dalam mengatur ekspresi gen aquaporin pada bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) masih belum jelas. Selain itu, bukti empiris mengenai bagaimana H-PGPR memodulasi respons fisiologis yang dimediasi aquaporin pada bawang merah yang mengalami cekaman salinitas masih sangat terbatas. Ambang toleransi salinitas pada bawang merah yang diinduksi oleh inokulan mikroba juga belum ditentukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menginvestigasi potensi H-PGPR dalam menginduksi ekspresi gen aquaporin dan meningkatkan toleransi salinitas pada *A. ascalonicum* L., serta menjelaskan mekanisme mikroba yang berkontribusi terhadap peningkatan adaptasi terhadap cekaman.

1.2. Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis respon ketahanan tanaman bawang merah terhadap cekaman salinitas setelah diinokulasi bakteri unggul. Serta analisis keterlibatan ekspresi gen aquaporin saat tanaman bawang merah mengalami cekaman salinitas.

Manfaat penelitian ini, yaitu memberikan informasi mengenai peran bakteri dalam menginduksi ekspresi gen ketika tanaman bawang merah mengalami cekaman salinitas.

BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan dengan 2 tahap, yaitu tahap awal penanaman dan pengamatan dilaksanakan di rumah kaca. Sementara itu, tahap kedua dilaksanakan di Laboratorium Genomik Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Kabupaten Bogor yang dimulai pada bulan Februari-Juli 2023.

2.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *polybag*, tanah, arang sekam, cocopeat, urea, ZA, SP 36, KCL, *tally sheet*, nutrient broth, nutrient agar, media DF, *triptic soy agar*, *triptic soy broth*, *1-Aminocyclopropane 1-carboxylic acid* (ACC), 1% AIB (2-Aminoisobutylic acid), amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄), NaCl, air, akuades, *ice gell* atau es batu, alkohol 75%, etanol 100%, tissue, label, plastik sampel, *gloves*, sampel tanaman bawang merah, *Microcentrifuge tube* 1,5 ml, PCR tube, tip 1000 ml, tip 200 ml, tip 0,5-10 µl, tip 10-20 µl, *Total RNA Mini Kit* (Plant) Geneaid (Cat. No. RP100), *aluminium foil*, *agarose*, TAE 1x, *Nuclease Free Water* (NFW), *My Taq HS Red Mix*, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover TOYOBO, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, primer aqp 1, primer β-actin, *Florosafe DNA Stain*, β-mercaptoethanol, nitrogen cair, 1 kb ladder.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *pestle*, spatula, pinset, *ice box*, sendok, rak tube, falcon tube, mikropipet, erlemeyer, gelas ukur, keranjang, ember, alat pH meter digital, *Chlorophyll Content Meter*, alat ukur salin EC 3185, penggaris, ATK, papan alas, timbangan, *freezer*, *microwave*, inkubator shaker, inkubator, *cold box*, mesin PCR, mesin RT-PCR Bio-Rad, alat *centrifuge*, *dry block thermostat*, *vortex*, nanodrop, spektrofotometer, baki cetakan agar elektroforesis, alat elektroforesis, Uv transluminator.

2.3 Prosedur Kerja

2.2.1 Peremajaan Bakteri dan Isolasi Kultur Bakteri

Bakteri diisolasi dari berbagai sumber, seperti tanaman, rizosfer, dan tanah, kemudian disimpan dalam bentuk stok. Beberapa spesies bakteri yang ditemukan, antara lain sebagai berikut.

Tabel 1. Inokulum/starter bakteri yang digunakan sebagai kultur murni

No.	Kode Isolat	Asal Isolat Bakteri	Identifikasi Molekuler (Spesies)
1.	eBWTd 2.1	Daun bawang merah tua	<i>Bacillus subtilis</i>
2.	eBWTd 1	Daun bawang merah tua	<i>Bacillus pumilus</i>
3.	eBWTd 3	Daun bawang merah tua	<i>Pseudomonas guariconensis</i>
4.	eBWMa 5	Akar bawang merah muda	<i>Sphingobacterium</i>

No.	Kode Isolat	Asal Isolat Bakteri	Identifikasi Molekuler (Spesies)
			<i>multivorum</i>
5.	TBWT 8	Tanah	<i>Bacillus stratosphericus</i>
6.	DCM 2.1.2	Bintil akar mangium	<i>Rhizobium tropici</i>
7.	KPR 4.2	Rizosfer kunyit kuning	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8.	CGK DT 1	Endofit kakao	<i>Bacillus sp.</i>
9.	McBt 2	Endofit manggis	<i>Pantoea agglomerans</i>

Bakteri-bakteri tersebut diremajakan dengan cara diperbanyak pada media *nutrient agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 28-30°C selama 1-3 hari. Selain itu, perbanyakan untuk aplikasi pada tanaman juga dilakukan dengan mengambil 1,5 ml isolat bakteri yang ditumbuhkan pada 200 ml *nutrient broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

2.2.2 Uji Enzim ACC Deaminase Bakteri

Penentuan ACCD dilakukan secara kualitatif menggunakan media Dworkin and Foster (DF) yang terdiri dari 4 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g glukosa, 2 g asam glukonat dan 2 g asam sitrat. Hal ini diikuti dengan elemen jejak: 10 mg H_3BO_3 , 11,19 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 124,6 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 78,22 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg MoO_3 (S. Gupta & Pandey, 2019). Kedua, strain bakteri diisolasi secara kualitatif dengan menumbuhkannya pada media tryptic soy agar (TSA), DF murni, DF murni dengan 3 mM ACC (1-Aminocyclopropane 1-carboxylic acid), DF murni dengan 1% AIB (2-Aminoisobutylic acid), dan DF murni dengan amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), dan diinkubasi pada suhu 28-30 °C selama tiga hari. Jika isolat bakteri tumbuh pada media dengan sumber nitrogen, maka terdapat indikasi adanya aktivitas ACCD (S. Gupta & Pandey, 2019).

2.2.3 Uji Bakteri Toleransi Salinitas

Pengujian toleransi salinitas bakteri dilakukan setelah mendapatkan bakteri penghasil enzim ACCD yang paling potensial. Bakteri diuji menggunakan media tryptic soy broth (TSB) dan natrium klorida (NaCl) dengan enam tingkat salinitas, yaitu 0 dS/m, 20 dS/m, 40 dS/m, 60 dS/m, 80 dS/m. Persamaannya adalah sebagai berikut.

$$y = 0,5019x + 1,35 \quad (1)$$

Keterangan :

y : Tingkat salinitas

x : Konsentrasi NaCl (g/L)

Pertama, 13 g NaCl ditambahkan ke dalam media *triptic soy broth* (TSB), ditambah dengan 30 g agar untuk mencapai 20 dS/m. Kemudian, 25,8 g NaCl ditambahkan ke dalam media TSB, ditambah dengan 40 g agar untuk mencapai 40 dS/m. Selanjutnya, 38,7 g NaCl ditambahkan ke dalam media TSB, ditambah dengan 30 g agar untuk mencapai 60 dS/m. Demikian juga, 51,6 g NaCl ditambahkan ke media TSB, ditambah dengan 30 g agar untuk mencapai 80 dS/m. Selanjutnya media ditambahkan dengan Aquades kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Bakteri diisolasi dalam media dan diinkubasi selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm untuk mendapatkan data kuantitatif.

2.2.4 Percobaan Greenhouse

2.2.4.1 Persiapan Media Tanam dan Penanaman Benih Bawang Merah

Persiapan media tanam dilakukan dengan mengisi media tanam dalam *polybag* sebanyak 2 kg dengan perbandingan 3:1:1:1 (tanah, arang sekam, cocopeat, kompos). Dalam penanaman menggunakan benih bawang merah varietas Bima Brebes, yang diberi perlakuan terlebih dahulu dengan merendam benih dalam suspensi kultur murni selama 30 menit lalu memotong ujung tanaman bawang merah kemudian ditanam pada *polybag* dan menutup sebagian benih dengan tanah. Pada percobaan ini menggunakan faktorial dua faktor dengan faktor A yaitu konsentrasi salinitas dan faktor B yaitu perlakuan yang diberikan antara lain sebagai berikut :

Faktor A (Kode K) :

1. Konsentrasi salin 0 dS/m
2. Konsentrasi salin 2 dS/m
3. Konsentrasi salin 4 dS/m
4. Konsentrasi salin 6 dS/m
5. Konsentrasi salin 8 dS/m

Faktor B (Kode F) :

1. KO = Kontrol (tanpa pupuk kimia dan 9 konsorsium bakteri)
2. KN = Pengaplikasian pupuk anorganik 100%
3. NB = Pengaplikasian 9 konsorsium bakteri
4. NB + KN 50 % = Pengaplikasian 9 konsorsium bakteri + pupuk kimia 50%

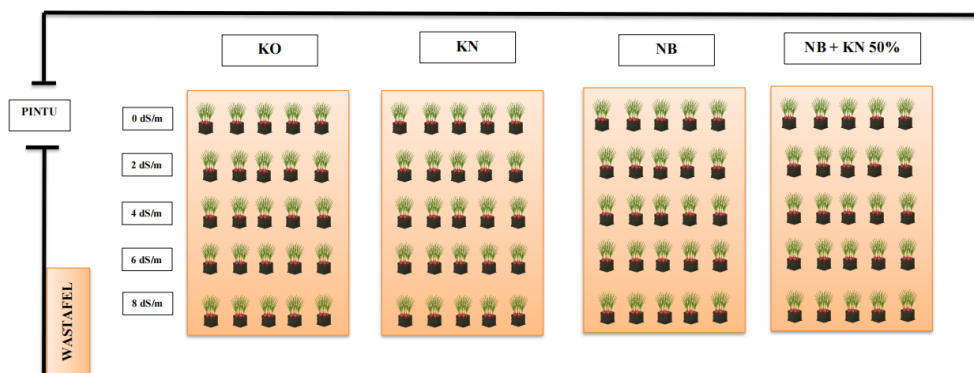
Interaksi :

1. K1F1 = Konsentrasi 0 dS/m + KO
2. K1F2 = Konsentrasi 0 dS/m + KN
3. K1F3 = Konsentrasi 0 dS/m + NB
4. K1F4 = Konsentrasi 0 dS/m + NB + KN 50%
5. K2F1 = Konsentrasi 2 dS/m + KO
6. K2F2 = Konsentrasi 2 dS/m + KN
7. K2F3 = Konsentrasi 2 dS/m + NB
8. K2F4 = Konsentrasi 2 dS/m + NB + KN 50%
9. K3F1 = Konsentrasi 4 dS/m + KO
10. K3F2 = Konsentrasi 4 dS/m + KN

11. K3F3 = Konsentrasi 4 dS/m + NB
12. K3F4 = Konsentrasi 4 dS/m + NB + KN 50%
13. K4F1 = Konsentrasi 6 dS/m + KO
14. K4F2 = Konsentrasi 6 dS/m + KN
15. K4F3 = Konsentrasi 6 dS/m + NB
16. K4F4 = Konsentrasi 6 dS/m + NB + KN 50%
17. K5F1 = Konsentrasi 8 dS/m + KO
18. K5F2 = Konsentrasi 8 dS/m + KN
19. K5F3 = Konsentrasi 8 dS/m + NB
20. K5F4 = Konsentrasi 8 dS/m + NB + KN 50%

Setiap perlakuan masing-masing terdiri dari lima ulangan. Adapun denah plot percobaan dapat dilihat pada gambar antara lain sebagai berikut.

(Media tanaman : Tanah, arang sekam, cocopeat, kompos : 3:1:1:1)



Gambar 1. Denah plot percobaan tanaman bawang merah

2.2.4.2 Pengaplikasian Natrium Klorida (NaCl)

Pada metode ini dilakukan pengaplikasian larutan natrium klorida (NaCl) yang telah dilarutkan menggunakan konsentrasi *Electrical Conductivity* (EC) 0, 2, 4, 6, 8 dS/ m. Larutan di aplikasikan pada 4 kombinasi perlakuan yaitu K0, KN, NB, dan NB + KN 50% dengan masing-masing terdiri atas 5 ulangan.

2.2.4.3 Pengaplikasian Sembilan Konsorsium Bakteri

Untuk tahap ini dilakukan setelah pengaplikasin NaCl pada umur tanaman mencapai 15 HST, 25 HST, dan 35 HST dengan pemberian larutan kultur murni sembilan konsorsium bakteri yang telah di isolasi dengan perbandingan 1,5 ml isolat bakteri dalam 200 ml media nutrient broth (NB) yang di shaker selama 48 jam, kemudian diaplikasikan sebanyak 5 ml untuk kombinasi perlakuan NB dan NB + KN 50%. Pengaplikasiannya dilakukan dengan menyiram area perakaran tanaman bawang merah.

2.2.4.4 Pemupukan

Pengaplikasian pemupukan dilakukan sebanyak 3 kali yaitu 15 HST, 25 HST dan 35 HST menggunakan pupuk urea, ZA, SP 36 dan KCL yang dicampur menjadi satu dengan konsentrasi 50 % untuk perlakuan NB + KN 50% dan 100% untuk perlakuan KN. Pada pengaplikasian 15 HST menggunakan campuran urea, ZA, SP 36 dan KCL dengan konsentrasi 50% sebanyak 1gr/*polybag* dan konsentrasi 100% sebanyak 2 gr/*polybag*. Untuk pengaplikasian 25 HST menggunakan campuran urea, ZA, dan KCL dengan konsentrasi 50% sebanyak 0,81 gr/*polybag* dan konsentrasi 100% sebanyak 1,62 gr/*polybag*. Pengaplikasian terakhir pada umur 35 HST menggunakan urea, ZA, dan KCL dengan konsentrasi 50% sebanyak 0,70 gr/*polybag* dan konsentrasi 100% sebanyak 1,40 gr/*polybag*.

2.2.4.5 Parameter Pengamatan Percobaan Greenhouse

Parameter pengamatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut:

1. Pengukuran tinggi tanaman (cm) pada umur 15, 30, 45, 60, dan 75 hari setelah tanam (HST)
2. Pengamatan jumlah daun pada umur 15, 30, 45, 60, dan 75 hari setelah tanam (HST)
3. Pengamatan jumlah anakan pada umur 15, 30, 45, 60, dan 75 hari setelah tanam (HST)
4. Pengukuran kandungan klorofil daun menggunakan alat *Chlorophyll Content Meter* pada 15, 30, 45, 60, dan 75 hari setelah tanam (HST)
5. Pengamatan jumlah umbi pada umur 92 hari setelah tanam (HST).
6. Pengukuran bobot basah dan bobot kering *Allium ascalonicum* L. saat panen pada umur 92 hari setelah tanam (HST).

2.2.5 Analisis Ekspresi Gen

2.2.5.1 Pengambilan Sampel Daun Tanaman Bawang Merah (50 HST)

Pengambilan sampel jaringan tanaman bawang merah pada umur 50 HST dilakukan dengan mengambil bagian daun 0-5 cm dan 5-10 cm untuk kadar EC 0, 4 dan 8. Semua sampel dimasukkan dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml dan disimpan pada *ice box* yang berisi nitrogen cair selama proses pengambilan sampel. Setelah selesai sampel disimpan pada kulkas dengan suhu -80°C.

2.2.5.2 Ekstraksi RNA Sampel Daun Tanaman Bawang

Ekstraksi RNA dari jaringan tanaman dilakukan untuk memperoleh elusi RNA tanaman dengan menggunakan *Total RNA Mini Kit* (Plant) Geneaid ([Cat. No. RP100](#)) dengan metode sebagai berikut.

- a) **Tahap Lysis** : menambahkan 50-100 mg jaringan tanaman segar atau beku yang dihaluskan menggunakan *pestle*, lalu dipindahkan pada *microcentrifuge tube* 1,5 ml
- b) Menambahkan 500 µl *RB Buffer* atau *PRB Buffer* dan 5 µl β-mercaptoethanol ke dalam tube sampel dan campur menggunakan *vortex*

- c) Menginkubasi sampel pada suhu 60°C selama 5 menit. Lalu diletakkan pada *Filter Column* dalam *collection tube* 2 ml. selanjutnya, campuran sampel dimasukkan pada *Filter Column* dalam *collection tube* 2 ml
- d) Melakukan sentrifugasi pada 1000 g selama 1 menit, kemudian *filter column* dibuang. Filtrat dari hasil sentrifugasi dipindahkan secara hati-hati pada *microcentrifuge tube* 1,5 ml yang baru
- e) **Tahap RNA Binding** : menambahkan ½ volume etanol absolut pada filtrat yang tersebut, kemudian dikocok kuat-kuat. (Misalnya : ditambahkan 250 µl etanol absolut pada 500 µl filtrat)
- f) Meletakkan *RB Column* dalam *collection tube* 2 ml, kemudian campuran larutan dipindahkan pada *RB column*. Selanjutnya, disentrifugasi pada 14-16000 g selama 1 menit. Larutan tersebut dibuang, kemudian ditempatkan kembali dalam *RB column* pada *collection tube* 2 ml yang sama
- g) **Tahap RNA Wash** : menambahkan 400 µl *W1 Buffer* ke tengah *RB Column*. Selanjutnya, disentrifugasi pada 14-16000 g selama 30 detik. Larutan tersebut dibuang, kemudian ditempatkan kembali dalam *RB column* pada *collection tube* 2 ml yang sama
- h) Menambahkan 600 µl *Wash Buffer* (pastikan etanol telah ditambahkan) pada tengah *RB Column*. Selanjutnya, disentrifugasi pada 14-16000 g selama 30 detik. Larutan tersebut dibuang, kemudian ditempatkan kembali dalam *RB column* pada *collection tube* 2 ml yang sama
- i) Menambahkan 600 µl *Wash Buffer* (pastikan etanol telah ditambahkan) pada tengah *RB Column*. Selanjutnya, disentrifugasi pada 14-16000 g selama 1 menit. Larutan tersebut dibuang, kemudian ditempatkan kembali dalam *RB column* pada *collection tube* 2 ml yang sama. Tahap berikutnya, disentrifugasi kembali pada 14-16000 g selama 3 menit untuk mengeringkan kolom matriks
- j) **Tahap RNA Elution** : *RB Column* yang telah dikeringkan, kemudian ditempatkan pada 1,5 *microcentrifuge tube* baru yang bersih
- k) Menambahkan 50 µl *RNase-free Water* ke tengah kolom matriks, kemudian diamkan minimal 2 menit untuk memastikan **RNase-free Water** terserap sempurna. Selanjutnya, disentrifugasi pada 14-16000 g selama 1 menit untuk mengelusi RNA murni.
- l) RNA elusi selesai di ekstraksi dan siap digunakan. Untuk penyimpanan yang lama pada suhu -80°C.

Elusi RNA yang telah diekstraksi selanjutnya diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan NanoDrop.

2.2.5.3 Transkrip RNA Menjadi cDNA

RNA murni ditranskrip menjadi cDNA menggunakan ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover TOYOBO ([Code No. FSQ-301 200 reactions](#)) dengan metode sebagai berikut :

1. Persiapkan terlebih dahulu **4x DN Master Mix** dan **gDNA Remover**, kemudian campur dengan perbandingan 88 µL 4x DN Master Mix : 1,8 µL.
2. Persiapkan DNase I reaction solution, kemudian campur di atas es dengan komposisi seperti pada tabel 2.

Tabel 2. Komponen DNase I reaction solution

Komponen	Volume
4 DN Master Mix	2 µl
<i>Template</i> RNA	X µl
H ₂ O	Y µl (ditambahkan hingga mencapai 8 µL)
Volume Total	8 µl

Untuk memperoleh nilai X *Template* RNA, dapat menggunakan rumus :

$$M1.V1 = M2.V2 \quad (2)$$

Ket :

M1 = Nilai 0,5 µg (1 µg : 1000 ng)

V1 = Volume air

M2 = Nilai ng sampel

V2 = Nilai X yang dicari

3. Inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit
4. Persiapkan untuk reverse transcription solution, dan campur seperti pada tabel 3.

Tabel 3. Komponen reverse transcription solution

Komponen	Volume
Reacted solution from (3)	8 µl
5x RT Master Mix II	2 µl
Volume Total	10 µl

5. Inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit
6. Inkubasi pada suhu 50°C selama 5 menit (**Opsional**)
7. Panaskan pada suhu 98°C selama 5 menit
8. Simpan larutan hasil transkrip pada suhu 4°C atau -20°C (boleh digunakan langsung)

2.2.5.4 Amplifikasi cDNA Menggunakan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hasil dari transkrip cDNA kemudian di optimalisasi PCR untuk mendeteksi keberadaan cDNA menggunakan *My Taq HS Red Mix* ([Cat. No. BIO-25047](#)) dengan komposisi sebagai berikut.

Tabel 4. Komposisi PCR Mix

Komponen	Volume
<i>Template cDNA</i>	5 μ l
<i>Primer Aqp/β-Actin</i>	1 μ l
<i>My Taq</i>	6 μ l
Volume Total	12 μl

Untuk proses PCR dilakukan dengan siklus sebagai berikut :

1. *Denaturasi* awal pada suhu 95°C selama 1 menit
2. *Denaturasi* pada suhu 95°C selama 15 detik
3. *Annealing* pada suhu 60°C selama 15 detik
4. *Extension* pada suhu 72°C selama 10 detik
5. *Go to step* (diulangi) 34x
6. *Final extension* pada suhu 72°C selama 3 menit
7. Pendinginan pada suhu 12°C (∞)

2.2.5.5 Elektroforesis Hasil PCR

Hasil PCR cDNA kemudian di elektroforesis untuk mengamati cDNA yang di amplifikasi. Adapun langkah-langkahnya sebagai berikut :

1. Membuat *gel agarose* dengan komposisi 0,16 gr *agarose* yang dilarutkan dalam 20 ml TAE (yang telah diencerkan dengan aquades steril). Kemudian dipanaskan dalam *microwave* hingga mendidih.
2. Menambahkan *FluorSAFE DNA Stain* ke dalam larutan *agarose* sebanyak 0,75 μ l setelah larutan menjadi hangat.
3. Melakukan tahap selanjutnya dengan menuang larutan pada baki gel yang telah disediakan dan tunggu hingga mengeras.
4. Melakukan tahap akhir yaitu elektroforesis dengan memasukkan gel *agarose* pada alat elektroforesis, kemudian ditambahkan larutan TAE (yang telah diencerkan dengan aquades steril) hingga gel terendam secara keseluruhan.
5. Memasukkan cDNA hasil PCR pada sumur gel secara berkala sesuai dengan jumlah sampel sebanyak 12 μ l dan 8 μ l *ladder* sebagai penanda. Kemudian dielektroforesis dengan 80 volt selama 40 menit.
6. Mengamati hasil elektroforesis pada *UV transilluminator* dengan melihat apakah terdapat pita DNA pada gel.

2.2.5.6 Real Time- quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Setelah melakukan optimasi menggunakan PCR, selanjutnya dapat dilakukan tahap RT-qPCR menggunakan THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix ([Code No. QPS-201T 40 reactions](#), [QPS-201 200 reactions](#)) untuk mendeteksi ekspresi gen secara kuantitatif. Dengan komposisi larutan mix sebagai berikut.

Tabel 5. Komposisi larutan mix RT-qPCR

Komponen	Volume
<i>Water</i>	3,5 μ l
<i>qPCR Mix</i>	5 μ l
<i>Primer Aqp/β-Actin</i>	1 μ l
<i>cDNA</i>	0,5 μ l
Total Volume	10 μl

Kemudian optimasi siklus yang digunakan untuk RT-qPCR (Bio-Rad) antara lain sebagai berikut.

1. Aktivasi enzim pada suhu 95°C selama 1 menit
2. *Denaturasi* pada suhu 95°C selama 15 detik
3. *Annealing* pada suhu 60°C selama 30 detik
4. *Extension* pada suhu 72°C selama 1 menit
5. Tambahkan *Plate Read*
6. *Go to step 2* sebanyak 39x
7. 95°C selama 10 detik
8. *Melt curve* pada suhu 65-95°C (in 0,5°C inc)
9. Tambahkan *Plate Read*

Pada metode ini, digunakan primer aquaporin (PIP) sebagai penanda untuk mengetahui ekspresi gen pada jaringan tanaman bawang merah. Sekuens gen aquaporin disejajarkan menggunakan perangkat lunak gen laser DNA dan dibandingkan dengan sekuens yang tersedia di GenBank menggunakan program BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Sedangkan primer β -actin digunakan sebagai internal kontrol pada RT-qPCR.

Table 6. Desain primer aquaporin (PIP) yang digunakan untuk mengukur ekspresi gen *Allium ascalonicum* L.

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GCTACTTTACGCAACTCACCCA	22	58	50
Reverse primer	TTGGTGAGCTCACCCATGTCG	21	61	57

2.4 Analisis Data

Data disajikan sebagai nilai rata-rata dari tiga ulangan biologis, disertai dengan nilai standar deviasi (SD). Data yang diperoleh diolah menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) untuk pengamatan *greenhouse*, dan Rancangan Acak Lengkap (RAL) untuk hasil pengujian laboratorium. Selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan analisis varians satu arah (ANOVA), diikuti dengan uji faktorial dua faktor. Semua analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak IBM SPSS versi 21.0, dan visualisasi data dibuat menggunakan Art Studio. Suatu hasil dianggap signifikan secara statistik jika nilai p kurang dari 0.05.