

Potency of Yeasts Isolated from Shallot Rhizosphere to Control Basal Rot (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*) Disease on Shallot

Sri Hartati^{1*}, Risma Yuniyah Nur'haqi², Wahyu Daradajat Natawigena¹, Tarkus Suganda¹

¹Departement of Plant Pests and Diseases, Agriculture Faculty, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, West Java 45363

²Student of Agrotechnology Study Program, Faculty of Agriculture, Universitas Padjadjaran

*Corresponding Author : s.hartati@unpad.ac.id

Received January 31, 2022; revised May 17, 2022; accepted May 25, 2022

ABSTRACT

One of the major diseases of shallots is basal rot disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* (FOC). Biocontrol agents can be used as an environmentally friendly control method. Some yeasts isolated from the rhizosphere may have the potencies to control soilborne plant pathogen such as FOC. This study was objected to obtain yeast isolates from the rhizosphere of shallots that have the potencies to control basal rot. The first step was isolation of yeasts from the rhizosphere of shallots and isolation of FOC. The yeast isolates were then tested for their potencies in suppressing FOC in vitro and decreasing the basal rot disease on the shallot plants. There were ten yeast isolates obtained from the rhizosphere of shallot, in which seven isolates were non pathogenic to shallot plant. These seven isolates were further tested for their potencies in controlling FOC and basal rot disease. The results showed that those isolates were able to inhibit the colony growth of FOC by 16,11% - 38,33% in the in vitro dual culture test, and 21,11% - 38,89% in the production of volatile compound test. The isolates also suppressed the basal rot disease incidences by 8,30% - 24,98%. Isolates Cm2 and Cm3 caused the highest disease suppression (24,98%).

Keywords: Disease incidence, Soilborne disease, Volatile compounds

ABSTRAK

Potensi Khamir Asal Rhizosfer Bawang Merah untuk Mengendalikan Busuk Pangkal (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*) pada Bawang Merah (*Allium cepa* L.)

Penyakit busuk pangkal yang disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* (FOC) merupakan penyakit utama pada bawang merah. Pengendalian ramah lingkungan untuk mengendalikan penyakit ini salah satunya dengan agens biokontrol. Khamir asal rhizosfer tanaman berpotensi sebagai agens biokontrol terhadap patogen tular tanah. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat khamir asal rhizosfer bawang merah yang berpotensi untuk mengendalikan penyakit busuk pangkal. Tahapan penelitian terdiri atas isolasi khamir dari daerah rhizosfer tanaman bawang merah dan isolasi FOC, pengujian potensi khamir dalam menekan FOC secara in vitro dan penyakit busuk pangkal pada tanaman bawang merah. Hasil isolasi diperoleh sebanyak 10 isolat khamir yang mana tujuh isolat di antaranya bersifat non-patogenik sehingga digunakan pada pengujian berikutnya. Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat khamir tersebut mampu menghambat pertumbuhan koloni FOC secara in vitro dengan persentase penghambatan sebesar 16,11% - 38,33% pada uji dual culture, dan 21,11% - 38,89% pada uji produksi senyawa volatil. Isolat khamir yang diuji dapat menekan penyakit busuk pangkal dengan persentase penghambatan sebesar 8,30% - 24,98%. Isolat Cm2 dan Cm3 menekan penyakit busuk pangkal dengan nilai tingkat penekanan penyakit tertinggi yaitu sebesar 24,98%.

Kata Kunci: Kejadian penyakit, Penyakit tular tanah, Senyawa volatil

PENDAHULUAN

Penyakit busuk pangkal atau moler merupakan penyakit yang banyak ditemukan pada tanaman bawang merah. Penyakit ini disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* (FOC). Gejala penyakit busuk pangkal ditandai dengan adanya daun yang meliuk dan mengering serta pertumbuhan yang lemah dan terlihat layu (Widodo *et al.*, 2008; Semangun, 2004). Penyakit busuk pangkal pada bawang merah dapat menurunkan tingkat produksi bawang merah mencapai 50% (Wiyatiningsih, 2009).

Pengendalian penyakit busuk pangkal yang umumnya dilakukan oleh petani adalah menggunakan fungisida. Akan tetapi, pengendalian menggunakan fungisida secara terus menerus dapat menyebabkan kerusakan pada lingkungan. Alternatif pengendalian

yang ramah lingkungan adalah dengan menggunakan mikroba sebagai agens biokontrol.

Khamir merupakan salah satu mikroba yang diketahui memiliki kemampuan sebagai agens biokontrol penyakit tanaman. Beberapa khamir telah dilaporkan memiliki kemampuan sebagai agens biokontrol terhadap patogen serta dapat menekan penyakit pada tanaman (Fitriati *et al.*, 2013; Intan dkk., 2014). Mekanisme khamir dalam mengendalikan patogen tanaman terdiri atas kompetisi ruang dan nutrisi, antibiosis, sekresi enzim pendegradasi dinding sel, mikoparasitisme serta induksi resistensi tanaman (El-Tarabily & Sivasithamparan, 2006).

Khamir dapat berasal dari permukaan daun dan buah, daerah sekitar perakaran (*rhizosphere*), serta di

dalam jaringan tanaman (Istifadah *et al.*, 2018; Puspitasari *et al.*, 2014; Kamel *et al.*, 2016; Glushakova & Chernov, 2009; Isaeva *et al.*, 2010). Khamir yang berasal dari rhizosfer tanaman memiliki kemampuan dalam menekan penyakit yang disebabkan oleh patogen tular tanah (El-Tarabily & Sivasithamparan, 2006). El-Tarabily (2004) melaporkan bahwa khamir yang berasal dari rhizosfer tanaman bit dapat menurunkan kejadian penyakit *damping off* yang disebabkan oleh *Rhizoctonia solani* pada tanaman bit. Khamir yang berasal dari rhizosfer tanaman kacang merah juga diketahui dapat menekan penyakit layu pada tanaman kacang merah yang disebabkan oleh *F. oxysporum* (El-Mehalawy, 2004). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh khamir asal rhizosfer yang memiliki potensi menghambat pertumbuhan FOC secara *in vitro* dan menekan penyakit busuk pangkal pada tanaman bawang merah.

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Proteksi Tanaman, Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran dan lahan percobaan Kecamatan Margahayu, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Percobaan dilaksanakan pada bulan Februari hingga September 2021.

Isolasi Khamir

Khamir diisolasi dari daerah rhizosfer tanaman bawang merah sehat yang diperoleh dari Desa Cimenyan, Kecamatan Cimenyan, dan Desa Tribaktimulya, Kecamatan Pangalengan, Kabupaten Bandung. Isolasi khamir dilakukan dengan cara memasukan 10 g tanah ke dalam 90 ml akuades steril dan dicampurkan menggunakan *rotary shaker* selama 30 menit dengan kecepatan 120 rpm, selanjutnya didiamkan selama 10 menit untuk mengendapkan tanah. Suspensi yang diperoleh kemudian dibuat seri pengenceran hingga 10^{-5} . Sebanyak 100 μ l suspensi dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} disebar pada permukaan media *Yeast Malt Agar* (YMA) secara *spread plate* menggunakan batang L dan diinkubasi selama 5 hari (Lasmini, 2016). Koloni-koloni khamir yang tumbuh kemudian dimurnikan pada media YMA baru dengan cara digoreskan. Karakteristik koloni khamir yang diperoleh diamati berdasarkan *The Yeast: A Taxonomic Study* (Kurtzman *et al.*, 2011).

Uji Patogenisitas Khamir

Uji patogenisitas khamir pada biji bawang merah dilakukan dengan cara meletakkan biji di atas biakan khamir berumur 5 hari pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Maknurah & Sinaga, 2018). Biji yang akan digunakan terlebih dahulu didesinfeksi menggunakan alkohol 70% selama 1 menit, NaOCl 1% selama 1 menit dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Biji yang telah diletakkan di atas biakan khamir kemudian diinkubasi selama 14 hari (Fadhilah *et al.*, 2014). Khamir bersifat non patogenik apabila tidak menimbulkan gejala nekrosis dan pertumbuhan abnormal pada bibit.

Uji patogenisitas khamir pada umbi bawang merah dilakukan dengan cara melakukan inokulasi suspensi khamir (kepadatan 10^7 sel/ml) ke dalam umbi yang telah dilukai menggunakan jarum steril sebanyak 15 μ l (Vargas *et al.*, 2012). Umbi yang akan digunakan terlebih dahulu didesinfeksi menggunakan alkohol 70% selama 1 menit, NaOCl 1% selama 1 menit dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Umbi yang telah diberi perlakuan kemudian disimpan dalam kotak plastik tertutup dan diinkubasi selama 14 hari (Schwartz & Otto, 2000).

Isolasi FOC

Bagian tanaman bawang merah yang menunjukkan gejala busuk pangkal dipotong sebesar 1 - 2 cm. Potongan tersebut selanjutnya didesinfeksi dengan cara dicelupkan ke dalam NaOCl 1% selama 1 menit kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Potongan tersebut diletakkan pada media PDA dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang (Ramadhina *et al.*, 2013). Jamur yang tumbuh kemudian dimurnikan pada media PDA baru (Nugroho *et al.*, 2011). Identifikasi jamur *F. oxysporum* dilakukan melalui pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil pengamatan dibandingkan dengan buku *The Fusarium Laboratory Manual* (Leslie & Summerell, 2006).

Uji Patogenisitas FOC

Uji patogenisitas pada biji bawang merah dilakukan dengan cara meletakkan biji bawang merah di atas biakan FOC yang berumur 7 hari dan kemudian diinkubasi selama 14 hari. Biji yang digunakan sebelumnya didesinfeksi dengan mencelupkan dalam alkohol 70% selama 1 menit, NaOCl 1% selama 1 menit dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Isolasi dikategorikan sebagai jamur patogen apabila tidak terdapat benih yang tumbuh pada perlakuan FOC (Fadhilah *et al.*, 2014).

Uji patogenisitas pada umbi bawang merah dilakukan dengan cara menempelkan isolat FOC pada bagian *basal plate* umbi benih yang telah dibelah. Umbi yang akan digunakan sebelumnya didesinfeksi dengan mencelupkan dalam alkohol 70% selama 1 menit, NaOCl 1% selama 1 menit dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Umbi yang telah ditempel isolat FOC kemudian diletakkan pada dua lembar kertas saring di dalam cawan petri, kemudian diinkubasi selama 7 hari. Isolasi dikategorikan sebagai jamur patogenik apabila menyebabkan nekrosis pada *basal plate* umbi (Fadhilah *et al.*, 2014).

Perbanyakan FOC

Perbanyakan FOC dilakukan menggunakan media beras. Media tumbuh FOC dibuat dengan merendam beras selama 12 jam kemudian dicuci dan dikeringanginkan. Sebanyak 300 g beras dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan

tekanan 1 atm (Fitriani *et al.*, 2019). Sebanyak lima potongan biakan FOC dengan ukuran $\pm 0,5$ cm umur 7 hari dinokulasikan pada media tumbuh beras lalu diinkubasi selama 14 hari (Panjaitan *et al.*, 2019).

Uji Potensi Khamir dalam Menekan FOC secara *In Vitro*

Pengujian potensi khamir dalam menekan FOC (uji antagonisme) secara *in vitro* dilakukan melalui uji *dual culture* dan uji produksi senyawa volatil. Isolat yang diuji pada percobaan *in vitro* adalah isolat khamir non patogenik yang diperoleh dari uji patogenisitas. Percobaan *in vitro* dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap.

Uji Antagonisme Khamir dengan *Dual Culture*

Uji antagonisme khamir dilakukan dengan perlakuan isolat khamir non patogenik, fungisida benomil sebagai pembanding, dan kontrol. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak empat ulangan.

Uji antagonisme dengan *dual culture* dilakukan dengan menggoreskan isolat khamir tegak lurus sepanjang 3 cm pada permukaan media PDA dalam cawan petri berdiameter 9 cm dengan jarak ± 3 cm

dari tepi cawan petri. Selanjutnya, potongan biakan FOC berdiameter 0,5 cm diletakkan pada permukaan media PDA dalam cawan petri yang sama bersebelahan dengan isolat khamir dengan jarak ± 3 cm dari tepi cawan petri. Pada perlakuan kontrol, potongan biakan FOC diletakkan pada permukaan media PDA dengan jarak ± 3 cm dari tepi cawan petri tanpa isolat khamir. Perlakuan fungisida diberikan dengan mencampurkan fungisida benomil dengan konsentrasi 0,2 g/100 ml PDA. Potongan biakan FOC diletakkan pada permukaan media PDA yang telah dicampur dengan fungisida dengan jarak ± 3 cm dari tepi cawan petri. Biakan uji selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang hingga koloni FOC pada perlakuan kontrol memenuhi cawan petri (Adhi & Suganda, 2020).

Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter koloni FOC pada semua perlakuan hingga koloni FOC pada kontrol telah memenuhi cawan petri. Hasil pengamatan tersebut digunakan untuk menghitung tingkat hambatan relatif pertumbuhan FOC oleh isolat khamir dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Tingkat hambatan relatif} = \frac{\text{diameter kontrol} - \text{diameter perlakuan}}{\text{diameter kontrol}} \times 100\%$$

Hasil uji antagonisme dengan *dual culture* juga diamati secara mikroskopis untuk melihat interaksi antara FOC dengan khamir. Pengamatan tersebut dilakukan dengan cara memotong koloni FOC yang tumbuh bersebelahan dengan isolat khamir. Potongan tersebut diletakkan pada *objek glass* selanjutnya diamati menggunakan mikroskop cahaya.

Uji Antagonisme Khamir melalui Produksi Senyawa Volatil

Uji antagonisme khamir melalui produksi senyawa volatil dilakukan dengan perlakuan isolat khamir non patogenik dan kontrol. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak empat ulangan. Uji kemampuan untuk menghasilkan senyawa volatil dilakukan dengan menggoreskan isolat khamir secara tegak lurus pada media PDA dalam cawan petri sepanjang 3 cm, sedangkan potongan koloni FOC dengan diameter 0,5 cm diletakkan di atas media PDA pada cawan petri yang berbeda. Cawan petri yang telah berisi potongan koloni FOC selanjutnya diletakkan di atas cawan petri yang telah digoreskan isolat khamir.

Kedua cawan petri tersebut kemudian direkatkan menggunakan *cling wrap* (Maknunah & Sinaga, 2018). Pada perlakuan kontrol, cawan petri yang telah berisi potongan koloni FOC diletakkan di atas cawan petri berisi media PDA tanpa khamir. Pengamatan dilakukan seperti pada uji antagonisme khamir dengan metode *dual culture*. Pengamatan secara mikroskopis untuk melihat pengaruh senyawa volatil khamir terhadap FOC dilakukan dengan cara

memotong koloni FOC selanjutnya diletakkan pada *object glass* dan diamati menggunakan mikroskop cahaya.

Uji Penekanan Penyakit Busuk Pangkal

Uji penekanan penyakit busuk pangkal oleh isolat khamir dilakukan pada tanaman bawang merah di lahan percobaan. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan delapan perlakuan dan empat ulangan, setiap ulangan terdiri atas tiga tanaman bawang merah. Perlakuan yang diuji adalah sebagai berikut:

- A. Kontrol (+) (tanpa isolat khamir + FOC)
- B. Kontrol (-) (tanpa isolat khamir + tanpa FOC)
- C. Fungisida benomil + FOC
- D. Isolat khamir Cm1 + FOC
- E. Isolat khamir Cm2 + FOC
- F. Isolat khamir Cm3 + FOC
- G. Isolat khamir Tb2 + FOC
- H. Isolat khamir Tb4 + FOC

Inokulasi FOC dilakukan saat penanaman dengan cara mencampurkan inokulum FOC dalam media beras berumur 14 hari dengan tanah sebanyak 5 g/lubang tanam (Prabowo *et al.*, 2020). Perlakuan khamir dilakukan 7 hari setelah penanaman dengan cara menyiramkan suspensi khamir pada tanah di sekitar perakaran dengan kerapatan 10^7 sel/ml. Suspensi khamir yang diberikan sebanyak 25 ml/tanaman (Hotim *et al.*, 2020). Perlakuan fungisida diberikan 7 hari setelah penanaman dengan cara

menyiramkan larutan fungisida dengan konsentrasi 0,2 g/100 ml air sebanyak 25 ml/tanaman.

Pengamatan terhadap penekanan penyakit busuk pangkal oleh khamir dilakukan terhadap parameter masa inkubasi dan kejadian penyakit. Pengamatan masa inkubasi dilakukan dengan cara

mengamati saat pertama kali munculnya gejala penyakit busuk pangkal pada tanaman bawang merah. Pengamatan kejadian penyakit dilakukan tiga hari sekali sejak 3 hari setelah perlakuan (HSP) hingga 36 HSP.

Persentase kejadian penyakit dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kejadian penyakit} = \frac{\text{jumlah tanaman bergejala busuk pangkal dalam satu ulangan}}{\text{jumlah tanaman dalam satu ulangan}} \times 100\%$$

Persentase tingkat hambatan relatif penyakit busuk pangkal pada tanaman bawang merah oleh isolat khamir dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Tingkat hambatan relatif} = \frac{\% \text{ kejadian penyakit kontrol}(+) - \% \text{ kejadian penyakit perlakuan}}{\% \text{ kejadian penyakit pada kontrol}(+)} \times 100\%$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) dengan program software SPSS Versi 26. Data ditransformasi menggunakan arcsin sebelum dianalisis. Analisis dilanjutkan dengan uji lanjut menggunakan uji Jarak Berganda Duncan (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf nyata 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi dan Uji Patogenisitas Khamir

Isolasi khamir asal rhizosfer bawang merah menghasilkan enam isolat khamir yang berasal dari Desa Cimenyan dan empat isolat khamir yang berasal dari Desa Tribaktimulya. Isolat khamir yang diperoleh dikarakterisasi berdasarkan karakteristik makroskopis dan mikroskopis (Tabel 1). Karakteristik khamir yang diperoleh didominasi dengan warna koloni krem dan

bentuk sel oval dengan ukuran sel berkisar 1,191-11,174×1,257-5,643 µm (Tabel 1).

Hasil uji patogenisitas khamir asal rhizosfer bawang merah terhadap FOC menunjukkan bahwa seluruh isolat khamir yang diuji tidak bersifat patogenik terhadap umbi bawang merah, namun tiga isolat khamir menghambat perkecambahan benih bawang merah. Isolat khamir yang bersifat patogenik tersebut adalah Cm4, Cm5 dan Tb1. Perlakuan isolat Cm4 menyebabkan terjadinya kerutan pada bagian kecambah yang mengenai filamen isolat khamir, sedangkan isolat Cm5 dan Tb1 menyebabkan bagian tanaman yang mengenai isolat menjadi melunak/membusuk. Ketiga isolat tersebut juga menyebabkan kecambah berwarna pucat, pertumbuhan lambat serta beberapa kecambah tidak mengalami pertambahan panjang hingga 14 HSP (Tabel 2).

Tabel 1. Karakteristik isolat-isolat khamir asal rhizosfer bawang merah

Isolat	Bentuk sel	Ukuran sel (µm)	Karakteristik koloni
Cm1	Oval	2,438-4,157×1,257-4,157	Berwarna krem dengan permukaan yang halus dan kusam, memiliki tepi <i>filamentous</i> dan elevasi <i>convex</i> .
Cm2	Oval-silinder	1,495-11,174×1,995-4,635	Berwarna krem kekuningan dengan permukaan yang memiliki puncak meruncing, memiliki tepi yang bergerigi dan elevasi <i>umbonate</i> .
Cm3	Bulat-oval	1,191-4,209×1,651-4,443	Berwarna krem dengan permukaan yang halus mengkilap, memiliki tepi <i>filamentous</i> dan elevasi <i>convex</i> .
Cm4	Bulat-oval	4,343-5,376×3,510-5,604	Berwarna krem dengan permukaan yang memiliki puncak meruncing, memiliki tepi <i>filamentous</i> dan elevasi <i>umbonate</i> .
Cm5	Oval	2,404-4,286×1,495-3,400	Berwarna krem dengan permukaan yang halus dan kusam, memiliki tepi <i>filamentous</i> dan elevasi <i>convex</i> .
Cm6	Oval-silinder	1,868-5,511×1,778-5,643	Berwarna krem kekuningan dengan permukaan yang halus dan mengkilap, memiliki tepi <i>filamentous</i> dan elevasi <i>convex</i> .
Tb1	Bulat-oval	2,101-4,953×1,634-5,142	Berwarna krem dengan permukaan yang halus mengkilap, memiliki tepi <i>filamentous</i> dan elevasi <i>convex</i> .
Tb2	Oval-silinder	1,495-2,335×1,824-4,599	Berwarna krem kekuningan dengan permukaan yang halus dan mengkilap, memiliki tepi yang rata dan elevasi <i>convex</i> .
Tb3	Oval	2,381-4,078×1,362-3,035	Berwarna oranye kemerahan dengan permukaan yang halus dan mengkilap, memiliki tepi yang rata dan elevasi <i>convex</i> .
Tb4	Bulat	1,634-2,802×1,420-1,824	Berwarna krem dengan permukaan yang halus dan mengkilap, memiliki tepi yang bergerigi dan elevasi <i>convex</i> .

Khamir yang bersifat patogenik terhadap tanaman diduga dapat disebabkan oleh adanya endopolygalacturonase yang dihasilkan oleh sel khamir yang mampu mendegradasi polisakarida pada dinding sel tanaman. Selain itu, beberapa khamir yang membentuk filamen diketahui dapat bersifat patogenik terhadap tanaman (Gognies *et al.*, 2001). Khamir *Saccharomyces cerevisiae* strain SCPP dan *Kloeckera apiculata* dapat membentuk filamen serta menghasilkan endopolygalacturonase yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan plantlets tanaman anggur serta menyebabkan terjadinya nekrosis pada daun (Gognies *et al.*, 2001). Filamen khamir dapat bersifat patogenik apabila dapat melakukan penetrasi ke dalam jaringan tanaman serta menghasilkan enzim yang dapat mendegradasi polisakarida di dalam jaringan tanaman (Gognies *et al.*, 2001).

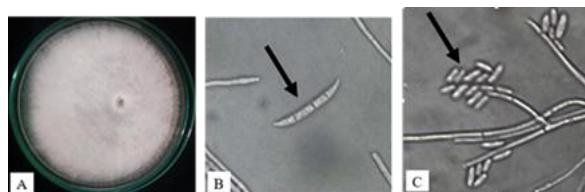
Tabel 2. Panjang kecambah bawang merah dengan perlakuan isolat khamir asal rhizosfer bawang merah pada 14 hari setelah perlakuan.

Perlakuan	Rata-rata panjang kecambah (cm)
Kontrol	5,55 ± 0,58 bcd
Cm1	5,46 ± 1,28 bcd
Cm2	4,31 ± 1,10 b
Cm3	5,93 ± 1,04 cd
Cm4	0,57 ± 0,12 a
Cm5	0,44 ± 0,25 a
Cm6	6,15 ± 0,71 d
Tb1	0,48 ± 0,37 a
Tb2	4,05 ± 0,27 b
Tb3	6,97 ± 1,55 d
Tb4	4,51 ± 0,70 bc

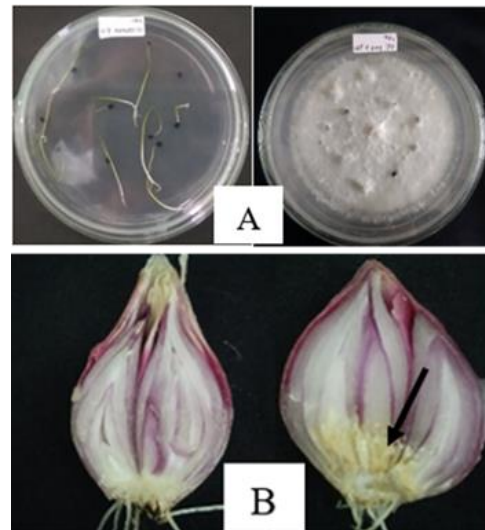
Keterangan : Huruf yang sama pada satu kolom dalam tabel menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Lanjut Duncan pada taraf 5%, ($\bar{x} \pm SD$) (rata-rata ± standar deviasi).

Hasil Isolasi dan Uji Patogenisitas FOC

Hasil pengamatan secara mikroskopis terhadap isolat FOC yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat memiliki mikrokonidia dan makrokonidia. Mikrokonidia FOC berbentuk oval serta tidak memiliki septa, sedangkan makrokonidia berbentuk seperti bulan sabit dan memiliki 3 septa (Gambar 1). Uji patogenisitas yang dilakukan pada FOC terhadap biji dan umbi bawang merah menunjukan bahwa jamur FOC bersifat patogenik terhadap umbi dan biji bawang merah. Jamur FOC menyebabkan terjadinya pembusukan serta nekrosis pada umbi bawang merah pada 7 hari setelah perlakuan serta menyebabkan tidak berkecambahnya biji bawang merah (Gambar 2).



Gambar 1. Karakteristik FOC (A) Koloni, (B) Makrokonidia, (C) Mikrokonidia (perbesaran 400x).



Gambar 2. Pengaruh FOC terhadap perkecambahan benih dan umbi bawang merah (A) Biji bawang merah (kiri kontrol, kanan FOC) pada 21 hari setelah perlakuan, (B) Umbi bawang merah (kiri kontrol, kanan FOC) pada 7 hari setelah perlakuan.

Pengaruh Isolat Khamir Asal Rhizosfer Bawang Merah terhadap Pertumbuhan FOC

Berdasarkan hasil analisis statistik diketahui bahwa isolat khamir asal rhizosfer bawang merah memberikan pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan koloni FOC dan tingkat penghambatannya. Perlakuan isolat khamir tersebut dapat menghambat pertumbuhan koloni FOC dengan persentase penghambatan berkisar antara 16,11% - 38,33% (Tabel 3).

Berdasarkan pengamatan secara mikroskopis, perlakuan khamir menyebabkan terjadinya abnormalitas hifa, lisis, serta terbentuknya klamidospora FOC (Gambar 3). Lisis dan abnormalitas pada hifa FOC dapat terjadi karena sel khamir yang menempel pada permukaan hifa menyebabkan terjadinya mikrolisis akibat sintesis enzim seperti kitinase dan glukonase maupun *killer toxin* yang dihasilkan oleh sel khamir (Janisiewicz & Korsten, 2002). Penempelan sel mikroba pada permukaan hifa merupakan faktor yang mendukung terjadinya kompetisi nutrisi, lisis pada hifa serta abnormalitas hifa (Chaurasia *et al.*, 2005).

Klamidospora pada FOC yang diberi perlakuan khamir menandakan bahwa khamir menciptakan kondisi lingkungan yang tidak sesuai bagi pertumbuhan FOC. Khamir diketahui memiliki kemampuan untuk menghasilkan antifungi yang dapat menghambat pertumbuhan patogen. Senyawa antifungi seperti 4-methyl-7,11- heptadecadienal dan 4-methyl-7,11-heptadecadienoic acid yang dihasilkan oleh khamir diketahui bersifat sebagai antifungi dan antibakteri (Choudhury & Traquair, 1994).

Pengaruh Isolat Khamir Asal Rhizosfer Bawang Merah terhadap Pembentukan Senyawa Volatil

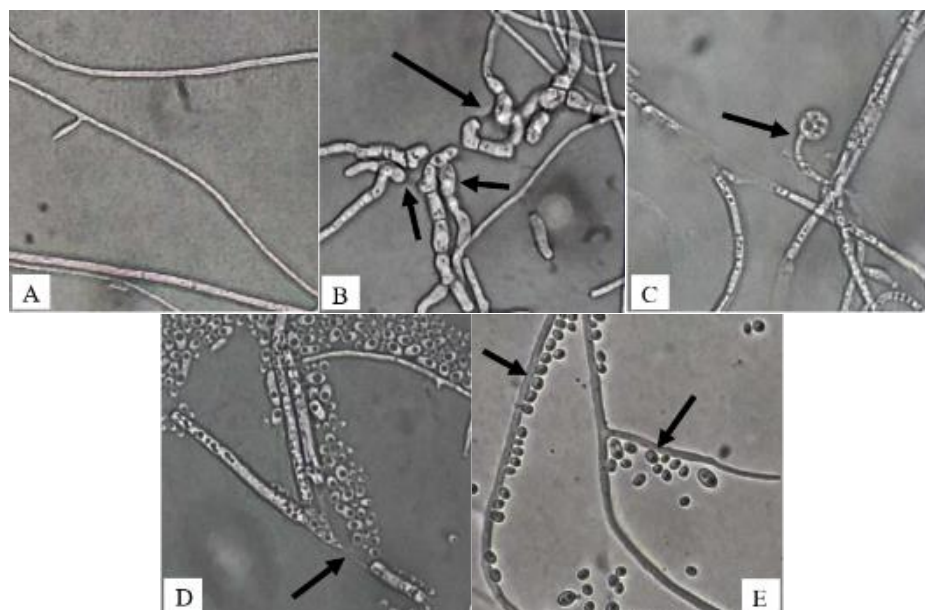
Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat khamir yang diuji dapat menghasilkan senyawa volatil yang mampu menghambat pertumbuhan koloni FOC.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan khamir memberikan pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan koloni FOC dan tingkat penghambatan pertumbuhan koloni FOC (Tabel 4).

Tabel 3. Pengaruh perlakuan isolat khamir asal rhizosfer bawang merah terhadap pertumbuhan koloni FOC pada uji *dual culture* pada 9 hari setelah perlakuan

Perlakuan	Diameter koloni FOC (cm) ($\bar{x} \pm SD$)	THR (%) ($\bar{x} \pm SD$)
Kontrol	9,00 $\pm$ 0,00 d	0,00 $\pm$ 0,00 a
Benomil	0,50 $\pm$ 0,00 a	94,44 $\pm$ 0,00 d
Cm1	5,95 $\pm$ 0,30 b	33,89 $\pm$ 3,33 c
Cm2	5,73 $\pm$ 0,09 b	36,30 $\pm$ 1,06 c
Cm3	6,03 $\pm$ 0,29 b	33,06 $\pm$ 3,20 c
Cm6	6,13 $\pm$ 0,55 b	31,94 $\pm$ 6,11 c
Tb2	5,85 $\pm$ 0,50 b	35,00 $\pm$ 5,56 c
Tb3	7,55 $\pm$ 0,97 c	16,11 $\pm$ 10,57 b
Tb4	5,55 $\pm$ 0,06 b	38,33 $\pm$ 0,64 c

Keterangan : Huruf yang sama pada satu kolom dalam tabel menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Lanjut Duncan pada taraf 5%, THR (Tingkat Hambatan Relatif), ($\bar{x} \pm SD$) (rata-rata $\pm$ standar deviasi)



Gambar 3. Pengaruh khamir asal rhizosfer bawang merah terhadap hifa FOC (A) Hifa normal (B) Hifa membengkak (C) Terbentuk klamidospora (D) Hifa lisis (E) Sel khamir menempel pada hifa (perbesaran 400x).

Tabel 4. Pengaruh perlakuan isolat khamir asal rhizosfer bawang merah terhadap pertumbuhan koloni FOC melalui produksi senyawa volatil pada 7 hari setelah perlakuan

Perlakuan	Diameter koloni FOC (cm) ($\bar{x} \pm SD$)	THR (%) ($\bar{x} \pm SD$)
Kontrol	9,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 a
Cm1	5,50 $\pm$ 0,28 a	38,89 $\pm$ 3,14 c
Cm2	6,28 $\pm$ 0,92 bc	30,28 $\pm$ 10,24 bc
Cm3	6,68 $\pm$ 0,42 c	25,83 $\pm$ 4,66 b
Cm6	7,10 $\pm$ 0,34 c	21,11 $\pm$ 3,74 b
Tb2	6,28 $\pm$ 1,48 bc	30,28 $\pm$ 16,42 bc
Tb3	6,80 $\pm$ 0,50 c	24,44 $\pm$ 5,52 b
Tb4	6,38 $\pm$ 0,75 bc	29,17 $\pm$ 8,28 bc

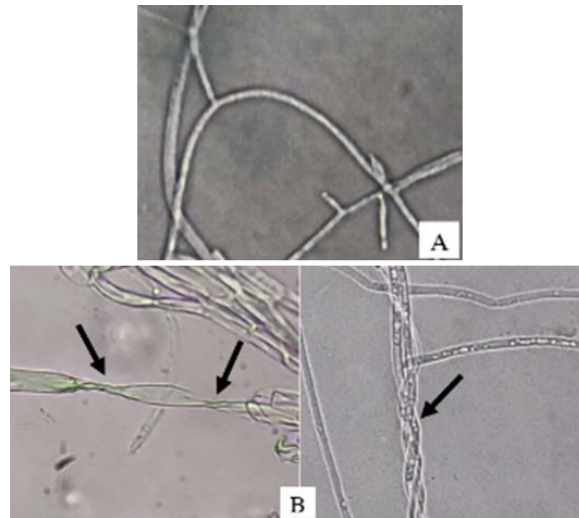
Keterangan : Huruf yang sama pada satu kolom dalam tabel menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Lanjut Duncan pada taraf 5%, THR (Tingkat Hambatan Relatif), ($\bar{x} \pm SD$) (rata-rata $\pm$ standar deviasi)

Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan bahwa perlakuan khamir menyebabkan terjadinya abnormalitas hifa FOC yaitu pelilitan hifa FOC

(Gambar 4). Abnormalitas hifa FOC disebabkan oleh senyawa volatil yang mengakibatkan terjadinya kerusakan pada struktur hifa. Senyawa volatil yang

dihasilkan oleh khamir dapat tersusun atas *hydrocarbons*, *heterocycles*, *aldehydes*, *ketones*, *alcohols*, *phenols*, *thioalcohols*, *thioesters* dan turunannya, turunan dari *benzene* serta *cyclohexanes* (Korpi *et al.*, 2009). Senyawa volatil yang dihasilkan

oleh khamir seperti 3- methyl-1-butanol dan 2-methyl-1-butanol dapat menyebabkan peroksidasi lipid pada sel patogen yang mengakibatkan terjadinya kerusakan pada membran plasma (Rezende *et al.*, 2015).



Gambar 4. Pengaruh senyawa volati khamir asal rhizosfer bawang merah terhadap hifa FOC pada 11 HSP (A) Hifa normal (B) Hifa terpelintir dan melilit (perbesaran 400x)

Pengaruh Isolat Khamir Asal Rhizosfer Bawang Merah terhadap Penekanan Penyakit Busuk Pangkal

Gejala penyakit busuk pangkal oleh FOC pada tanaman bawang merah ditunjukkan dengan adanya daun yang layu dan daun yang terpilin (moler) (Gambar 5). Wiyatiningsih (2009) menyebutkan

bahwa salah satu gejala terjadinya busuk pangkal bawang merah adalah daun yang menguning dari bagian ujungnya disertai terjadinya layu. Berdasarkan hasil pengujian diketahui bahwa isolat-isolat khamir asal rhizosfer tanaman bawang merah mampu menurunkan gejala moler pada tanaman bawang merah yang disebabkan oleh FOC (Gambar 5).



Gambar 5. Pengaruh perlakuan isolat khamir asal rhizosfer bawang merah terhadap penyakit busuk pangkal bawang merah pada 36 hari setelah perlakuan (A) Kontrol + (B) Kontrol – (C) Benomil (D) Isolat Cm1 (E) Isolat Cm2 (F) Isolat Cm3 (G) Isolat Tb2 (H) Isolat Tb4

Hasil analisis statistik terhadap uji penekanan penyakit busuk pangkal bawang merah menunjukkan bahwa perlakuan khamir memberikan pengaruh yang

nyata terhadap masa inkubasi, persentase kejadian penyakit dan persentase tingkat penghambatan

penyakit busuk pangkal pada bawang merah (Tabel 5).

Apabila dibandingkan dengan kontrol, perlakuan khamir mampu memperlambat kemunculan gejala penyakit busuk pangkal pada tanaman bawang merah. Masa inkubasi terlama terjadi pada perlakuan Tb2 yaitu 27,50 HSP. Isolat khamir Cm2 dan Cm3 dapat menekan kejadian penyakit tanaman dengan persentase tingkat penghambatan tertinggi sebesar 24,98%. Tingkat penekanan penyakit busuk pangkal pada bawang merah oleh isolat khamir tersebut

tergolong rendah. Rendahnya tingkat penekanan penyakit oleh isolat khamir dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti temperatur, pH, dan stres oksidatif. Temperatur yang tinggi, pH rendah serta stres oksidatif dapat menurunkan viabilitas serta tingkat efikasi khamir (Liu *et al.*, 2011). Rendahnya tingkat penekanan penyakit oleh isolat khamir uji juga diduga karena aplikasi khamir dilakukan setelah inokulasi patogen, sehingga diduga patogen sudah menginfeksi atau *established* dalam media tanam dibandingkan khamir.

Tabel 5. Pengaruh perlakuan isolat khamir asal rhizosfer bawang merah terhadap kejadian penyakit busuk pangkal pada bawang merah pada 36 hari setelah perlakuan

Perlakuan	Masa inkubasi (hari) ($\bar{x} \pm SD$)	Kejadian penyakit (%) ($\bar{x} \pm SD$)	THR (%) ($\bar{x} \pm SD$)
Kontrol	19,50 $\pm$ 1,00 a	100,00 $\pm$ 0,00 d	0,00 $\pm$ 0,00 a
Benomil	25,75 $\pm$ 4,50 ab	58,34 $\pm$ 16,67 a	41,67 $\pm$ 16,67 c
Cm1	24,00 $\pm$ 5,83 ab	83,34 $\pm$ 19,24 bcd	16,67 $\pm$ 19,24 abc
Cm2	25,25 $\pm$ 4,50 ab	75,00 $\pm$ 16,67 abc	24,98 $\pm$ 16,67 bc
Cm3	27,25 $\pm$ 4,27 b	75,00 $\pm$ 16,67 abc	24,98 $\pm$ 16,67 bc
Tb2	27,50 $\pm$ 3,70 b	91,68 $\pm$ 16,67 cd	8,30 $\pm$ 16,67 ab
Tb4	25,25 $\pm$ 6,13 ab	83,34 $\pm$ 19,25 bcd	16,67 $\pm$ 19,24 abc

Keterangan : Huruf yang sama pada satu kolom dalam tabel menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Lanjut Duncan pada taraf 5%. Kontrol + (tanpa khamir + FOC), kontrol – (tanpa khamir + tanpa FOC), THR (Tingkat Hambatan Relatif), ($\bar{x} \pm SD$) (rata-rata $\pm$ standar deviasi)

Isolat-isolat khamir asal rhizosfer tanaman bawang merah dapat menurunkan tingkat kejadian penyakit busuk pangkal pada bawang merah disebabkan oleh kemampuan khamir melakukan kolonisasi terhadap perakaran tanaman. El-Tarabily (2004) menyebutkan bahwa kemampuan khamir dalam menekan kejadian penyakit tanaman pada awalnya berkaitan dengan kemampuan khamir tersebut untuk melakukan kolonisasi pada perakaran tanaman.

Kolonisasi khamir pada akar akan menyebabkan terjadinya kompetisi nutrisi dan ruang antara khamir dengan patogen sehingga pertumbuhan patogen menjadi terhambat. Setelah terjadinya kompetisi nutrisi dan ruang, khamir akan mengaktifkan mekanisme antagonisme lain seperti menempel pada dinding sel patogen, menghasilkan enzim pendegradasi dinding sel dan *killer toxin*, serta menggunakan zat besi yang dibutuhkan oleh pertumbuhan patogen (Zhang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2013).

Tingkat penghambatan penyakit busuk pangkal pada bawang merah oleh isolat khamir lebih rendah apabila dibandingkan dengan penekanan oleh fungisida benomil (41,67%). Akan tetapi, terdapat satu isolat khamir yang menunjukkan tingkat penghambatan yang konsisten baik pada uji *in vitro* maupun *in vivo* yaitu isolat Cm2. Meskipun secara umum tingkat penghambatan oleh isolat Cm2 tersebut relatif rendah, namun isolat tersebut perlu diuji lanjut dengan metode lain terutama dalam waktu aplikasi pada saat pengujian. Pengujian dapat dilakukan

dengan mengaplikasikan isolat Cm2 terlebih dahulu sebelum inokulasi patogen, sehingga diharapkan isolat khamir tersebut dapat *established* dalam media tanam yang digunakan sebelum adanya patogen. Hal ini mengingat bahwa aplikasi agens biokontrol akan lebih baik bila dibandingkan dengan aplikasi fungisida dalam jangka panjang. Agens biokontrol memiliki kemampuan untuk mempertahankan diri dalam waktu yang lama (He *et al.*, 2021) dan ramah lingkungan.

KESIMPULAN

Diperoleh sebanyak tujuh isolat khamir asal rhizosfer tanaman bawang merah non-patogenik yaitu isolat Cm1, Cm2, Cm3, Cm6, Tb2, Tb3, dan Tb4. Tujuh isolat khamir tersebut mampu menghambat pertumbuhan koloni FOC secara *in vitro* dengan persentase penghambatan sebesar 16,11% - 38,33% pada uji *dual culture*, dan 21,11% - 38,89% pada uji produksi senyawa volatil. Khamir tersebut juga mampu menekan kejadian penyakit busuk pangkal dengan persentase penghambatan sebesar 8,30% - 24,98%. Isolat Cm2 dan Cm3 merupakan isolat khamir yang menyebabkan penekanan penyakit tertinggi yaitu sebesar 24,98%.

DAFTAR PUSTAKA

Adhi SR, & Suganda T. 2020. Potensi jamur rizosfer bawang merah dalam menekan *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, penyebab penyakit busuk umbi bawang merah. Jurnal Kultivasi. 19: 1015-1022.

- Chaurasia B, Pandey A, Palni LM, Trivedi P, Kumar B, & Colvin N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiol. Res.* 160: 75-81.
- Choudhury SR, & Traquair JA. 1994. 4-methyl-7,11-heptadecadienal and 4-methyl-7,11-heptadecadienoic acid: New antibiotics from *Sporothrix flocculosa* and *Sporothrix rugulosa*. *J. Nat. Prod.* 57: 700-704.
- El-Mehalawy AA. 2004. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*. *Int. J. of Agric. Biol.* 6: 310-316.
- El-Tarabily KA. 2004. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *J. Appl. Microbio.* 96: 69-75.
- El-Tarabily KA, & Sivasithamparan, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience.* 47: 25-35.
- Fadhilah S, Wiyono S, & Surahman M. 2014. Pengembangan teknik deteksi fusarium patogen pada umbi benih bawang merah (*Allium ascalonicum*) di laboratorium. *J. Hortikultura.* 24: 171-178.
- Fitriati Y, Wiyono S, & Sumarauw IO. 2013. Khamir antagonis untuk pengendalian penyakit antraknosa pada buah avokad selama penyimpanan. *J. Fitopatol. Indones.* 9: 153-159.
- Fitriani ML, Wiyono S, & Sinaga MS. 2019. Potensi kolonisasi mikoriza arbuskular dan cendawan endofit untuk pengendalian layu fusarium pada bawang merah. *J. Fitopatol. Indones.* 15: 228-238.
- Glushakova AM, & Chernov I. 2009. Yeast communities dynamics in fruit of hedge rose (*Rosa canina* L.). *J. Mycol. Plant. Pathol.* 43: 193-199.
- Gognies S, Barka EA, Claisse AG, & Belarbi A. 2006. Interactions between yeast and grapevines: filamentous growth, endopolygalacturonase and phytopathogenicity of colonizing yeast. *Microb. Ecol.* 51(1): 109-116.
- Gognies S, Belarbi A, & Barka EA. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* a potential pathogen towards grapevine *Vitis vinifera*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37: 143-150.
- He DC, He MH, Amalin DM, Liu W, Alvindia DG, & Zhan J. 2021. Biological control of plant disease : An evolutionary and eco-economic consideration. *Pathogen.* 10(10): 1-15.
- Hotim S, & Rusmayadi G. 2020. Uji efektivitas *Pseudomonas fluorescens* dan khamir dalam menghambat penyakit busuk umbi serta memacu pertumbuhan tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum*). *EnviroScienteeae.* 16: 49-61.
- Intan RM, Cholil A, & Sulistyowati L. 2014. Potensi antagonis jamur endofit dan khamir pada tanaman pisang (*Musa accumunata*) terhadap jamur *Mycosphaerella musicola* penyebab penyakit bercak kuning sigatoka. *J. Hama dan Penyakit Tumbuh.* 2: 110-118.
- Isaeva OV, Glushakova AM, Garbuz SA, Kachalkin AV, & Chernov IY. 2010. Endophytic yeast fungi in plant storage tissues. *Biol. Bull.* 37: 26-34.
- Isniah US, & Widodo. 2015. Eksplorasi fusarium nonpatogen untuk pengendalian penyakit busuk pangkal pada bawang merah. *J. Fitopatol. Indones.* 11: 14-22.
- Istifadah N, Ihsani N, & Hartati S. 2018. The potential and aplication frequency of yeast from tomato and cogon grass leaves to suppress powdery mildew disease in tomato. *Jurnal Cropsaver.* 1: 104-110.
- Janisiewicz WJ, & Korsten L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 411-441.
- Kamel S, Morsy EM, & Massoud ON. 2016. Potentiality of some yeast species as biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* the causal agent of cucumber wilt. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 26: 185-193.
- Korpi A, Jarnberg J, & Pasanen AL. 2009. Microbial volatile organic compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 39: 139-193.
- Kurtzman C, Fell JW, & Boekhout T. 2011. *The Yeast : A Taxonomic Study.* Elsevier Science, Amsterdam. Pp. 90-96.
- Lasmini T. 2016. Isolasi dan identifikasi khamir penghasil asam indol asetat dari rhizosfer angrek tanah *Pecteilis susannae* (L.) Rafin. *Jurnal IPTEKS Terapan.* 9: 261-268.
- Leslie JF, & Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual.* Blackwell, Iowa. Pp. 212-218.
- Liu J, Sui Y, Wisniewski M, Droby S, & Liu Y. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Inter. J. Food Microbiol.* 157: 153-160.
- Liu J, Wisniewski M, Droby S, Droby S, Hershkovitz V, & Tworkoski T. 2011. Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Metschnikowia fructicola*. *FEMS Microb. Ecol.* 76(1): 145-155.
- Maknunah J, & Sinaga MS. 2018. Eksplorasi dan karakterisasi khamir dan bakteri sebagai agens antagonis terhadap penyebab penyakit blas pada padi. *J. Fitopatol. Indones.* 14: 83-88.
- Nugroho B, Astriani D, & Mildaryani W. 2011. Variasi virulensi isolat *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* pada beberapa varietas bawang merah. *Jurnal Agrin.* 15: 9-17.

- Panjaitan FJ, Wiyono S, & Widyastuti R. 2019. Seleksi komposisi medium pertumbuhan dan bahan pembawa untuk formulasi cendawan agens hayati *Fusarium oxysporum* non-patogenik P21a. J. Fitopatol. Indones. 15: 44-52.
- Prabowo YH, Widiyastuti F, & Istifadah N. 2020. Penekanan penyakit busuk pangkal (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*) pada bawang merah oleh beberapa jenis bahan organik. Jurnal Agrikultura. 31: 145-156.
- Puspitasari AE, Abadi AL, & Sulistyowati L. 2014. Potensi khamir sebagai agen pengendali hayati patogen *Colletotrichum* sp. pada buah cabai, buncis, dan stroberi. J. Hama dan Penyakit Tumbuh. 2: 92-101.
- Ramadhina A, Lisnawita, & Lubis L. 2013. Penggunaan jamur antagonis *Trichoderma* sp. dan *Gliocladium* sp. untuk mengendalikan penyakit layu fusarium pada tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum* L.). J. Agroteknologi (Online). 1: 702-710.
- Rezende DC, Fialho MB, Brand SC, Blumer S, & Pascholati SF. 2015. Antimicrobial activity of volatile organic compounds and their effect on lipid peroxidation and electrolyte loss in *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* mycelia. Afr. J. Microbiol. Res. 9: 1527-1535.
- Santoso SE, Soesanto L, & Haryanto TA. 2007. Penekanan hayati penyakit moler pada bawang merah dengan *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, dan *Pseudomonas fluorescens* P60. J. Trop. Plant. Pest. Dis. 7: 53-61.
- Schwartz HF, & Otto K. 2000. First report of a leaf blight and bulb decay of onion by *Pantoea ananitis* in Colorado. Disease notes. 84: 808.
- Semangun H. 2004. Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 850 hlm.
- Vargas M, Garrido F, Zapata N, & Tapia M. 2012. Isolation and selection of epiphytic yeast for biocontrol of *Botrytis cinerea* pers. on table grape. Chil. J. Agri. Res. 72: 332-336.
- Widodo KN, Kobayashi K, & Ogoshi A. 2008. Vegetative compatibility groups within *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* in Hokkaido-Japan. Microbiol. Indones. 2: 39-43.
- Wiyatiningsih S. 2009. Etiologi Penyakit Moler pada Bawang Merah. UPN University Press, Surabaya. 48 hlm.
- Zhang X, Li B, Zhang Z, Chen Y, & Tian S. 2020. Antagonistic yeasts: A promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. J. Fungi. 6: 1-15.

