

---

# APLIKASI POLYMERASE CHAIN REACTION-RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER ANALYSIS (PCR-RISA) UNTUK MENENTUKAN KERAGAMAN MIKROBA TANAH PADA HABITAT TANAMAN PISANG DENGAN DAN TANPA GEJALA LAYU *FUSARIUM*

I Made Sudarma\*, Dewa Ngurah Suprpta, I Made Sudana dan I Gede Rai Maya Temaja

\*Staf dosen Jurusan Agroiekoteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Udayana

\*E-mail. sudarma\_made60@yahoo.com

## Abstract

A major problem in the soil microbiology is 99% soil microbes could not be grown in artificial media; therefore, to describe the true diversity of microbes in the soil must use a molecular approach. The approach was polymerase chain reaction-ribosomal intergenic spacer analysis (PCR-RISA). This method can be used for determining soil microbial DNA profile (the number of DNA bands). The soil samples were collected from three regencies in Bali, *i.e.* Karangasem, Klungkung and Jembrana which are the main banana growing area in Bali. Soil sampling was done in two sites in each regency representing the banana habitat with and without *Fusarium* wilt symptom, by collecting 100 grams of soil surrounding the banana plant at the depth of 20 cm. The result of PCR-RISA showed that DNA profile of the soil microbes in the soil of banana habitat without *Fusarium* wilt symptom (HN) more than of the soil banana habitat with *Fusarium* wilt symptom (HF). DNA profiles at HN there were three, each of the indicated 450 bp, 250 bp and <100 bp, whereas in HF were two bands of DNA, each indicated as 250 bp and <100 bp. Based on the number of DNA bands proved that the soil microbial community in the HN is higher than in HF.

**Keywords:** PCR-RISA; mikroba tanah; pisang; layu fusarium

## 1. Pendahuluan

Budidaya tanaman pisang di Indonesia dan negara lainnya di dunia menghadapi kendala berupa penyakit layu yang disebabkan oleh serangan patogen yaitu *Ralstonia solanacearum* dan *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) (Semangun, 1989; Jones, 1994; Kangire dan Rutherford, 2001; Daly dan Walduck, 2006). Penyakit layu *Fusarium* telah menyebar ke seluruh areal tanaman pisang di Indonesia dan menurunkan hasil lebih dari 35% (Maspary, 2010), bahkan dapat mencapai 75% (Anonim, 2008). Produksi pisang di Bali pada tahun 1997 mencapai 134.000 ton/tahun, kemudian merosot menjadi 54.000 ton akibat gangguan penyakit layu *Fusarium* (Subekti, 2008). Penyakit layu *Fusarium* telah ditemukan pada tanaman pisang yang dibudidayakan di Bali seperti kultivar Saba, Susu, Ketip, dan Raja. Kultivar pisang ini rentan terhadap penyakit layu *Fusarium* (Sudana *et al.*, 2000).

Mikroorganisme tanah memegang peranan penting dalam menjaga kesehatan tanah, kualitas dan

produktivitas tanah (Hill *et al.*, 2000). Populasi dan keragaman mikroorganisme relatif tinggi pada tanah yang subur dan produktif, yang memiliki kandungan bahan organik tinggi. Tanah dengan kondisi seperti ini memiliki ratio antara mikroorganisme antagonis dan patogen lebih tinggi, sehingga disebut tanah supresif (*suppressive soil*) (Higa dan Parr, 1994; Garbeva *et al.*, 2004).

Keragaman mikroba di dalam tanah, tergantung tingkat kesuburan tanah. Conklin (2002) menyatakan bahwa dalam satu gram tanah terdapat 108-109 jenis bakteri, actinomycetes 107-108 jenis dan jamur 105-106 jenis. Ketiga kelompok mikroba ini jumlahnya cukup besar berada dalam tanah.

Masalah utama dalam mikrobiologi tanah adalah 99% mikroba tanah tidak dapat ditumbuhkan dalam media buatan (Kirk *et al.* 2004; Gofar *et al.*, 2007), oleh karena itu untuk menggambarkan keragaman mikroba yang sesungguhnya di dalam tanah harus menggunakan pendekatan molekuler. Pendekatan tersebut yaitu metode PCR-RISA (*polymerase chain reaction-ribosomal intergenic spacer analysis*).

Metode ini dapat digunakan untuk mengetahui profil DNA mikroba tanah (Fisher dan Triplett, 1999; Ranjard *et al.*; 2000; Ranjard *et al.*, 2001).

*Ribosomal RNA (rRNA) intergenic spacer analysis (RISA)* adalah metode analisis komunitas mikroba yang dapat memberikan gambaran perbandingan perbedaan lingkungan atau dampak perlakuan tanpa penyimpangan akibat pendekatan konvensional yaitu media tumbuh. RISA melibatkan amplifikasi PCR dari region gen operon rRNA di antara subunit kecil (16S) dan yang besar (23S) yang disebut dengan *intergenic spacer region (ISR)* (Fisher dan Triplett, 1999).

Metode PCR-RISA menggunakan primer oligonukleotida dengan sasaran gen operon rRNA di antara sub unit kecil (16S) dan sub unit besar (23S). Fragmen RISA dapat dihasilkan dari tanah sampel. Besar kecilnya daerah intergenik 16S-23S yang menyandi tRNA tergantung atas spesies bakteri. RISA dapat dipakai untuk mengeksploitasi ISR yang heterogen berkisar antara 150 bp dan 1500 bp, umumnya di antara 150 bp dan 500 bp. Produk PCR akan menghasilkan fragmen DNA dari komunitas mikroba. Produk ini dielektroforesis dalam gel agarose dan DNA divisualisasikan mengikuti noda (*staining*). Hasilnya adalah pola pita yang merupakan profil DNA. Masing-masing pita DNA menggambarkan populasi mikroba (Fisher dan Triplett, 1999).

## **2. Bahan dan Metode**

### *2.1 Tempat dan Waktu Penelitian*

Penelitian ini dilaksanakan terdiri atas dua bagian besar yaitu penelitian di lapangan dan penelitian di laboratorium. Penelitian di lapangan dimulai dari pengamatan tanaman sakit dan sehat, pemilihan lokasi sampel sampai pengambilan tanah sampel. Lokasi survei tanaman sakit dan sehat di tiga kabupaten di Bali yaitu Karangasem, Klungkung dan Jembrana, yang merupakan sentra tanaman pisang di Bali. Masing-masing kabupaten diambil dua lokasi yang mewakili habitat tanaman pisang tanpa gejala layu *Fusarium* (HN) dan habitat tanaman pisang dengan gejala *Fusarium* (HF). Waktu survei penentuan HN dan HF dilaksanakan bulan Juli 2009, dan pengambilan tanah sampel dilakukan Agustus 2009, sedangkan waktu pelaksanaan penelitian bulan Oktober 2009 sampai dengan Juli 2010.

### *2.2 Survei Penyakit Layu Fusarium pada Pisang*

Survei penyakit layu pisang dilakukan di tiga kabupaten yaitu Karangasem, Klungkung dan Jembrana. Setiap kabupaten dipilih dua lokasi yang masing-masing mewakili HN dan HF. Di kabupaten Karangasem dipilih desa Pesedahan untuk HN dan desa Buitan untuk HF, di kabupaten Klungkung dipilih desa Pesinggahan untuk HN dan desa Belatung untuk HF, dan di kabupaten Jembrana dipilih desa Yehsembung untuk HN dan desa Pekutatan untuk HF.

Tanaman pisang sakit disebabkan oleh jamur *Fusarium* dapat dibuktikan dengan melihat gejalanya, daun menguning mulai dari daun paling bawah, selanjutnya menjalar ke atas. Daun yang terserang berat kelihatan terkulai, selanjutnya batang pisang tanaman sakit dipotong kelihatan berwarna merah kecoklatan. Tanaman pisang yang terserang jenis kultivar kepok yang masih muda (belum berbuah). Potongan batang pisang sakit kemudian dimasukkan ke dalam plastik dan ditempatkan dalam *es box* (kotak es) dengan suhu 5°C, selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk disimpan di dalam refrigerator, sebelum dilakukan isolasi patogen.

Isolasi patogen dilakukan dengan memotong batang atau pelepah daun pisang sakit kira-kira 1 x 1 cm<sup>2</sup>, setelah itu dicelupkan dalam alkohol 70% selama dua menit untuk menghilangkan kontaminasi pada bagian luarnya, kemudian dibilas dengan mencelupkannya ke dalam akuades steril sebanyak tiga kali, selama dua menit. Potongan batang sakit diletakkan pada media PDA yang sebelumnya telah diisi dengan livoplosaxin (antibiotik antibakteri) pada konsentrasi 0,5% w/v dan diinkubasikan selama tiga hari pada suhu kamar (27±2°C). Bentuk spora (mikrokonidia, makrokonidia dan klamidospora) dilihat di bawah mikroskop dan difoto.

### *2.3 Pengambilan Tanah Sampel*

Pengambilan tanah sampel dilakukan di tiga kabupaten yaitu Karangasem, Klungkung, dan Jembrana. Masing-masing kabupaten ditentukan dua lokasi yang mewakili HN dan HF. Luas lokasi HN dan HF berkisar antara 0,40 – 0,50 Ha, jumlah rumpun tanaman pisang sakit pada lokasi HF berkisar antara 10 – 30 rumpun dan jumlah seluruh rumpun tanaman pisang yang diamati pada lokasi HN dan HF berkisar antara 20 – 50 rumpun.

Tanah sampel yang diambil selanjutnya dianalisis meliputi ekstrak langsung (*in situ*) DNA mikroba tanah di Laboratorium Biopestisida Jurusan Agroekoteknologi Fakultas Pertanian, dan Laboratorium Marine, Universitas Udayana.

Tanah sampel diambil untuk setiap habitat di dekat perakaran tanaman, empat lubang dengan kedalaman kurang lebih 20 cm. Tanah yang diambil dari setiap lubang dicampur secara merata dan diambil 100 g untuk analisis ekstrak DNA mikroba tanah. Pengambilan tanah sampel diulang tiga kali. Tanah sampel kemudian dimasukkan ke dalam tas plastik dan diletakkan dalam es box. Semua tanah sampel disimpan dalam refrigerator 18 sampai 24 jam.

#### 2.4 Uji Patogenisitas

Uji patogenisitas dilakukan untuk membuktikan penyakit layu pada pisang disebabkan oleh Foc dan jamur *Fusarium* yang ditemukan dalam tanah baik lokasi HN maupun HF adalah Foc. Suspensi konidia jamur masing-masing 40 ml dengan kerapatan  $2 \times 10^7$  konidia/ml dituangkan ke dalam pot yang berisi 1 kg tanah steril yang telah ditanami dengan bibit pisang sehat. Bibit pisang sehat yang digunakan telah berumur kurang lebih 2-3 minggu dan akhirnya telah dibersihkan, dicuci dengan air bersih dan dilukai dengan pisau steril. Suspensi konidia jamur disiramkan setelah bibit berumur satu minggu dalam pot. Metode ini diadopsi dari Soesanto dan Rahayuniati (2009).

#### 2.5 Uji Profil DNA mikroba tanah

##### a. Ekstraksi DNA mikroba tanah

Ekstraksi DNA mikroba tanah mengikuti petunjuk pelaksanaan berdasarkan metode *ISOIL for beads Beating* (ver 1) 040817MO Code No. 319-06201, yang dikeluarkan oleh perusahaan NIPPON GENE CO, LTD., Jepang. Satu kotak kit *ISOIL for beads beating* berisi : *beads tube*, *lysis solution BB*, *lysis solution 20 S*, *purification solution*, *precipitation solution*, *wash solution*, TE (pH 8,0) dan *ethacchinmate* (Kuske *et al.*, 1998; Yeates *et al.*, 1999).

Ekstraksi DNA mikroba yang berasal dari tanah sampel segar dapat dilakukan sebagai berikut : tanah sampel diambil 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung kecil yang didalamnya sudah terdapat *soil bead beating*. Sebanyak 950  $\mu$ l *lysis solution BB* ditambahkan ke dalam tabung, ditambah lagi dengan

500  $\mu$ l *lysis solution 20 S*, kemudian divortex selama 5 menit. Larutan tersebut selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 1 menit, kemudian diambil supernatannya dipindahkan ke tabung baru. Supernatan ditambah dengan 400  $\mu$ l *purification solution* dan divortex. Larutan ini selanjutnya ditambah dengan 600  $\mu$ l kloroform, setelah itu divortex selama 15 detik, dilanjutkan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 menit. Supernatan diambil ditambah dengan 800  $\mu$ l *precipitation solution*, divortex beberapa saat, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 20.000 x g selama 15 menit. Supernatan dibuang setelah selesai disentrifugasi, pellet dicuci dengan 1 ml *wash solution*, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 20.000 x g selama 10 menit. Supernatan kemudian dibuang, selanjutnya pellet dicuci dengan 1 ml ethanol 70 %, ditambah 2  $\mu$ l *ethacchinmate*, kemudian divortex, kembali disentrifugasi dengan kecepatan 20.000 x g selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan, kemudian ditambahkan dengan 50-100  $\mu$ l TE buffer pH 8,0.

##### b. Analisis PCR-RISA

Metode RISA menargetkan gen rRNA yang terdapat di antara daerah *intergenic spacer* (IGS) subunit kecil (16S) dan subunit besar (23S), umumnya panjang daerah *intergenic spacer* di antara 150 dan 1500 bp. Metode ini telah digunakan oleh Fisher dan Triplett (1999) dan Prijambada *et al.* (2006).

Campuran PCR-RISA berisi 2  $\mu$ l DNA-template, 2  $\mu$ l primer 1406F (5'>TGACACACCGCCCGT<3'), dan 2  $\mu$ l primer 23 SR (5'>GGGTTBCCCATTTCRG<3') (Prijambada *et al.*, 2006), 12,5  $\mu$ l PCR-Mix (Green Taq), 6,5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, sehingga total volume campuran adalah 23  $\mu$ l. Siklus PCR untuk denaturasi awal dilakukan pada suhu 95°C selama 5 menit, selanjutnya denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, *annealing* primer pada suhu 50°C selama 15 detik, polimerisasi pada suhu 72°C selama 1 menit dan diakhiri dengan polimerisasi selanjutnya pada suhu 72°C selama 7 menit. Masing-masing dilakukan 35 siklus. Produk PCR-RISA dielektroforesis pada agarose 1,5% yang dijalankan pada 80 V selama 1 jam. Gel diwarnai dengan 2  $\mu$ l/ml ethidium bromide dalam buffer TAE (40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, dan 1 mM EDTA, pH 7,0) divisualisasi pada UV (Fisher dan Triplett, 1999; Christanto *et al.*, 2007).

### c. Analisis pohon filogeni

Hasil visualisasi elektroforesis menghasilkan distribusi pita DNA pada setiap tanah sampel. Pola pita RISA dianalisis secara manual, sebaran setiap pita dihitung menggunakan ukuran marker molekuler 100 bp sebagai acuan, dengan tujuan untuk menentukan similaritas di antara profil pita DNA. Matrik binary yang digunakan untuk mencatat ada dan tidaknya pita yang dihasilkan (Priyambada *et al.*, 2006). Analisis pohon filogeni dilakukan dengan menggunakan program MEGA 4,0 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) untuk analisis *neighbor-joining* didasarkan atas matrik jarak genetik. Stabilitas pengelompokan ditentukan melalui analisis bootstrap dari 500 ulangan (Gleeson *et al.*, 2005; Tamura *et al.*, 2008).

## 3. Hasil dan Pembahasan

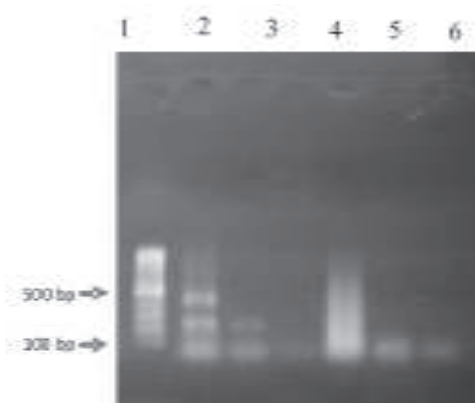
### 3.1 Profil DNA Mikroba Tanah

Berdasarkan hasil isolasi total DNA mikroba secara langsung dari tanah sampel dengan menggunakan kit *Isoil beads beating* Code No. 319-06201 (*Gene Nippon*) (Kuske *et al.*, 1998; Yeates *et al.*, 1999), menunjukkan pita tunggal yang tampak seperti Gambar 5.7 Hasil visualisasi gel elektroforesis total DNA dari enam tanah sampel tersebut serupa dengan yang telah dilakukan oleh peneliti Pratama *et al.* (2007). Pita genom tunggal menggambarkan adanya kelompok komunitas mikroba pada setiap tanah sampel. Total DNA yang didapat hasil ekstrak langsung dari sampel tanah, kemudian dilakukan amplifikasi dengan PCR-RISA.



Gambar 1. Visualisasi hasil elektroforesis total DNA dari enam tanah sampel (tanda panah pita genom), 1, 3 dan 5 = HN; 2, 4 dan 6 = HF

Hasil pengenceran total DNA selanjutnya dianalisis menggunakan PCR-RISA dan diperoleh pola pita DNA hasil visualisasi gel elektroforesis seperti Gambar 2. Hasil ini menunjukkan bahwa pada HN dan HF memiliki tingkat keragaman yang bervariasi. Gofar *et al.* (2007) menyatakan bahwa pola pita DNA yang khas dan unik merupakan sidik jari DNA pada setiap jenis mikroba. Pendapat di atas diperjelas yang menggambarkan profil spesifik komunitas dengan setiap pita DNA menandakan populasi mikroba pada tanah sampel (Fisher dan Triplett, 1999; Priyambada *et al.* 2006).



Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi daerah *intergenic spacer* (IGS) pada gel agarose 1,2% dari tanah sampel yang dianalisis (1,3, dan 5 = HN; 2, 4, 6 = HF dan M = marker DNA 100 bp)

Hasil visualisasi dengan gel agarose 1,2% menunjukkan profil DNA dengan jumlah pita DNA pada HN lebih banyak dibandingkan pada HF. Distribusi pita DNA pada HN ada tiga, masing-masing terindikasi 450 bp, 250 bp dan <100 bp, sedangkan pada HF tampak dua pita DNA, masing-masing terindikasi 250 bp dan < 100 bp (Gambar 2). Hal ini menandakan komunitas mikroba tanah pada HN lebih tinggi dibandingkan pada HF.

Hasil analisis polimorfis dari bagian yang memisahkan gen *rrs* dan *rrl* IGS (*intergenic spacer*) memiliki variasi ukuran dari 50 bp sampai 1,5 kb. Panjang daerah IGS bakteri berhasil diketahui yaitu filum  $\alpha$ -subdivisio proteobacteria dengan panjang IGS 500 - 1.500 bp,  $\beta$ -subdivisio proteobacteria dengan panjang IGS >400 - <800bp,  $\gamma$ -subdivisio proteobacteria dengan panjang IGS >300 - <800 bp,  $\delta$ -subdivisio Proteobacteria dengan

panjang IGS 700 bp (*Campylobacter*), bakteri Gram positif dengan kandungan G-C tinggi (actinomycetes) dengan panjang IGS >200 - <800 bp, Gram positif dengan kandungan G-C rendah, panjang IGS >100bp - 400 bp, Chlamydiae dengan panjang IGS 200 - <400 bp, Cyanobacteria dengan panjang IGS >300 - <600 bp, Spirochetes dengan panjang IGS 200 - <500 bp dan Cytopagales dengan panjang IGS >400 bp - <700bp (Ranjard *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2004 dan Christanto *et al.*, 2007).

Panjang daerah IGS pada jamur berkisar dari 200 bp sampai 1200 bp, berdasarkan ukuran pita DNA tersebut, berhasil diketahui panjang daerah IGS untuk beberapa filum jamur yaitu 434 – 882 bp untuk

Ascomycota (78 genus, 167 spesies), 401 – 543 bp untuk Basidiomycota (18 genus, 64 spesies), 771 – 936 bp untuk Zygomycota (3 genus, 6 spesies), 641 bp untuk Chytridiomycota (1 genus, 1 spesies), 434 – 1.065 bp untuk Oomycota (1 genus, 9 spesies), dan 500 – 1.100 bp untuk Plasmodiophoromycota (3 genus, 4 spesies) (Ranjard *et al.*, 2001).

Berdasarkan hasil PCR-RISA yang didapat dari keenam tanah sampel, pada HN dengan ukuran pita DNA 450 bp dan 250 bp dapat diprediksi mengandung bakteri kelompok  $\beta$ -subdivisio proteobacteria,  $\alpha$ -subdivisio proteobacteria, bakteri Gram positif dengan kandungan G-C tinggi (actinomycetes), bakteri Gram positif dengan

Tabel 1. Perbandingan jenis mikroba yang ditemukan pada habitat tanaman pisang tanpa gejala layu *Fusarium* (HN) dan dengan gejala layu *Fusarium* (HF) berdasarkan panjang IGS

Lokasi tanah sampel	Jumlah pita DNA	Panjang DNA (bp)	Kelompok mikroba yang mampu diprediksi	Referensi
HN	3	450	1. $\beta$ -subdivisio proteobacteria (18/43)* 2. $\gamma$ -subdivisio proteobacteria (9/26) 3. Actinomycetes (bakteri gram positif dengan kandungan G-C tinggi (16/78) 4. Bakteri gram positif dengan kandungan G-C rendah (17/92) 5. Chlamydiae (5/14) 6. Cyanobacteria (5/9) 7. Spirochetes (3/3) 8. Ascomycota (78/167) 9. Basidiomycota (18/64) 10. Oomycota (1/9)	Ranjard <i>et al.</i> (2000)
		250	1. Actinomycetes (bakteri gram positif dengan kandungan G-C tinggi (16/78) 2. Bakteri gram positif dengan kandungan G-C rendah (17/92) 3. Chlamydiae (5/14) 4. Spirochetes (3/3)	Ranjard <i>et al.</i> (2000)
		<100	Tidak mampu diprediksi	
HF	2	250	1. Actinomycetes (bakteri gram positif dengan kandungan G-C tinggi (16/78) 2. Bakteri gram positif dengan kandungan G-C rendah (17/92) 3. Chlamydiae (5/14)4. Spirochetes (3/3)	Ranjard <i>et al.</i> (2000)
		<100	Tidak mampu diprediksi	
		<100	Tidak mampu diprediksi	

\* Angka di dalam kurung menunjukkan jumlah genus dan spesies pada setiap filum

Tabel 2. Matrik jarak genetik mikroba tanah

	HN <sub>1</sub>	HF <sub>1</sub>	HN <sub>2</sub>	HF <sub>2</sub>	HN <sub>3</sub>	HF <sub>3</sub>
HN <sub>1</sub>	-					
HF <sub>1</sub>	0,555	-				
HN <sub>2</sub>	0,980	0,555	-			
HF <sub>2</sub>	1,000	0,980	0,555	-		
HN <sub>3</sub>	0,980	0,555	0,000	0,555	-	
HF <sub>3</sub>	0,980	0,555	0,000	0,555	0,000	-

Keterangan : Tanah sampel yang berasal dari habitat tanaman pisang tanpa gejala layu *Fusarium* (HN) : HN<sub>1</sub> = Desa Pesedahan-Karangsem, HN<sub>2</sub> = Desa Pesinggahan-Klungkung dan HN<sub>3</sub> = Desa Yehsembung-Jembrana, dan habitat tanaman pisang dengan gejala layu *Fusarium* (HF) : HF<sub>1</sub> = Desa Buitan-Karangsem, HF<sub>2</sub> = Desa Belatung-Klungkung dan HF<sub>3</sub> = Desa Pekutatan-Jembrana

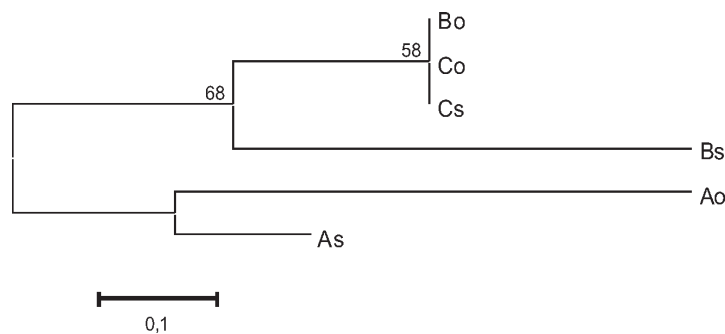
kandungan G-C rendah, Chlamydae, Cyanobacteria, Spirochetes, kelompok jamur Ascomycota, Basidiomycota dan Oomycota (Tabel 1), sedangkan pada HF dengan panjang IGS 250 bp diprediksi mengandung kelompok bakteri Gram positif dengan kandungan G-C tinggi, kelompok bakteri gram positif dengan kandungan G-C rendah, kelompok Chlamydiae, dan kelompok Spirochetes, sedangkan sampel tanah yang mengandung panjang IGS <100 bp kelompok mikroba tidak mampu diprediksi. Hal ini membuktikan keragaman mikroba tanah pada HN lebih tinggi dibandingkan pada HF (Tabel 1).

### 3.2 Hasil Analisis Pohon Filogeni

Hasil visualisasi elektroforesis dilanjutkan dengan analisis pohon filogeni menggunakan program MEGA 4,0 (*Molecular Evolutionary*

*Genetic Analysis*) untuk analisis *neighbor-joining* didasarkan atas matrik jarak genetik. Stabilitas pengelompokan dipastikan melalui analisis bootstrap dari 500 ulangan (Gleeson *et al.*, 2005; Tamura *et al.*, 2008). Jarak genetik yang paling dekat satu dengan yang lain adalah mikroba asal HN<sub>2</sub>, HN<sub>3</sub> dan HF<sub>3</sub>, disusul antara HN<sub>1</sub> dengan HF<sub>1</sub>; HF<sub>1</sub> dengan HN<sub>2</sub>, HN<sub>3</sub> dan HF<sub>3</sub>; HF<sub>2</sub> dengan HN<sub>2</sub>, HN<sub>3</sub> dan HF<sub>3</sub>, masing-masing dengan jarak genetik 0,555. Jarak genetik yang cukup jauh antara HN<sub>1</sub> dengan HN<sub>2</sub>, HN<sub>3</sub> dan HF<sub>3</sub>, masing-masing dengan jarak 0,980, dan paling jauh adalah antara HN<sub>1</sub> dan HF<sub>2</sub> yaitu 1,000 (Tabel 2).

Jarak genetik berbanding terbalik dengan nilai similaritasnya, apabila jarak genetiknya 0 maka similaritasnya 100%, begitu juga sebaliknya. Keeratan hubungan kekerabatan yang tercermin



Gambar 3. Pohon filogeni kekerabatan komunitas mikroba tanah pada habitat tanaman pisang dengan dan tanpa gejala layu *Fusarium* berdasarkan gen rRNA

dengan dekatnya jarak genetik dapat disebabkan oleh perpindahan material tanaman di Provinsi Bali (bibit, batang, daun maupun buah) yang terkontaminasi dengan tanah mengandung mikroba yang ikut terbawa ke daerah lain. Hal ini terjadi pada sampel tanah HN<sub>2</sub>, HN<sub>3</sub> dan HF<sub>3</sub> yang berlokasi dekat dengan jalan raya, sedangkan tanah sampel HN<sub>1</sub> merupakan tanah perkebunan yang subur, dibajak (diolah) dan jauh dari jalan raya (3,5 km).

Hasil analisis rekonstruksi filogeni dengan metode statistik *neighbor-joining*, dan uji filogeni dengan metode bootstrap dari jumlah replikasi sebanyak 500 dapat dilihat seperti Gambar 3. Ada dua kelompok yang berasal dari HN dan HF yaitu kelompok 1 similaritasnya sama yang ditunjukkan oleh sampel HN<sub>2</sub>, HN<sub>3</sub> dan HF<sub>3</sub>, tetapi sudah berbeda ranting dengan HF<sub>2</sub>. Kelompok 2 masih dalam satu cabang antara HN<sub>1</sub> dan HF<sub>1</sub>, tetapi sudah berbeda cabang dengan HN<sub>2</sub>, HN<sub>3</sub>, HF<sub>3</sub> dan HF<sub>2</sub> (Gambar 3).

#### Daftar Pustaka

- Anonim. 2008. "Penyakit Utama pada Tanaman Pisang". Mimbar Penyuluh Online. *Taploid Sinar Tani* 2 h.
- Christanto, A, S. Soekardono, A. Surono, N. Primadewi dan R. Harowi. 2007. Pendekatan molekuler (RISA) untuk membedakan spesies bakteri otitis media supuratif kronik benigna aktif. *Cermin Dunia Kedokteran*, 155. 81-86.
- Conklin, A.R. 2002. Soil Microorganisms. Soil Sediment and Water. *AEHS Magazine*, [cited 2008 Oct. 10]. Available from : [Http://www.aehsmag.com/issues/2002/januray/microorganisms.htm](http://www.aehsmag.com/issues/2002/januray/microorganisms.htm).
- Daly, A. and G. Walduck. 2006. Fusarium Wilt of Banana (Panama Disease)(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*). Northern Territory Government. *Agnote*, 151. 1-5.
- Fisher, M.M. and E.W. Triplett. 1999. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10). 4630-4636.
- Garbeva, P., J.A. van Veen and J.D. van Elsas. 2004. Microbial Diversity in Soil : Selection of Microbial Population by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42. 243-270.
- Gleeson, D.B., N. Clipson, K. Melville, G. M. Gadd and F. P. McDermott. 2005. Characterization of fungal community structure on a weathered pegmatitic granite. *Microbiol Ecology*, 53. 1-9.
- Gofar, N., M.A. Diha dan A. Napoleon. 2007. Keragaman Mikroba Tanah pada Lahan Budidaya Daerah Lebak. *Jurnal Akta Agrosia Edisi Khusus*, 1. 5-10.
- Higa, T and J.F. Parr. 1994. *Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Environment*. International Nature Farming Research Center Atami, Japan.

#### 4. Simpulan

Kajian profil DNA mikroba tanah secara *in situ* dengan teknik PCR-RISA baru pertama dilakukan untuk mengetahui profil DNA mikroba tanah pada habitat tanaman pisang dengan dan tanpa gejala layu *Fusarium*. Hasil penelitian menunjukkan jumlah pita DNA mikroba tanah pada habitat tanaman pisang tanpa gejala layu *Fusarium* lebih banyak (panjang < 100 bp, 250 bp dan 450 bp), dibandingkan pada habitat tanaman pisang dengan gejala layu *Fusarium* (panjang < 100 bp dan 250 bp). Berarti keragaman mikroba tanah pada habitat tanaman pisang tanpa gejala layu *Fusarium* lebih tinggi dibandingkan pada habitat tanaman pisang dengan gejala layu *Fusarium*.

#### Ucapan Terima kasih

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Ketua Laboratorium Biopestisida Fakultas Pertanian, dan Ketua Laboratorium Marine Universitas Udayana atas kemudahan yang diberikan selama mengadakan penelitian.

- Hill, G.T., N.A. Mitkowski, L. Aldrich-Wolfe, L.R. Emele, D.D. Jurkonie, A. Ficke, S. Maldonado-Ramirez, S.T. Lynch, and E.B. Nelson. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15: 25-36.
- Jones, D.R. 1994. The characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* From Asia. *Infomusa. Inibap*, 4(2). 2-4.
- Kangire, A and M. Rutherford. 2001. Wilt-like Disorder of Banana in Uganda. *Musa Disease Factsheet. Inibap*, 10: 1-4.
- Kirk, J.L., L.A. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J.N. Klinomos, H.Lee and J. T. Trevors. 2004. Methods of Studying Soil Microbial Diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 169-188.
- Kuske, C.R., K.L. Banton, D.L. Adorada, P.C. Stark, K.K. Hill, and P.J. Jackson. 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cell and spore in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (7): 2463-2472.
- Lynch, J.M., A. Benedetti, H. Insam, M.P. Nuti, K. Smalla, V. Torsvik and P. Nannipieri. 2004. Microbial diversity in soil : ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biol. Fertil. Soil* 40: 363-385.
- Maspary. 2010. *Penyakit Layu Fusarium (Penyakit Panama) pada Tanaman Pisang*. Gerbang Pertanian. Wajah Pertanian Indonesia. Purwokerto.
- Prijambada, I.D., J. Widada and R.A. Sitompul. 2006. Impact of land use intensity on microbial community in agroecosystems of Southern Sumatera. *Final Report of International Symposium* 18(3) : 49-54.
- Ranjard, L., E. Brothier, and S. Nazaret. 2000. Sequencing Bands of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints for Characterization and Microscale Distribution of Soil Bacterium Populations Responding to Mercury Spiking. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12): 5334-5339.
- Ranjard, L., F. Poly, J.C. Lata, C. Mougel, J. Thioulouse, and Nazaret. 2001. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Applied and Environmental Microbiology* 67(10): 4479-4487.
- Semangun, H. 1989. *Penyakit-penyakit Penting Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Gadjah Mada Press. Yogyakarta.
- Soesanto, L. Dan R.F. Rahayuniati. 2009. Pengimbasan ketahanan bibit pisang ambon kuning terhadap penyakit layu Fusarium dengan beberapa jamur antagonis. *J. HPT Tropika* 9(2): 130-140.
- Subekti, S. 2008. "Dewa Ngurah Suprpta, Penyelamat Pisang Bali". Suara Pembaharuan Daily. Last modified : 14/10/2004. Disitir tanggal 9-10-2008. <http://air.bappenas.go.id/doc/pdf/klipping/Dewa%20Ngurah%20Suprpta,20penyelamat%20pisang%20Bali.pdf>.
- Sudana, M., D.N. Suprpta, N. Arya dan G.P. Wirawan. 2000. *Penelitian Pengendalian Penyakit Layu Tanaman Pisang Tersebar di 9 (Sembilan) Kabupaten/Kota di Bali*. Kerjasama antara Dinas Pertanian Tanaman Pangan Provinsi Bali dengan Fakultas Pertanian Universitas Udayana. Fak. Pertanian Unud. Denpasar.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2008. *MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) VERSION 4*. Center of Evolutionary Functional Genomics Biodesign Institute Arizona State University.
- Yeates, C., M.R. Gillings, A.D. Davison, N. Altavilla and D.A. Veal. 1999. Method for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol. Proce.*, (online) 1: 40-47.