

ISOLASI DNA METAGENOMIK DALAM RANGKA STUDI METANOGENESIS PADA TANAH SAWAH

Ni Luh Putu Mustika Praptiwi, Iryanti Eka Suprihatin, dan I Nengah Wirajana*

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran
**Email: wirajana@yahoo.com*

ABSTRAK

Metagenomik merupakan suatu pendekatan baru dalam analisis genom yang kompleks dalam lingkungan, yang diawali dengan isolasi DNA total langsung dari sampel lingkungan. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi DNA total dari sampel tanah sawah. Lahan pertanian diketahui menyumbang 76% dari total gas metana (CH_4). Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh DNA metagenomik yang diisolasi dari tanah sawah dalam rangka studi metanogenesis. Isolasi DNA metagenomik dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel secara langsung dan tidak langsung. Isolasi DNA metagenomik dengan metode lisis sel secara langsung dilakukan dengan melisis langsung sel-sel yang terkandung dalam sampel tanah sawah diikuti dengan pemisahan DNA dari matriks tanah dan puing-puing sel. Isolasi DNA metagenomik dengan metode lisis sel secara tidak langsung dilakukan dengan terlebih dahulu memisahkan sel-sel dari sampel tanah sawah diikuti dengan lisis sel. DNA metagenomik hasil isolasi dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa dan spektrofotometri UV-Vis dengan pengukuran absorbansi pada λ 230, 260, dan 280 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA metagenomik dapat diisolasi dari sampel tanah sawah dengan menggunakan metode lisis sel secara langsung maupun secara tidak langsung. Hasil elektroforesis menunjukkan kualitas DNA total yang diperoleh dengan metode lisis sel secara tidak langsung relatif lebih sedikit terfragmentasi dibandingkan dengan metode lisis sel secara langsung. Hasil analisis spektrofotometri menunjukkan bahwa DNA total hasil isolasi dengan metode lisis sel secara tidak langsung lebih banyak terkontaminasi asam humat dibandingkan dengan metode lisis secara langsung. Namun demikian, DNA hasil isolasi dengan metode lisis sel secara tidak langsung lebih sedikit terkontaminasi protein dibandingkan dengan metode lisis secara langsung.

Kata kunci: DNA metagenomik, metanogenesis, tanah sawah

ABSTRACT

Metagenomic is a new approach of complex genomes analysis from environmental samples. Isolation of total DNA from rice field soil sample has been conducted. Rice field, as an agriculture land, has been known to contribute 76% of total methane (CH_4). The purpose of this study was to obtain metagenomic DNA isolated from rice field soil in order to study methanogenesis. Metagenomic DNA was isolated by direct and indirect cell lysis methods. Direct cell lysis method was conducted by directly lysing the cells in soil matrix followed by separation of DNA from the matrix and cell debris. Isolation of metagenomic DNA with indirect cell lysis method was carried out by cell separation from soil matrix followed by cell lysis. Metagenomic DNA were analyzed by agarose gel electrophoresis and UV-Vis spectrophotometry at λ 230, 260, and 280 nm. The results showed that metagenomic DNA could be isolated from rice field soil samples using direct and indirect cell lysis methods. Electrophoresis results showed that total DNA quality obtained by the indirect cell lysis was relatively less fragmented compared with direct cell lysis method. Spectrophotometric analysis showed that the total DNA isolated by indirect cell lysis was contaminated by humic acid more than metagenomic DNA isolated by direct cell lysis method. However, the metagenomic DNA by indirect cell lysis was contaminated by protein less than metagenomic DNA that obtained by direct cell lysis method.

Keywords: DNA metagenomic, methanogenesis, rice field soil

PENDAHULUAN

Gas metana memiliki persentase sebesar 20% dalam total gas rumah kaca (Achmad, 2004). Pengelolaan lahan pertanian pada skala global telah berkontribusi sekitar 15% dari seluruh emisi gas rumah kaca (GRK) dan padi sawah menyumbang 76% dari total gas metana yang diemisikan dari sektor pertanian (Departemen Pertanian, 2007). Hal ini disebabkan oleh kondisi anaerobik pada lahan sawah akibat penggenangan air yang tinggi dan lama (Departemen Pertanian, 2007).

Pembentukan gas metana secara biologi dari kelompok kecil mikroorganisme (metanogen) disebut metanogenesis. Metanogen telah diketahui secara luas sulit untuk diisolasi, seperti beberapa anggota dari spesies metanogen yang memerlukan waktu inkubasi yang lama untuk tumbuh. Beberapa metanogen lainnya seringkali sulit untuk dipisahkan dari mikroorganisme lain yang memiliki keterkaitan hubungan dalam suatu proses yang sama. Hal baru yang berkembang saat ini adalah mempelajari kelimpahan, distribusi, dan keanekaragaman metanogen secara langsung dari ekosistem dengan metode molekuler, salah satunya dengan teknologi metagenomik (Garcia, *et al.*, 2000).

Tahapan awal pada studi metagenomik adalah isolasi DNA secara langsung dari sampel lingkungan, baik dari tanah, air, dan sumber lainnya (Couto *et al.*, 2010). Metode isolasi DNA metagenomik dapat diklasifikasikan menjadi dua, yaitu dengan menggunakan lisis sel secara langsung dan tidak langsung (Ogram, *et al.*, 1987 dalam Gabor, *et al.*, 2003). Isolasi DNA secara langsung dilakukan dengan lisis sel di dalam matriks sampel dilanjutkan dengan pemisahan DNA dari matriks dan sel debris (Ogram, *et al.*, 1987 dalam Gabor, *et al.*, 2003). Sedangkan isolasi DNA secara tidak langsung melibatkan ekstraksi sel dari material-material lingkungan sebelum dilakukan lisis DNA (Holben *et al.*, 1988 dalam Gabor *et al.*, 2003). Pada penelitian ini dilakukan isolasi DNA total metagenomik dari sampel tanah sawah di kawasan pertanian padi Kelurahan Peguyangan, Bali dengan menggunakan metode lisis sel secara langsung dan tidak langsung.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan kimia yang digunakan semua dengan kualitas *pro-analysis* (p.a), yaitu NaOCl, NaOH, Tris-HCl, Na₂EDTA.2H₂O, NaCl, Sodium Dodesil Sulfat (SDS), CaCl₂, fenol, kloroform, isoamil alkohol, isopropanol, Na-asetat, etanol, agarosa, Etidium Bromida, basa Tris-HCl, asam asetat glasial, bromofenol biru, dan sukrosa. Sampel tanah sawah diambil dari kawasan pertanian padi Kelurahan Peguyangan, Bali.

Peralatan

Termometer, pipet volum, gelas piala, gelas ukur, Erlenmeyer, labu ukur, tabung sentrifugasi, kuvet, dan batang pengaduk, plastik polietilen, bola hisap, spatula, mikro pipet, tip mikro putih (10 µL), kuning (200 µL), dan biru (1000 µL), tabung mikro 1,5 mL (Eppendorf), spektrofotometer *UV-Vis Mini-1240 Single Beam Shimadzu*, seperangkat alat elektroforesis horizontal (*Mupid 2Plus*), neraca analitik, autoklaf, *magnetic stirrer*, vorteks, *Centrifuge Hettich EBA III*, *High Speed Refrigerated Micro Centrifuge TOMY MX-301*, dan *Molecular Imager Gel DocTM XR Imaging System BIO-RAD*.

Cara Kerja

Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah sawah diambil di empat titik yang berdekatan di kawasan pertanian padi Kelurahan Peguyangan Bali (8°36'44.81" LS dan 115°12'39.62" BT) pada kedalaman tanah 5-10 cm. Sampel tanah dari empat titik tersebut lalu dicampur dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, disimpan pada suhu -20°C sebelum dilakukan isolasi DNA.

Isolasi DNA Metagenomik dengan Metode Lisis Sel Secara Langsung

Metode lisis sel secara langsung diambil dari metode Kuske, *et al.*, (1997) yang telah dimodifikasi oleh Nahid, *et al.*, (2012). Sebanyak 1,00 gram sampel tanah sawah diresuspensi dengan 2 mL larutan penyangga TENS (50 mM Tris, pH 8,0; 20 mM Na₂EDTA; 10 mM NaCl; SDS 1% [b/v]) dan digetarkan dengan vorteks selama 1 menit. Sampel diinkubasi pada suhu 100°C selama 10 menit, kemudian disentrifugasi

pada 10.000 x g selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi baru (supernatan 1), pelet tanahnya diresuspensi pada 1,5 mL larutan penyangga TEN (50 mM Tris, pH 8,0; 20 mM Na₂EDTA; 10 mM NaCl). Campuran ditempatkan dalam suhu -20°C selama 10 menit dan segera dimasukkan ke dalam penangas air dengan suhu 100°C, kemudian dipindahkan kembali ke dalam freezer (*thermal shock*). Langkah *thermal shock* dilakukan sebanyak tiga set. Hasil *thermal shock* disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 10 menit dan supernatan dikumpulkan di tabung sentrifugasi yang telah berisi supernatan 1. Campuran supernatan ditambahi 250 µL (minimal 1x volume supernatan) campuran fenol-kloroform-isoamil alkohol (25:24:1), dan dicampur dengan cara membolak-balikan tabung 4-6 kali. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 5.000 x g selama 10 menit dan supernatannya dipindahkan ke tabung baru.

Isolasi DNA Metagenomik dengan Metode Lisis Sel Secara Tidak Langsung

Tahap preparasi pada metode lisis sel secara tidak langsung dimodifikasi dari metode Marco (2010) dan tahap lisis sel diambil dari metode Amorim (2008). Sebanyak 10,0 g sampel tanah sawah dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi steril dan diresuspensi dengan 3 mL larutan penyangga TE (Tris-HCl dan EDTA) pH 8 50/50. Campuran disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 100 x g pada suhu kamar. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru dan steril, lalu disentrifugasi pada kecepatan 6.000 x g selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh dipindahkan lagi ke dalam tabung sentrifugasi yang berisi tanah tadi dan dilakukan pengerjaan yang sama sampai 6 kali pengulangan dan diperoleh pelet sel ± 0,2 g. Pelet sel disimpan dalam suhu -20°C untuk tahapan berikutnya. Pelet ditambah 350 µL larutan penyangga TE 50/50 (50 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA, pH 8,0) dan *glass beads*. Pelet diresuspensi dengan cara digetarkan dengan vorteks selama 2 menit pada kecepatan penuh, diikuti sentrifugasi pada kecepatan 6.000 x g selama 3 menit. Setiap setelah sentrifugasi, diresuspensi kembali dengan cara divorteks selama 2 menit. Langkah ini dilakukan sampai 3

set. Campuran ditambahkan 200 µL SDS (20% b/v), divorteks selama 1 menit, dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 28°C. Campuran tersebut ditempatkan dalam suhu -20°C selama 10 menit dan segera dimasukkan ke dalam air mendidih selama 4 menit. Langkah *thermal shock* ini dilakukan sebanyak tiga set. Hasil *thermal shock* ditambahkan sebanyak 650 µL (minimal 1x volume sampel) campuran fenol-kloroform-isoamil alkohol (25:24:1), dan dicampur dengan cara membolak-balikan tabung 4-6 kali. Campuran ini selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 5000 x g selama 10 menit, supernatannya dipindahkan ke tabung mikro steril yang baru.

Tahap Ekstraksi DNA

Tahap ekstraksi diambil sebagian dari metode Amorim (2008). Masing-masing lapisan atas hasil sentrifugasi dari kedua metode diambil dan ditambahkan isopropanol dingin sebanyak minimal 1x volume supernatan dan Na-asetat sebanyak sepersepuluh total campuran, diresuspensi, dan disimpan pada suhu -20°C selama minimal 2 jam. Campuran disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 9100 x g pada suhu kamar. Supernatan dibuang, peletnya dicuci 1x dengan etanol 95%, dicuci dengan etanol 70%, dan terakhir dicuci lagi dengan etanol 95%. Pelet hasil pencucian diresuspensi dalam 50 µL larutan penyangga TE (Tris-HCl dan EDTA) 10/0,1.

Analisis Elektroforesis Gel Agarosa

Gel agarosa 1% dibuat dengan melarutkan 0,4 g agarosa dalam 40 mL larutan penyangga TAE 1x (Tris-asetat 40 mM dan Na₂EDTA 1 mM pH 8) dengan pemanasan. Setelah agarosa terlarut dan didinginkan sampai kira-kira suhunya 45°C, selanjutnya gel agarosa dituangkan pada cetakan dan dibiarkan memadat. Sampel DNA yang akan dielektroforesis dicampur dengan *loading buffer* 1x [*loading buffer* 6x : *bromophenol blue* 0,25% (b/v) dan sukrosa 40% (b/v)]. Elektroforesis dilakukan dalam larutan penyangga TAE pada tegangan 70-100 Volt. Elektroforesis dihentikan ketika *bromophenol blue* telah bermigrasi kira-kira 2/3 dari panjang gel. Kemudian, gel agarosa direndam dalam larutan EtBr 250 µg/mL selama 5 menit, selanjutnya direndam dalam larutan penyangga TAE atau aquades selama 10 menit. Pita DNA dapat diamati dengan sinar UV menggunakan

Molecular Imager Gel Doc™XR Imaging System BIO-RAD.

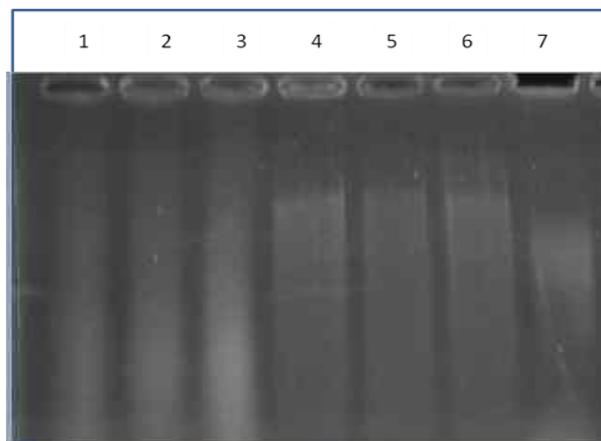
Analisis spektrofotometri UV-Vis

Larutan hasil isolasi DNA total diambil sebanyak 3 µL kemudian diencerkan dengan larutan penyangga TE 10/0,1 pH 8 hingga volume akhir 1200 µL. Sampel dituangkan ke dalam kuvet, lalu DNA total dianalisis kemurniannya pada panjang gelombang 230, 260, dan 280 nm dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Analisis DNA Metagenomik dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Teknik elektroforesis digunakan untuk analisis protein serta asam nukleat hingga 350.000 dalton (500 pasang basa), dan metode standar yang digunakan untuk mengkarakterisasi RNA dan DNA pada rentang 200 - 50.000 pasang basa adalah elektroforesis dengan agarosa dan harus digunakan secara horizontal (Boyer, 2005). Elektroforegram hasil analisis DNA metagenomik pada tanah sawah dengan metode lisis sel secara langsung dan tidak langsung dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram DNA hasil isolasi dari tanah sawah (1-3: metode lisis sel secara langsung; 4-6: metode lisis sel secara tidak langsung; 7: kontrol DNA total ragi)

Metode lisis sel secara langsung memberikan pita-pita hasil elektroforesis yang lebih terang di bagian yang lebih jauh dari sumur dan berekor. Ini menunjukkan bahwa ukuran molekul DNA metagenomik yang diperoleh dengan metode lisis sel secara langsung banyak yang terfragmentasi dan berukuran kecil. DNA total yang utuh pada umumnya memiliki bentuk pita yang besar/ lebar, tidak berekor, dan memiliki pergerakan yang tidak jauh dari sumur (Sambrook, *et al*, 1989). Hal ini dapat terjadi karena tidak dilakukannya ekstraksi sel dari matriks tanah terlebih dahulu, sehingga banyak kontaminan yang dapat menyebabkan rantai DNA terfragmentasi. Fragmentasi rantai DNA juga diduga akibat inkubasi yang cukup lama pada suhu 100°C saat proses lisis sel, yaitu selama 10 menit. Pada metode lisis sel secara tidak langsung, terlihat pita-pita elektroforegram yang terang terletak dekat dengan sumur. Ini berarti molekul DNA metagenomik hasil isolasi yang diperoleh dengan metode lisis sel secara tidak langsung berukuran lebih besar dan relatif lebih sedikit yang terfragmentasi (lebih utuh). Pita DNA hasil isolasi dengan metode lisis sel secara tidak langsung juga menunjukkan bahwa ukuran DNA kromosom yang diperoleh dari sampel tanah sawah lebih besar dibandingkan dengan ukuran DNA kromosom ragi.

Hasil Analisis Isolasi DNA Metagenomik dengan Spektrofotometri UV-Vis

Nukleotida memberikan absorbansi maksimal pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan protein memberikan absorbansi maksimal pada panjang gelombang 280 nm (Boyer, 2005). Kontaminasi protein pada DNA hasil isolasi dapat dilihat pada rasio A_{260}/A_{280} , sedangkan kontaminasi asam humat dan fenol dapat dilihat pada rasio A_{260}/A_{230} (Steffan, *et al*, 1988). Isolasi DNA langsung dari tanah sawah sangat mungkin terkontaminasi asam humat yang tinggi. Kontaminasi asam humat pada DNA hasil isolasi akan sangat merugikan karena dapat mengganggu proses kloning dan ekspresi gen (Harry, *et al*, 1999). Pengukuran absorbansi hasil isolasi DNA akan berbanding lurus dengan konsentrasi DNA dalam sampel. Pengukuran absorbansi dilakukan pada tiga panjang gelombang, yaitu 230, 260, dan 280 nm. Hasil

analisis dengan spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Spektra UV/Vis sampel DNA hasil isolasi metagenomik dengan metode lisis sel secara langsung

Sampel	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
I	0,296	0,239	0,187	1,278	0,807
II	0,332	0,272	0,209	1,301	0,819
III	0,225	0,177	0,136	1,301	0,787
Nilai rata-rata				1,2933 ± 0,0133	0,8043 ± 0,0162

Tabel 2. Spektra UV/Vis sampel DNA hasil isolasi metagenomik dengan metode lisis sel secara tidak langsung

Sampel	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
I	1,634	0,639	0,445	1,436	0,391
II	1,580	0,615	0,431	1,427	0,389
III	1,215	0,423	0,298	1,419	0,348
Nilai rata-rata				1,4273 ± 0,0085	0,376 ± 0,0243

Berdasarkan data yang diperoleh pada Tabel 1 dan Tabel 2, semua sampel DNA metagenomik hasil isolasi memberikan serapan pada panjang gelombang 260 nm. Hal ini menunjukkan bahwa seluruh sampel mengandung DNA metagenomik. Nilai rata-rata rasio A₂₆₀/A₂₈₀ yang masih di bawah 1,8 menunjukkan seluruh sampel DNA metagenomik hasil isolasi masih terkontaminasi protein karena DNA yang murni memiliki nilai rasio A₂₆₀/A₂₈₀ yang berada pada nilai 1,8 – 2,0 (Boyer, 2005). Rendahnya rasio A₂₆₀/A₂₃₀ juga dapat dilihat bahwa seluruh sampel DNA metagenomik hasil isolasi masih terkontaminasi asam humat yang sangat tinggi.

Hasil isolasi DNA metagenomik dari sampel tanah dengan metode lisis sel secara tidak langsung umumnya memberikan hasil kontaminasi asam humat yang lebih rendah dibandingkan dengan metode lisis sel secara langsung (Robe, 2003). Akan tetapi, hasil analisis spektrofotometri pada Tabel 1 dan Tabel 2 menunjukkan bahwa DNA metagenomik hasil isolasi dengan metode lisis sel secara tidak langsung pada penelitian ini lebih banyak terkontaminasi asam humat dibandingkan dengan DNA metagenomik hasil isolasi dengan metode lisis sel secara langsung. Hal ini dapat dilihat dari nilai rata-rata rasio A₂₆₀/A₂₃₀ dengan metode lisis sel secara tidak langsung lebih kecil dibandingkan dengan nilai rasio A₂₆₀/A₂₃₀ dengan metode lisis sel secara langsung. Dalam penelitian ini, belum diketahui

penyebab tingginya kontaminasi asam humat pada DNA metagenomik hasil isolasi dengan metode lisis sel secara tidak langsung dibandingkan dengan metode lisis sel secara langsung.

Metode lisis sel secara tidak langsung memberikan DNA hasil isolasi yang lebih murni dari kontaminasi protein. Nilai rata-rata rasio A₂₆₀/A₂₈₀ DNA hasil isolasi dengan metode lisis sel secara tidak langsung menunjukkan nilai yang lebih besar dibandingkan dengan nilai rata-rata rasio A₂₆₀/A₂₈₀ DNA hasil isolasi dengan metode lisis sel secara langsung. Hal ini dapat terjadi karena dengan metode lisis sel secara tidak langsung dilakukan pemisahan sel dari matriks tanah sebelum dilakukan ekstraksi DNA, sehingga lebih sedikit kontaminasi pada sampel DNA metagenomik hasil isolasi.

Penelitian Lebih Lanjut

Salah satu “topik hangat” dalam penelitian metagenomik adalah fragmen DNA yang diperoleh dari sekuenser pendek. Secara khusus, hal utama yang dibahas dalam proyek metagenomik adalah analisis taksonomi, analisis kuantitatif, serta analisis fungsional (Richter, 2009). Pada studi ini analisis taksonomi dari mikroorganisme yang berperan dalam suatu proses kompleks metanogenesis dilakukan. Sampel DNA metagenomik hasil isolasi dari tanah sawah pada penelitian ini masih banyak mengandung kontaminan, seperti protein, asam humat dan RNA. Untuk itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk pemurnian DNA hasil isolasi ini agar terbebas dari kontaminan yang dapat mengganggu jalannya proses selanjutnya, yaitu untuk analisis taksonomi mikroorganisme dalam kompleks metanogenesis.

Metode yang sering digunakan untuk analisis taksonomi mikroorganisme adalah teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Teknik ini digunakan untuk menelaah profil DNA gen 16S-rRNA. Penggunaan 16S-rRNA telah digunakan sebagai parameter sistematik molekuler universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa DNA metagenomik dapat diisolasi dari sampel tanah sawah dengan metode lisis sel secara langsung dan tidak langsung. DNA hasil isolasi dengan metode lisis sel secara tidak langsung lebih banyak terkontaminasi asam humat namun lebih sedikit terkontaminasi protein dibandingkan dengan DNA

metagenomik hasil isolasi dengan metode lisis sel secara langsung. Hasil elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa DNA metagenomik hasil isolasi dengan metode lisis sel secara tidak langsung memberikan hasil DNA isolasi yang relatif lebih sedikit terfragmentasi (relatif lebih utuh) dibandingkan dengan DNA metagenomik hasil isolasi dengan metode lisis sel secara langsung.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan DNA metagenomik hasil isolasi dari tanah sawah yang lebih murni dan lebih utuh dalam rangka studi metanogenesis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dra. Emmy Sahara, M.Sc.(Hons), Dra. Ni Made Puspawati, M.Phil., Ph.D., dan James Sibarani, S.Si., M.Si. atas kritik dan saran dalam penulisan karya ilmiah ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih pada Ni Putu Frida Oktaningtias Widiartha dan Ni Luh Made Widayantini atas bantuan selama proses penelitian, serta kepada Kepala Laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biologi Molekuler Gedung Pascasarjana Universitas Udayana dan Kepala Laboratorium Forensik Universitas Udayana.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, R., 2004, *Kimia Lingkungan*, Cetakan Pertama, Penerbit Andi, Yogyakarta
- Amorim, J.H., Macena, T.N.S., Lacerda-Junior, G.V., Rezende, R.P., Dias, J.C.T., Brendel, M., and Cascardo, J.C.M., 2008, An Improved Extraction Protocol for Matagenomic DNA from a Soil of the Brazilian Atlantic Rainforest, *Journal Genetic and Molecular Research*, 7 (4) : 1226-1232
- Boyer, R., 2005, *Modern Experimental Biochemistry*, 2nd Edition, Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., California
- Couto, G.H., Glogauer, A., Faoro, H., Chubatsu, L.S., Souza, E.M., and Pedrosa, F.O., 2010, Isolation of a Novel Lipase From a Metagenomic Library Derived From Mangrove Sediment From the South Brazilian Coast, *Genet. Mol. Res.*, 9 (1) : 514-523
- Departemen Pertanian, 2007, *Agenda Nasional (2008-2015) dan Rencana Aksi (2008-2009) Pengurangan Emisi Gas Rumah Kaca Sektor Pertanian*, Jakarta
- Gabor, E.M., Vries, E.J.V., and Janssen, D.B., 2003, Efficient Recovery of Environmental DNA for Expression Cloning by Indirect Extraction Methods, *FEMS Microbiolgy Ecology*, 44: 153-163
- Garcia JL, Patel BKC, and Olliver B, 2000, Taxonomic, Phylogenetic and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea, *Anaerobe*, 6 : 205-226
- Harry, M., Gambier, B., Bourezgui, Y., and Garnier-Sillam, E., 1999, An Evaluation of Purification Procedures for DNA Extracted from Organic Rich Samples: Interference with Humic Substances, *J.Analisis* 27 (5) : 439-442
- Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K., and Tiedje, J.M., 1988, DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (3) : 703-711
- Kuske, C.R., Barns, S.M., and Busch, J.D., 1997, Diverse Uncultivated Bacterial Groups from Soils of The Arid Southwestern United States That Are Present in Many Geographic Regions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (9) : 3614-3621
- Marco, D.E., 2010, *Metagenomics: Theory, Methods and Applications*. Academic Press UK, h. 58-59
- Nahid, S., Yasir, S., and Ali, A., 2012, Defining Optimum Metagenomic Procedure for Microbial Diversity Analysis in Wheat Rhizosphere, *Advances in Applied Science Research*, 3 (1) : 407-411
- Ogram, A., Sayler, S., and Barkay, T., 1987, The Extraction and Purification of Microbial from Sediments, *J. Microbiological Methods*, 7 : 57-66
- Richter, D.C., 2009, Algorithms and Tools for Genome Assembly and Metagenome Analysis, *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- Robe, Patrick, Nalin, Renaud, Capellano, Carmela, Vogel, Timothy M., Simonet, Pascal, 2003, Extraction of DNA from Soil, *European Journal of Soil Biology*, 39 (2003) : 183-190
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y
- Steffan, R.J., Goksøyr, J., Bej, A.K., and Atlas, R.M., 1988, Recovery of DNA from soils and sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (12) : 2908-2915