



**KARAKTERISASI *Ralstonia solanacearum* PADA TANAMAN
PISANG DI KABUPATEN LUMAJANG MENGGUNAKAN
TEKNIK *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)**

SKRIPSI

Oleh

**Aisyah Dwi Lestari
NIM. 111510501125**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**KARAKTERISASI *Ralstonia solanacearum* PADA TANAMAN
PISANG DI KABUPATEN LUMAJANG MENGGUNAKAN
TEKNIK *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)**

SKRIPSI

Oleh

**Aisyah Dwi Lestari
NIM. 111510501125**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**KARAKTERISASI *Ralstonia solanacearum* PADA TANAMAN
PISANG DI KABUPATEN LUMAJANG MENGGUNAKAN
TEKNIK *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)**

SKRIPSI

diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk menyelesaikan
Program Sarjana pada Program Studi Agroteknologi
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh

**Aisyah Dwi Lestari
NIM. 111510501125**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

SKRIPSI

**KARAKTERISASI *Ralstonia solanacearum* PADA TANAMAN
PISANG DI KABUPATEN LUMAJANG MENGGUNAKAN
TEKNIK *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)**

Oleh

Aisyah Dwi Lestari
NIM. 111510501125

Pembimbing

Pembimbing Utama : Hardian Susilo Addy, SP., MP., PhD.
NIP : 19801109 200501 1 001

Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Hartana
NIP : -

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Karakterisasi *Ralstonia solanacearum* pada Tanaman Pisang di Kabupaten Lumajang Menggunakan Teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian pada:

Hari/Tanggal : Rabu, 12 Agustus 2015

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Hardian Susilo Addy, SP., MP., PhD.

NIP. 19801109 200501 1 001

Dr. Ir. Hartana

NIP. -

Dosen Penguji

Ir. Kacung Hariyono, MS., PhD.

NIP. 19640814 199512 1 001

Mengesahkan
Dekan,

Dr. Ir. Jani Januar, MT.

NIP. 19590102 198803 1 002

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aisyah Dwi Lestari

NIM : 111510501125

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: **Karakterisasi *Ralstonia solanacearum* pada Tanaman Pisang di Kabupaten Lumajang Menggunakan Teknik *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*** adalah benar- benar hasil karya saya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap dan etika ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Agustus 2015
Yang menyatakan,

Aisyah Dwi Lestari
NIM. 111510501125

RINGKASAN

Karakterisasi *Ralstonia solanacearum* pada Tanaman Pisang di Kabupaten Lumajang Menggunakan Teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Aisyah Dwi Lestari 111510501125. Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Penyakit layu bakteri (*blood disease bacterium*) yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman pisang di Indonesia, khususnya di Kabupaten Lumajang. Patogen ini memiliki variabilitas genetik yang luas dan kemampuannya untuk beradaptasi dengan lingkungan setempat, sehingga di alam dijumpai berbagai strain *R. solanacearum*. Munculnya strain baru memerlukan teknik diagnosis yang erat kaitannya dengan deteksi dan identifikasi. Seiring dengan perkembangan teknologi dalam bidang mikrobiologi, salah satu teknik identifikasi patogen *R. solanacearum* yang telah dikembangkan yaitu teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

Karakterisasi *R. solanacearum* pada tanaman pisang di Kabupaten Lumajang menggunakan teknik RAPD dilakukan dengan menggunakan 3 Oligonukleotida (Primer). Amplifikasi dilakukan pada kondisi 2 menit Pre-Denaturasi pada suhu 94°C, dan dilanjutkan dengan 35 siklus Denaturasi pada suhu 94°C selama 20 detik, Annealing pada suhu 30°C selama 45 detik dan Elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Pada akhir reaksi, dilakukan Elongasi akhir pada suhu 72°C selama 3 menit. Setelah terlihat amplifikasi DNA dengan munculnya keragaman pita (*band*) pada gel agarose 1,5%, dilakukan perhitungan untuk mengetahui matriks dengan metode Jaccard

Pola marka molekuler bakteri *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang bersifat polimorfisme dengan persentase 71%. Berdasarkan hasil RAPD, terdapat 4 kelompok grup berbeda pada isolat bakteri *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang. Karakterisasi *R. solanacearum* menggunakan teknik RAPD, masih perlu adanya faktor pendukung lain seperti uji ras dan biovar untuk dapat mengkarakterisasi sampai tahap strain.

SUMMARY

Characterization of *Ralstonia solanacearum* on Banana Plants in Lumajang Using *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* Technique. Aisyah Dwi Lestari 111510501125. Study Program of Agrotechnology; Faculty of Agriculture, Jember University.

Blood diseases bacterium caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the important plant disease on banana in Indonesia, especially in Lumajang. This pathogen has a broad genetic variability and ability to adapt to the local environment, so it there one various strains of *R. solanacearum* in nature. The presence of new strains requires diagnosis techniques that closed to the detection and identification. Along with technological developments in the field of microbiology, one of *R. solanacearum* pathogen identification techniques that have been developed is *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* technique.

Characterization of *R. solanacearum* in banana plants in Lumajang using RAPD techniques was performed by using three oligonucleotides (Primer). Amplification was carried out under two minutes Pre-denaturation at 94°C, and followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 20 seconds, 45 seconds annealing at 30°C and 1 minute elongation at 72°C. At the end of the reaction, final elongation carried out at 72°C for 3 minutes. after DNA Amplification seen indicated by the emergence of diversity of band on 1.5 %, calculation was started to know matrixs by using Jaccard method.

Patterns molecular markers of *R. solanacearum* in Lumajang was polymorphism with a percentage of 71 % . Based on the results of RAPD, there are 4 groups of different groups in isolates of *R. solanacearum* in Lumajang. Characterization of *R. solanacearum* using RAPD technique, still need other supporting factors such as race and biovar test to be able to characterize strain phase.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan YME atas hidayahnya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul “Karakterisasi *Ralstonia solanacearum* pada Tanaman Pisang di Kabupaten Lumajang Menggunakan Teknik *Random Amplified Polymorphic DNA (DNA)*” dapat diselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) sebagai sarjana pertanian di Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Beberapa pihak turut membantu penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Jani Januar, MT. selaku Dekan Fakultas Pertanian yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menuntut ilmu di Fakultas Pertanian Universitas Jember.
2. Ir. Raden Soedradjad, MT. selaku Dosen Pembimbing Akademik (DPA) yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa.
3. Hardian Susilo Addy, SP.,MP., PhD. selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU), Dr.Ir. Hartana , selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) dan Ir. Kacung Hariyono, MS., PhD. selaku Dosen Penguji, yang telah memberikan bimbingan, motivasi, pengarahan, ketrampilan kepada penulis selama pelaksanaan penelitian serta penyelesaian skripsi.
4. Bacteriophage team yang telah berperan sebagai penyandang dana penelitian yang penulis lakukan.
5. Kedua orang tua dan kedua adik penulis yang selalu memberikan motivasi serta doa kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian ini.
6. Serta semua pihak yang telah memberikan saran dan kontribusi sehingga proses penyelesaian skripsi dapat berjalan dengan lancar.

Akhirnya penulis berharap semoga Karya Ilmiah (Skripsi) ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan dapat digunakan sebagai acuan penelitian-penelitian selanjutnya.

Jember, Agustus 2015

Penulis



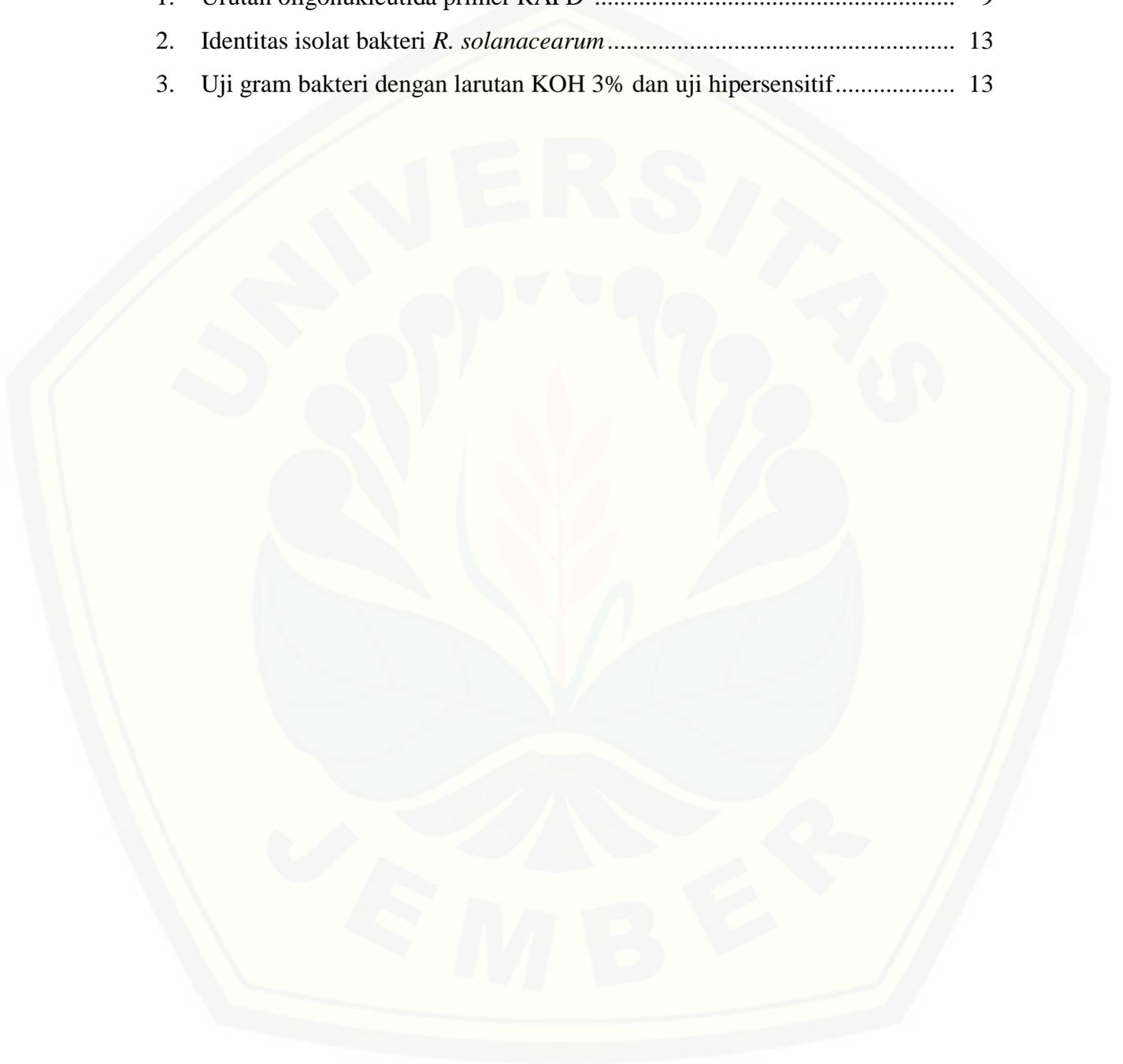
DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PEMBIMBING	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
RINGKASAN	vi
PRAKATA	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Penyakit Layu Bakteri Pada Tanaman Pisan.....	3
2.2 Karakterisasi Patogen <i>R. solanacearum</i>	4
2.3 PCR-RAPD (<i>Polymerase Chain Reaction- Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	6
III. METODE PENELITIAN	7
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	7
3.2 Penentuan Lokasi Sampel	7
3.3 Isolasi Bakteri <i>R.solanacearum</i>	7
3.4 Ekstraksi DNA Bakteri	8
3.5 Deteksi Gen Flic Menggunakan PCR	8
3.6 PCR-RAPD (16S-RAPD)	9
3.7 Visualisasi Hasil PCR	10

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	11
4.1 Hasil	11
4.1.1 Penyakit Layu Bakteri Pada Tanaman Pisang	11
4.1.2 Isolat Bakteri <i>R. solanacearum</i>	12
4.1.3 Pemberian Identitas dan Inventarisasi Isolat <i>R. solanacearum</i>	13
4.1.4 Uji gram bakteri dengan KOH 3% dan Uji Hipersensitif	13
4.1.5 PCR genom <i>R. solanacearum</i> dengan primer fliC	14
4.1.6 Keragaman genetik bakteri <i>R. solanacearum</i>	14
4.2. Pembahasan	16
V. KESIMPULAN DAN SARAN	19
5.1. Kesimpulan	19
5.1. Saran	19
DAFTAR PUSTAKA	20
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

No	Judul	Hal
1.	Urutan oligonukleutida primer RAPD	9
2.	Identitas isolat bakteri <i>R. solanacearum</i>	13
3.	Uji gram bakteri dengan larutan KOH 3% dan uji hipersensitif.....	13

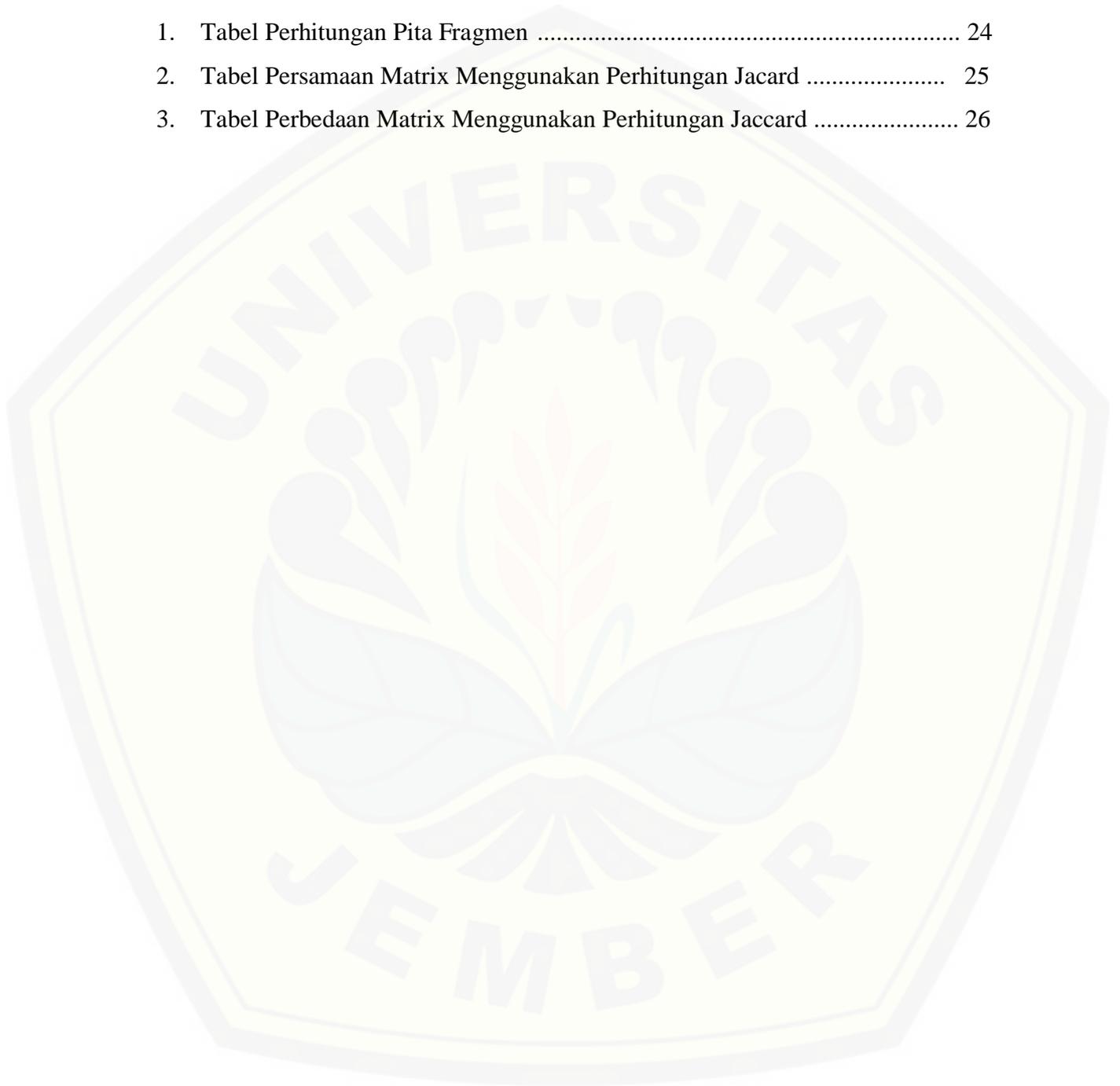


DAFTAR GAMBAR

No	Judul	Hal
1.	Gejala serangan penyakit layu bakteri pada pisang	4
2.	Gejala penyakit layu bakteri pada tanaman pisang.....	11
3.	Karakteristik pertumbuhan koloni bakteri <i>R. solanacearum</i> pada media CPG +TZC 0,01%, koloni bakteri berumur 24 jam.....	12
4.	Elektroforesis hasil PCR bakteri <i>R. solanacearum</i> menggunakan primer fliC pada 1% gel agarose.....	14
5.	Elektroforesis hasil PCR-RAPD bakteri <i>R. solanacearum</i> menggunakan primer 5 pada 1,2 % gel agarose.....	15
6.	Dendogram isolat <i>R. solanacearum</i> dengan metode Jaccard menggunakan aplikasi Dendro UPGMA.....	15

DAFTAR LAMPIRAN

No	Judul	Hal
1.	Tabel Perhitungan Pita Fragmen	24
2.	Tabel Persamaan Matrix Menggunakan Perhitungan Jacard	25
3.	Tabel Perbedaan Matrix Menggunakan Perhitungan Jaccard	26



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman pisang merupakan salah satu komoditi ekspor yang bernilai penting karena pisang memiliki beberapa keunggulan antara lain produktivitas, nilai gizi, ragam genetiknya tinggi, adaptif pada ekosistem yang luas, dan biaya produksi rendah serta telah diterima secara luas di masyarakat (Yanti, 2008). Menurut BPS (2014), bahwa Provinsi Jawa Timur merupakan salah satu penghasil pisang terbesar di Indonesia. Salah satu daerah yang menyumbang produksi pisang di Jawa Timur adalah Kabupaten Lumajang. Pada tahun 2012 produksi pisang di Jawa Timur sebesar 1,36 juta ton, sedangkan pada tahun 2013 produksi pisang di Jawa Timur sebesar 1,22 juta ton. Penurunan produksi pisang di daerah Jawa Timur disebabkan oleh beberapa faktor pembatas yaitu, produktivitas lahan, iklim, cara budidaya serta serangan hama dan penyakit. Salah satu penyakit sistemik yang berbahaya adalah serangan penyakit layu bakteri *Blood Disease Bacterium* (BDB) yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum* ras 2 (Yanti, 2008).

Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum* merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman pisang di Indonesia (Supriadi, 2011), khususnya di Kabupaten Lumajang. Patogen ini adalah salah satu spesies yang sangat kompleks. Hal ini disebabkan oleh variabilitas genetiknya yang luas dan kemampuannya untuk beradaptasi dengan lingkungan setempat, sehingga di alam dijumpai berbagai strain *R. solanacearum* dengan ciri yang sangat beragam (Hardiyanti, 2013). Munculnya strain baru memerlukan teknik diagnosis yang erat kaitannya dengan deteksi dan identifikasi. Seiring dengan perkembangan teknologi dalam bidang mikrobiologi, salah satu teknik identifikasi dan deteksi patogen *R. solanacearum* yang telah dikembangkan yaitu teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Karsinah *et al.*, 2002).

RAPD merupakan salah satu marka molekuler berbasis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman pada tingkat intraspesies maupun antarspesies. Teknik ini mendeteksi polimorfisme

ruas nukleotida pada DNA dengan menggunakan sebuah primer tunggal yang memiliki rangkaian nukleotida acak. Pada reaksi PCR-RAPD ini, sebuah primer menempel pada DNA genomik pada dua tempat berbeda dari DNA komplementer (Pharmawati, 2009). Pendekatan metode molekular dengan cara mengkarakterisasi strain menggunakan teknik tersebut telah terbukti lebih sensitif dan spesifik serta lebih cepat (Radji *et al.*, 2010). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi patogen *R. solanacearum* dengan teknik RAPD untuk mengetahui pola marka molekular dan keragaman strain isolat *R. solanacearum* yang didapat di Kabupaten Lumajang.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pola marka molekular isolat *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang?
2. Bagaimana keragaman strain isolat *R. solanacearum* dari Kabupaten Lumajang berdasarkan pola RAPD?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui pola marka molekular isolat *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang.
2. Untuk mengetahui keragaman strain isolat *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang berdasarkan pola RAPD.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang variasi genetik strain isolat *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Layu Bakteri Pada Tanaman Pisang

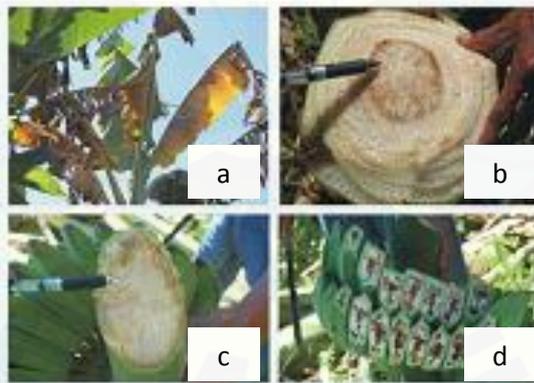
Pisang (*Musa* spp.) merupakan tanaman penting di Indonesia karena sebagian besar petani menanamnya. Petani umumnya menanam pisang dengan cara sederhana di sekitar kebun atau tempat lainnya sebagai tanaman pengisi atau sela dalam lahan kosong. Banyak juga pisang yang ditanam di pematang sawah. Petani hampir tidak mengeluarkan biaya produksi pisang. Mereka menggunakan bibit dan pupuk organik milik sendiri atau dari tetangganya. Dengan cara budidaya yang demikian, petani dapat mendapatkan pendapatan tambahan (Hadiwiyono, 2010). Terlepas dari arti penting dan potensi ekonomi pisang, akhir-akhir ini Indonesia menghadapi masalah serius dengan adanya penyakit layu pada pisang yang dapat disebabkan oleh *Blood Disease Bacterium* (BDB) yaitu patogen *Ralstonia solanacearum*.

Penyakit layu yang disebabkan oleh bakteri *R. solanacearum* merupakan salah satu penyakit yang sangat merusak tanaman, terutama tanaman pangan dan hortikultura dan secara ekonomis sangat merugikan petani (Hayward, 1994). BDB pertama dilaporkan terbatas di Sulawesi Selatan, namun sekarang patogen penyebab layu ini telah dilaporkan di 90 % provinsi di Indonesia (Subandiyah *et al.*, 2006) dan pada tingkat kebun insidens penyakit dapat mencapai lebih dari 80%, misalnya di Lombok Nusa Tenggara Barat mencapai 86,8 % (Supeno, 2002). Dalam dekade terakhir, pertanaman pisang di berbagai wilayah Indonesia juga mengalami kerusakan berat oleh penyakit ini dan kehilangan hasil diperkirakan mencapai milyaran rupiah dalam setahun. Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengendalikan penyakit layu bakteri, baik menggunakan satu atau beberapa komponen pengendalian maupun dengan menerapkan strategi pengendalian terpadu, tetapi hasilnya belum memuaskan (Machmud *et al.*, 2006).

Penyakit layu sulit dikendalikan, terutama karena patogennya memiliki kemampuan bertahan hidup dan beradaptasi dengan ekosistemnya (Hayward, 1994). *R. solanacearum* memiliki wilayah sebar hampir di seluruh dunia, terutama

di daerah tropik dan subtropik, mulai dari dataran rendah hingga dataran tinggi > 2500 meter di atas permukaan laut (m dpl). Berdasarkan kisaran inangnya, strain *R. solanacearum* dikelompokkan menjadi lima ras (Ras 1 - Ras 5) dan memiliki kisaran inang lebih dari 400 spesies tanaman yang tergolong dalam lebih dari 80 famili. Berdasarkan kemampuan menggunakan sumber nutrisi, terutama asam organik dan karbohidrat, strain *R. solanacearum* terbagi menjadi lima biovar (Biovar 1 - Biovar 5). Patogen ini juga memiliki kemampuan bertahan hidup dalam benih, dalam tanah, dan bahkan pada rizosfer tanaman bukan inang (Machmud *et al.*, 2006).

Patogen *R. solanacearum* menyerang pembuluh batang tanaman pisang melalui akar dan mengeluarkan racun hingga pembuluh tersebut mengeluarkan cairan berwarna merah darah. Tanda – tanda tanaman pisang yang terserang patogen ini adalah daun menguning dan kering yang dimulai dari pucuk. Bagi tanaman yang berbuah, akan terlihat bentuk buah tidak sempurna. Buah yang terserang jika dipotong akan keluar cairan atau getah seperti darah yang berbau busuk. Bonggol dan batang pisang yang terkena jika dipotong akan kelihatan bintik- bintik berwarna coklat kemerahan yang akhirnya kering dan tanaman menjadi mati (BPTP, 2008).



Gambar 1. Gejala serangan penyakit layu bakteri yang tampak pada daun (a), irisan bonggol (b), batang tandan (c), dan Irisan buah pisang (d).

2.2 Karakterisasi Patogen *R. solanacearum*

R. solanacearum termasuk salah satu spesies yang sangat kompleks secara fisiologi, genetik, dan ekobiologi. Kompleksitas sifat fisiologi dapat dilihat dari

adanya lima tipe ras berdasarkan kisaran inang alaminya dan lima tipe biovar berdasarkan kemampuan mengoksidasi enam sumber karbon (manitol, sorbitol, dulcitol, maltosa, laktosa, dan selobiosa, serta keragaman reaksi serologi dan pola pita protein. Kelima tipe ras tersebut adalah ras 1. inang utamanya *Solanaceae*, ras 2. *Musaceae*, ras 3. kentang, ras 4. *Zingiberaceae*, dan ras 5 arbei (Buddenhagen, 1986).

Walaupun sistem ras dan biovar banyak digunakan, tetapi belum memuaskan karena masih terjadi tumpang tindih. Misalnya, walaupun sama-sama menyerang jahe (ras 4), *R. solanacearum* dari Indonesia memiliki biovar 3 dan kisaran inangnya meliputi temu-temuan, tomat, kentang, dan beberapa gulma, termasuk *Ageratum* sp.. *R. solanacearum* ras 4 dari Malaysia memiliki tipe biovar 3 atau 4, dan hanya menyerang jahe, tomat, tembakau, dan kacang tanah. *R. solanacearum* ras 4 dari Australia, walaupun ditemukan ada dua tipe biovar (3 dan 4), hanya biovar 4 yang menyerang jahe, tomat, kentang, terung, dan beberapa jenis gulma. Keragaman *R. solanacearum* ras 4 jahe dari Indonesia, Malaysia, China, dan Australia juga terlihat pada pola pita protein dan serologinya (Supriadi, 2011). Untuk mengatasi kelemahan sistem ras dan biovar, telah diusulkan sistem filotipe (Fegan *et al.*, 2005).

Sistem filotipe juga memerhatikan sebaran geografis dan karakteristik sekuen gen yang mengendalikan enzim endoglukanase (gen *egl*) dan hipersensitivitas (gen *hrpB*) yang berperan dalam menentukan sifat virulensi dan hipersensitivitas. Melalui sistem filotipe, *R. solanacearum* dibagi ke dalam empat filotipe. Filotipe I memuat semua strain yang memiliki biovar 3, 4, dan 5 yang berasal dari Asia. Filotipe II mencakup ras 3 (kentang) dan ras 2 (pisang), serta sebagian biovar 1 dan 2 dari benua Amerika. Filotipe III mencakup biovar 1 dan 2 dari Afrika. *R. solanacearum* dari Indonesia, Australia, dan Jepang yang memiliki biovar 1 dan 2, serta *P. syzygii* yang pernah memusnahkan jutaan pohon cengkik di Jawa dan Sumatera pada tahun 1980-an termasuk ke dalam Filotipe IV. Uraian kompleksitas keragaman tersebut mengindikasikan bahwa Indonesia adalah salah satu pusat keragaman (*center of origin*) *R. solanacearum* (Supriadi, 2011).

2.3 *Polymerase Chain Reaction- Random Amplified Polymorphic DNA (PCR-RAPD)*

Perkembangan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) membuka peluang pengembangan deteksi dini keberadaan patogen-patogen meskipun mereka masih dalam jumlah populasi yang sangat sedikit sekalipun. Penggunaan PCR sebagai metode dini untuk mendiagnosis kehadiran suatu patogen telah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti (Thomsen *et al.*, 2002 dan Schmink *et al.*, 2001) demikian pula aplikasinya untuk identitas spesies telah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti salah satunya Das *et al.* (2005).

Sistem penanda RAPD merupakan penanda molekuler berbasis informasi DNA yang memanfaatkan keunggulan teknik PCR. Sistem penanda ini telah diaplikasikan secara luas untuk berbagai aplikasi mulai dari karakterisasi varietas-varietas barley, brassica, seledri, bawang, kentang dan tomat sampai karakterisasi bakteri *Lactobacillus fermentum* (Jamsari, 2008). Metode RAPD menghasilkan polimorfisme DNA yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi keanekaragaman pada individu secara langsung pada tingkat DNA (Munif *et al.*, 2004). Akan tetapi, seiring dengan intensifnya penggunaan sistem marker tersebut berbagai laporan tentang kelemahan sistem RAPD juga telah banyak dilaporkan, terutama menyangkut ketidakstabilan dan sensitifitasnya yang sangat besar. Oleh karena itu, upaya konversi sistem berbasis RAPD ke dalam sistem lain seperti SCAR atau STS telah banyak dilakukan (Jamsari, 2008).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biomolekular dan Bioteknologi *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember. Penelitian dimulai pada bulan Januari – Juli 2015.

3.2 Penentuan Lokasi Pengambilan Sampel

Penentuan lokasi ini dilakukan untuk menentukan lokasi pengambilan sampel tanaman pisang yang terserang patogen *R. solanacearum* di daerah Kabupaten Lumajang. Kegiatan ini dilakukan dengan cara mengambil sampel di setiap kecamatan yang berada di daerah Kabupaten Lumajang yang dapat mewakili populasi serangan patogen *R. solanacearum* pada tanaman pisang.

3.3 Isolasi Bakteri *R. solanacearum*

Bakteri patogen yang digunakan berasal dari areal pertanaman pisang yang terserang penyakit layu bakteri, dengan gejala layu yang disertai keluarnya cairan berwarna merah seperti darah. Bonggol pisang yang bergejala dipotong dengan ukuran 5 mm kemudian didesinfeksi menggunakan alkohol dan dicuci dengan aquadest 3 kali dan ditanam pada media CPG + TZC kemudian diinkubasi selama 24-48 jam untuk mengetahui karakteristik koloni yang virulen (Granada *et al.*, 1975). Sedangkan untuk mengetahui apakah isolat yang didapat termasuk patogen *R. solanacearum*, maka perlu dilakukan pengujian reaksi hipersensitif.

Uji reaksi hipersensitif ini dilakukan dengan cara suspensi koloni bakteri disuntikkan pada permukaan bawah daun tanaman tembakau yang berumur 2 bulan. Perkembangan gejala klorosis dan layu daun tembakau diamati sampai 48 jam (Suharjo *et al.*, 2006). Isolat memberikan respon hipersensitivitas yang sangat kuat apabila terlihat gejala yang jelas setelah 24 jam inokulasi. Sedangkan apabila gejala berkembang setelah 72 jam maka isolat tersebut termasuk lemah (Chaudhry *et al.*, 2011).

3.4 Ekstraksi DNA bakteri

Ekstraksi dilakukan dengan cara kultur bakteri disiapkan pada media cair yang berumur 24-48 jam, kemudian diambil sebanyak 1500 µl suspensi dan dipindahkan ke tube eppendorf. Sentrifugasi selama 20 menit kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C sehingga didapatkan pelet dan dihomogenkan dengan 500 µl TE buffer pH 8. Purifikasi (pemurnian) DNA, untuk menghilangkan kontaminasi dari senyawa sekunder (fenol), polisakarida, protein dan RNA dengan cara larutan pekat bakteri ditambahkan dengan PCI (*Phenol: Chloroform: Isoamyl* – 25:24:1) dengan perbandingan (1:1), lalu homogenkan dengan cara di vortex dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 60 menit. Kemudian disentrifugasi selama 15 menit kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan ditambahkan 10% sodium asetat 3M. Presipitasi (pemekatan) DNA, untuk mengumpulkan/mengendapkan DNA dilakukan dengan menggunakan etanol absolut 97% sebanyak $2,5 \times$ volume sampel, vortex hingga terlihat presipitasi DNA (seperti kapas) dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 60 menit. Setelah itu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 pada suhu 4°C, dan pelet yang terbentuk dicuci dengan 500 µl etanol 70% dihomogenkan dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit suhu 4°C. Setelah itu pelet dikering anginkan. Kemudian ditambahkan 100 µl TE buffer, dicampur hingga homogen kemudian ditambahkan RNase 5 µl inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, kemudian disimpan pada suhu -20°C. Pelet ini adalah DNA yang akan digunakan untuk PCR (Suharsono *et al.*, 2008).

3.5 Deteksi gene *fliC* menggunakan PCR

Deteksi gen *fliC* dengan teknik PCR menggunakan primer R dengan sekuensi GGC GGC CTT CAG GGA GGTC dan primer F dengan sekuensi GAA CGC CAA CGG TGC GAA CT ampikon 400 bp. Campuran standar reaksi yang digunakan dalam reaksi PCR (20 µl) terdiri atas 7 µl ddH₂O, 1 µl Primer R, 1 µl Primer F, 1 µl Template DNA, 10 µl 2× PCR mix.

Amplifikasi DNA dilakukan pada kondisi berikut (sesuai manual Protocol Intron) : Pre-Denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, Denaturasi pada suhu

94°C selama 30 detik, Annealing pada suhu 63°C selama 2 menit, Elongasi pada suhu 72°C selama 60 detik, dan Final-Elongasi pada suhu 72°C selama 10 menit dengan 25-30 siklus (Schonfeld *et al.*, 2003).

3.6 PCR-RAPD

Metode PCR-RAPD ini dilakukan dalam 30 µl campuran PCR Mix (15 µl larutan PCR Mix Solution, 1 µl DNA Template, 2 µl Primer (Tabel 1), dan 12 µl ddH₂O). Masing-masing Reaksi PCR-RAPD dilakukan menggunakan satu Oligonukleotida (Primer)

Tabel 1. Urutan oligonukleotida primer RAPD

Nama Primer	5' 3'
Primer 4	AAG AGC CCG T
Primer 5	AAC GCG CAA C
Primer 6	CCC GTC AGC A

Amplifikasi dilakukan pada kondisi 2 menit Pre-Denaturasi pada suhu 94°C, dan dilanjutkan dengan 35 siklus Denaturasi pada suhu 94°C selama 20 detik, Anealing pada suhu 30°C selama 45 detik dan Elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Pada akhir reaksi, dilakukan Elongasi akhir pada suhu 72°C selama 3 menit. Setelah terlihat amplifikasi DNA dengan munculnya keragaman pita (*band*) pada gel agarose 1,5%, dilakukan perhitungan untuk mengetahui matriks dengan metode Jaccard (Niwattanakul *et al.*, 2013). Setelah dilakukan perhitungan dengan metode Jaccard dan diketahui matriks *similarity* maka langsung dibuat *phenogram similarity* menggunakan aplikasi Dendro UPGMA untuk melihat keragaman genetik patogen *R. solanacearum*.

3.7 Visualisasi Hasil PCR

Metode ini dilakukan dengan cara menyediakan gel agarosa 1,5% yang mengandung green safe 1,5 µl, kemudian dielektroforesis dengan bufer TBE 1×. Setelah itu ditambahkan 5 µl loading genome DNA dalam sumur gel, aliri arus

listrik 50 V selama 75 menit dan di visualisasi dengan menggunakan alat UV Gel Documentation System Major Science.

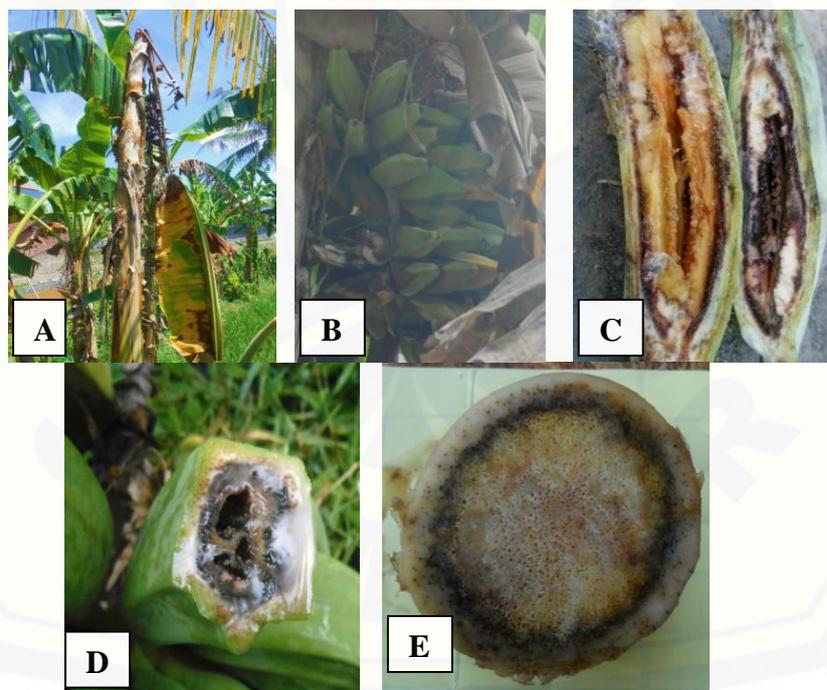


IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Pisang

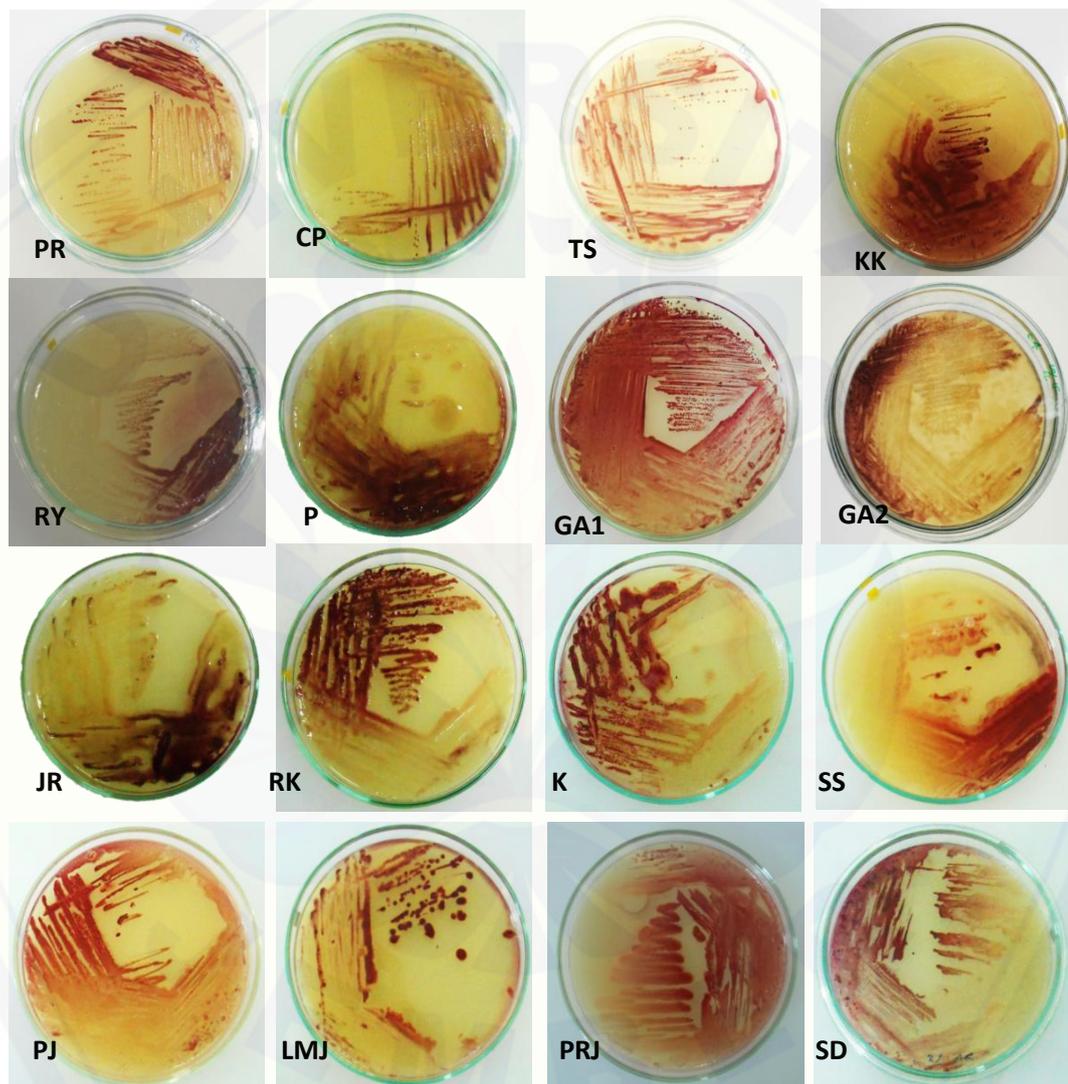
Sampel tanaman pisang diambil dari 21 kecamatan yang berada di daerah Kabupaten Lumajang, yang menunjukkan gejala penyakit layu bakteri (Gambar 2) yang sesuai dengan pendapat Alvarez *et al.* (2010), bahwa pada tanaman pisang yang terserang terdapat gejala daun menjadi menguning, layu dan jika serangan berat daun menjadi kering (Gambar 2A), pada buah jika di belah berwarna kecoklatan, rusak dan berbau busuk (Gambar 2C), dan pada bonggol pisang jika dibelah terdapat bintik-bintik berwarna kecoklatan sampai hitam pada jaringan pembuluh (Gambar 2E). Berdasarkan sampel yang telah diambil pada 21 kecamatan di Kabupaten Lumajang, telah didapatkan 3 varietas tanaman pisang yang berbeda yaitu pisang kepok (*Musa acuminata* L.), pisang ambon (*M. paradisiaca*) dan pisang raja (*M. textilia*).



Gambar 2. Gejala penyakit layu bakteri pada tanaman pisang (A) gejala tanaman pisang yang layu dan mati, (B) gejala pada buah tampak menguning, (C) gejala pada buah yang dipotong membujur, (D) gejala pada buah yang dipotong melintang, (E) gejala bonggol pisang yang terserang penyakit layu bakteri.

4.1.2 Isolat Bakteri *R. solanacearum*

Isolat bakteri *R. solanacearum* yang berhasil didapat dari isolasi pada tanaman pisang yang bergejala di Kabupaten Lumajang berjumlah 16 isolat, dan ditambah 7 isolat yang berasal dari koleksi milik Hardian Susilo Addy, SP., MP., PhD. (Laboratorium CDAST Universitas Jember), sehingga total isolat bakteri *R. solanacearum* yang digunakan berjumlah 23 isolat.



Gambar 3. Karakteristik pertumbuhan koloni bakteri *R. solanacearum* pada media CPG+TZC 0,01%, koloni bakteri berumur 24 jam.

4.1.3 Pemberian Identitas dan Inventarisasi Isolat *R. solanacearum*

Dua puluh tiga isolat bakteri *R. solanacearum* yang didapat dari dua puluh satu kecamatan di Kabupaten Lumajang diberi identitas dengan cara menyingkat

nama daerah asal isolat, hal ini dilakukan untuk mempermudah mengenali setiap isolat yang digunakan, misalnya bakteri isolat Pasirian dengan identitas PR. Isolat- isolat bakteri tersebut diinventarisasi berdasarkan identitas sebagai koleksi (Tabel 2.).

Tabel 2. Identitas isolat bakteri *R. solanacearum* asal Lumajang.

No	Asal Isolat	Identitas Isolat	No	Asal Isolat	Identitas Isolat
1	Koleksi ¹⁾	SKD	13	Gucialit	GA 1
2	Koleksi ¹⁾	YS	14	Gucialit	GA 2
3	Koleksi ¹⁾	TKG	15	Padang	P
4	Koleksi ¹⁾	TP2	16	Jatiroto	JR
5	Koleksi ¹⁾	RA2	17	Rowokangkung	RK
6	Koleksi ¹⁾	KJ2	18	Kunir	K
7	Koleksi ¹⁾	TP1	19	Pronojiwo	PJ
8	Pasirian	PR	20	Pasrujambe	PRJ
9	Tempursari	TS	21	Senduro	SD
10	Candipuro	CP	22	Lumajang	LMJ
11	Klakah	KK	23	Sumbersuko	SS
12	Ranuyoso	RY			

1) Koleksi isolat bakteri *R. solanacearum* Hardian Susilo Addy.

4.1.4 Uji Gram Bakteri dengan Larutan KOH 3% dan Uji Hipersensitif

Tabel 3. Hasil uji Gram bakteri dengan larutan KOH 3% dan uji hipersensitif pada daun tembakau.

No	Nama Isolat	Uji Gram (KOH 3%) (+/-)	Uji HR (+/-)	No	Nama Isolat	Uji Gram (KOH 3%) (+/-)	Uji HR (+/-)
1	SKD	Gram -	+	13	GA 1	Gram -	+
2	YS	Gram -	+	14	GA 2	Gram -	+
3	TKG	Gram -	+	15	P	Gram -	+
4	TP2	Gram -	+	16	JR	Gram -	+
5	RA2	Gram -	+	17	RK	Gram -	+
6	KJ2	Gram -	+	18	K	Gram -	+
7	TP2	Gram -	+	19	PJ	Gram -	+
8	PR	Gram -	+	20	PRJ	Gram -	+
9	TS	Gram -	+	21	SD	Gram -	+
10	CP	Gram -	+	22	LMJ	Gram -	+
11	KK	Gram -	+	23	SS	Gram -	+
12	RY	Gram -	+				

Hasil pengamatan 23 isolat bakteri *R. solanacearum* yang berhasil diisolasi dari bonggol tanaman pisang menunjukkan bahwa semua isolat termasuk bakteri

Gram negatif yang ditandai dengan mengentalnya kultur bakteri setelah ditetesi KOH 3% dan semua isolat juga mampu bereaksi positif pada hasil uji hipersensitif pada daun tembakau yang ditandai dengan munculnya gejala nekrosis berwarna kuning diikuti gejala layu (Tabel 3).

4.1.5 PCR fragmen *fliC* dari genom *R. solanacearum* dengan primer *fliC*

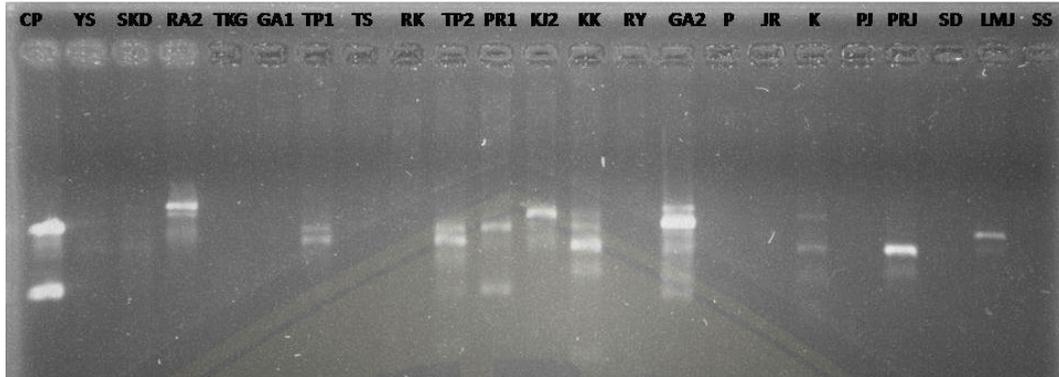
Hasil amplifikasi PCR dari genom DNA yang diduga bakteri *R. solanacearum* menggunakan primer spesifik *fliC*, menunjukkan bahwa gen target teramplifikasi pada fragmen gen *fliC* sepanjang 400 bp untuk 23 isolat yang diidentifikasi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Fatatik (2015), bahwa uji PCR bakteri *R. solanacearum* yang menggunakan primer *Rsol flic* teramplifikasi pada 400 bp (Gambar 4).



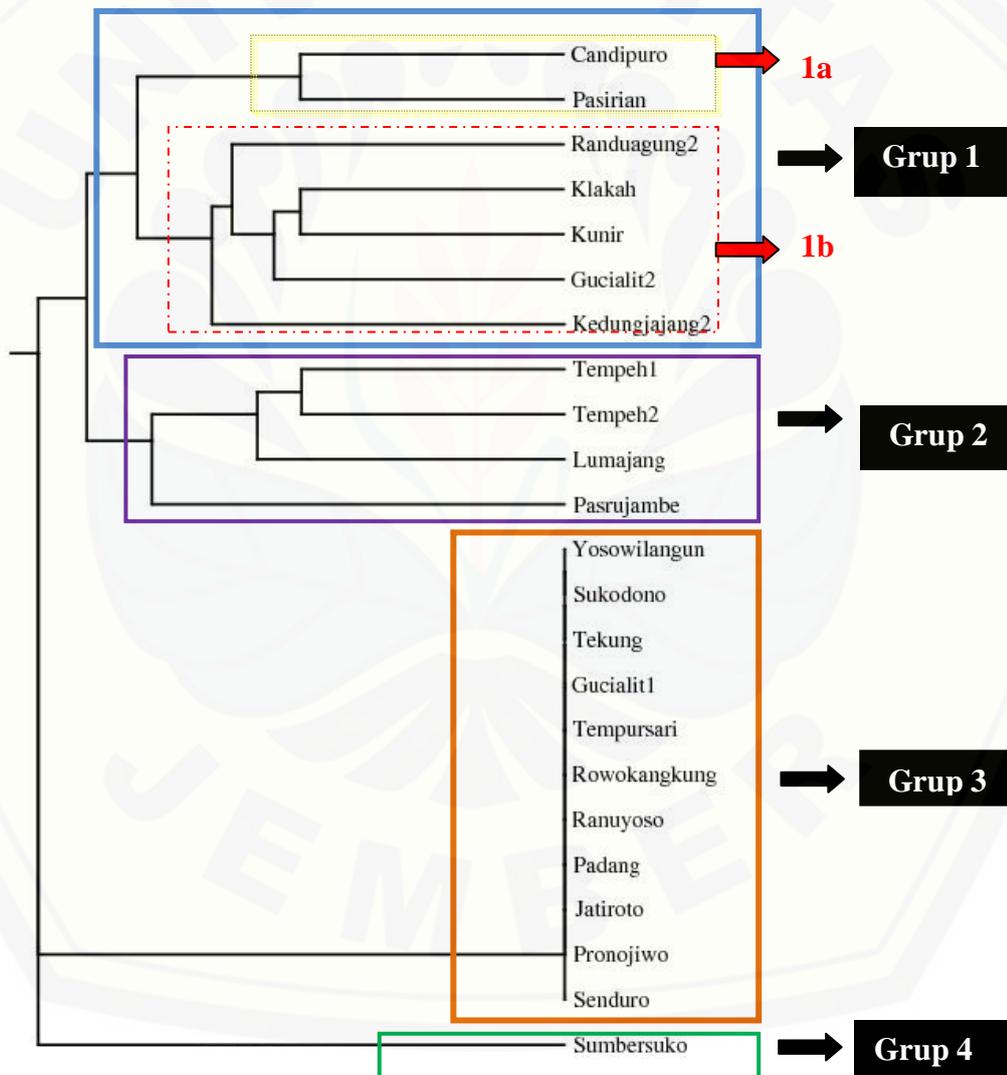
Gambar 4. Elektroforesis hasil PCR bakteri *R. solanacearum* menggunakan primer *fliC* pada 1% gel agarose.

4.1.6 Keragaman Genetik Bakteri *R. solanacearum*

Hasil PCR 23 isolat bakteri *R. solanacearum* dengan metode RAPD menunjukkan perbedaan hasil amplifikasi pita DNA menggunakan primer RAPD (Gambar 5). Berdasarkan hasil yang didapat (Gambar 5), dilakukan penilaian terhadap kemunculan fragmen pita DNA, dengan ketentuan skor 1 bila ada pita DNA dan skor 0 bila tidak ada pita. Hasil penilaian dipindahkan ke data biner yang disajikan pada lampiran, sehingga dapat diketahui tingkat persentase polimorfisnya. Hasil yang didapat tersebut merupakan hasil kualitatif, sehingga perlu dibuat pohon pologenik untuk pendukung data tersebut (Gambar 6).



Gambar 5. Elektroforesis hasil PCR-RAPD bakteri *R. solanacearum* menggunakan primer 5 pada 1,2 % gel agarose.



Gambar 6. Dendrogram isolat *R. solanacearum* dengan metode Jaccard menggunakan aplikasi Dendro UPGMA.

Dua puluh tiga isolat bakteri *R. solanacearum* yang berhasil diambil di Kabupaten Lumajang, setelah diuji dengan PCR-RAPD yang kemudian di analisis menggunakan metode Jaccard memiliki 4 kelompok grup yang berbeda (Gambar 5).

4.2 Pembahasan

Penyakit layu bakteri merupakan penyakit sistemik karena menyerang seluruh bagian tanaman. Pada tanaman pisang yang terserang terdapat gejala daun menguning, layu dan jika serangan berat daun menjadi kering (Gambar 2 A), pada buah jika di belah berwarna kecoklatan, rusak dan berbau busuk (Gambar 2 C), dan pada bonggol pisang jika dibelah terdapat bintik-bintik berwarna kecoklatan sampai hitam pada jaringan pembuluh (Gambar 2 E), hal ini didukung oleh pendapat Nasrun *et al.* (2007), bahwa munculnya gejala ini sebagai bentuk serangan dan perkembangan bakteri patogen di dalam jaringan pembuluh yang menyebabkan terjadinya penyumbatan pembuluh oleh massa bakteri patogen yang menyerang tidak merata.

Isolasi bakteri *R. solanacearum* akan lebih mudah jika menggunakan media CPG+TZC, karena media ini merupakan media spesifik untuk menumbuhkan bakteri *R. solanacearum*. Hal ini didukung dengan pendapat Chandrashekara *et al.* (2012), bahwa patogen *R. solanacearum* saat ditumbuhkan pada media CPG+TZC koloni akan berwarna merah jambu pada bagian tengah dan putih keruh pada bagian tepi sebagai penanda tingkat virulensinya berbentuk cembung mengkilat, fluidal, (Gambar 3). Hal ini sesuai dengan yang dilakukan Aini (2007), bahwa koloni bakteri *R. solanacearum* akan berwarna merah jambu pada media CPG+TZC.

Semua isolat diketahui Gram negatif (Tabel 3) ditandai dengan terbentuknya gumpalan saat direaksikan dengan larutan KOH 3%. Hal ini didukung oleh pendapat Suwanda (2008), bahwa bakteri *R. solanacearum* termasuk dalam Gram negatif karena suspensinya akan berubah menjadi menggumpal, lengket dan terangkat seperti benang bersama jarum ose setelah ditetesi larutan KOH 3%. Kristian *et al.* (2009), menyatakan bahwa terbentuknya gumpalan pada bakteri

Gram negatif karena dinding sel bakteri Gram negatif lebih sensitif dibandingkan Gram positif sehingga dinding sel pecah, dan DNA dapat terbebaskan yang menyebabkan terbentuknya benang lendir. Isolat bakteri terbukti menunjukkan hasil positif pada uji hipersensitifitas pada daun tembakau (Tabel 3). Reaksi positif ini ditunjukkan dengan munculnya gejala nekrotik setelah diinokulasi dengan suspensi bakteri. Hal ini sesuai dengan pendapat Lelliot *et al.* (1987), bahwa bakteri *R. solanacearum* akan menunjukkan hasil positif pada uji hipersensitifitas karena terjadinya gejala nekrotik pada daun tembakau yang diinfiltrasi.

Dua puluh tiga isolat yang diduga bakteri *R. solanacearum* telah diuji menggunakan PCR dengan primer *fliC*, dan gen target dapat teramplifikasi pada ukuran 400bp. Hal ini sesuai dengan pendapat Schonfeld *et al.* (2003), bahwa penggunaan primer *fliC* dilakukan untuk mendeteksi adanya pita fragmen DNA *R. solanacearum* yang menyandakan gen *fliC* dengan ukuran 400 bp. Menurut Dwiwitno (2010), seperti aplikasi PCR pada umumnya, keberhasilan amplifikasi PCR sangat ditentukan oleh spesifikasi primer yang digunakan. Selain itu, menurut Khaeruni *et al.* (2007), pemanasan pada suhu 100°C sebelum reaksi PCR juga berpengaruh, karena untuk menghilangkan senyawa- senyawa inhibitor yang dapat mengganggu reaksi PCR.

Semua isolat bakteri *R. solanacearum* yang telah diambil di 21 kecamatan di Kabupaten Lumajang setelah di uji dengan metode RAPD, dapat diketahui bahwa terdapat 4 grup bakteri *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang yang menyerang tanaman pisang. Kemudian, jika dikaitkan dengan fisiologis tanaman dan faktor lingkungan ternyata hasilnya sesuai dengan pengujian menggunakan metode RAPD. Hal ini dapat dilihat pada pohon filogenetik untuk grup 1 dan grup 2, masing- masing memiliki kesamaan pada tipe gejala serangan pada bonggol pisang dan gejala nekrotik pada uji hipersensitif. dan untuk grup 3 memiliki kesamaan pada faktor lingkungan dan varietas tanaman inang, sedangkan untuk grup 4 memiliki kesamaan pada faktor lingkungan saja. Hal ini didukung oleh pendapat Djatmiko *et al.* (2011), bahwa beragamnya genetik di lapangan disebabkan karena adanya perbedaan sifat fisiologis tanaman maupun

faktor lingkungan (suhu dan kelembaban). Selain itu keragaman genetik bakteri *R. solanacearum* juga dapat dilihat dengan adanya perbedaan fragmen yang dapat teramplifikasi pada beberapa isolat, sehingga akan didapatkan hasil yang berbeda saat dilakukan perhitungan menggunakan metode Jaccard.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer yang digunakan mampu menghasilkan pita amplifikasi genom DNA *R. solanacearum* yang didapat di Kabupaten Lumajang, yang setelah dilakukan penilaian didapatkan variasi genetik pada profil DNA isolat (Gambar 5). Variasi tersebut dapat dilihat dari perbedaan jumlah fragmen, ukuran fragmen, jumlah pita polimorfik dan persentase polimorfik seperti yang tampak pada lampiran. 23 isolat yang telah didapat dari Kabupaten Lumajang, dapat diketahui memiliki persentase polimorfik sebesar 71%. Menurut Yusron (2005), bahwa populasi yang memiliki persentase polimorfisme yang tinggi memiliki peluang hidup yang lebih baik. Hal ini disebabkan setiap gen memiliki respon yang berbeda-beda terhadap kondisi lingkungan.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Persentase polimorfisme dari 23 isolat *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang sebesar 71%.
2. Dendrogram menunjukkan, terdapat 4 grup berbeda pada isolat bakteri *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji ras dan biovar pada patogen *R. solanacearum* untuk mendukung hasil dari dendrogram yang telah didapat.

DAFTAR PUSTAKA

- Aini, E.N. 2007. Efektifitas Beberapa Isolat *Bacillus* spp. dalam Menghambat *Ralstonia solanacearum* pada Cabai. *Skripsi*. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
- Alvarez, B., E.G. Biosca, and M.M. Lopez. 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*.
- BPS. 2014. *Produksi Buah-buahan Menurut Provinsi Tahun 2012 dan 2013*. Jakarta.
- BPTP. 2008. *Pedoman Pencegahan Penyakit Darah Pisang*. Sulawesi Tengah: Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Buddenhagen, I.W. 1986. Bacterial wilt revisited. In G.J. Persley (Ed.). Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, the Philippines, October 1985. *ACIAR Proceedings* 13: 126143.
- Chandrashekara, K.N., M.K.P. Kumar, and S. Saroja. 2012. Aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* isolates on tomato. *Experimental Sciences*, 3(9): 5-9.
- Chaudhry, Z., dan H. Rashid. 2011. Isolation and characterization of *Ralstonia solanacearum* from infected tomato plants of soan skesar valley of Punjab. *Pak. J. Bot* 43(6): 2979- 2985.
- Das, M., Bhattacharya, S. and A. Pal. 2005. Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing RAPD products: A strategy for species-specific marker development in bamboo. *Annals of Botany* 95: 835-841.
- Djatmiko, H.A., B. Prakoso., and N. Prihatiningsih. 2011. Penentuan patotipe dan keragaman genetik *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada tanaman padi di wilayah karesidenan Banyumas. *J. HPT Tropika* 11(1): 35-46.
- Dwiyitno. 2010. Identifikasi bakteri patogen pada produk perikanan dengan teknik molekuler. *Squalen*, 5(2): 67-78.
- Fatatik, N. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag yang Menginfeksi Bakteri *Ralstonia solanacearum* pada Pisang Asal Kabupaten Lumajang. *Skripsi*. Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

- Fegan, M. and P. Prior. 2005. *How complex is the Ralstonia solanacearum species complex? In C. Allen, P. Prior, and A.C. Hayward (Eds.). p. 449-461. Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex.* The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Granada, G.A., dan L. Sequerira . 1975. Hypersensitivity reaction induced in tobacco leaves by a compatible (race 1) isolate of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 65: 731-733.
- Hadiwiyono. 2010. Insidensi penyakit layu bakteri darah dan layu fusarium pisang di Sambung Macan Sragen dan Tawangmangu Karanganyar. *Agrosains* 12 (1): 19-23.
- Hardiyanti,S. 2013. *Pengendalian Ralstonia solanacearum*. <http://hardiyanti1992.blogspot.com/2013/01/pengendalianralstoniasolanacearum.html>. Diakses pada tanggal 13 Agustus 2014.
- Hayward, A.C. 1994. *Hosts of P. solanacearum, pp. 9-21. In A.C. Hayward and G.L. Hartman (Eds.) Bacterial wilt: The disease and its causative agent, P. solanacearum.* CAB International, Wallingford, UK.
- Jamsari. 2008. Preparasi DNA spesies *Colletotricum* sp. dan spesifitas sistem fingerprinting RAPD. *J. Natur Indonesia*, 11(1): 31-39.
- Karsinah, Sudarsono, L. Setyobudi, dan H. Aswidinnoor. 2002. Keragaman genetik plasma nutfah berdasarkan analisis penanda RAPD. *Biologi Pertanian* 7(1): 8-16.
- Khaeruni, A. A., Suwanto, B. Tjahjono, dan M.S. Sinaga. Deteksi cepat penyakit pustul bakteri pada kedelai menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik. *HAYATI Journal of Biosciences*, 14(1): 76-80.
- Kristian, P., E. Zubaidah, dan E. Saprianti. 2009. Isolasi bakteri asam laktat dari sayur kubis yang memiliki kemampuan penghambatan bakteri patogen (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella thypimurium*). *Teknologi Pertanian* 10(1): 19-27.
- Lelliot, R.A., and D.E. Stead. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseses of plants.* Oxford: Blackwell Sci. Publ.
- Machmud, M., and Y. Suryadi. 2006. Deteksi dan identifikasi strain *Ralstonia solanacearum* dengan teknik ELISA tidak langsung. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 25 (2): 91-99.

- Munif, A., M. Sudomo, S. Soelaksono, R. Maelita, and D.P. Agus. 2004. Polimorfisme genetik dari *Anopheles barbirostris* kaitannya dengan prevalensi malaria di kecamatan Cineam, Kabupaten Tasikmalaya. *Bul. Panel Kesehatan*, 32(1): 1-16.
- Nasrun, Christanti, T. Arwiyanto, dan I. Mariska. 2007. Karakteristik fisiologis *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri nilam. *Jurnal Litri*, 13(2): 43-48.
- Niwattanakul S., J. Singthongchai, E. Naenudorn, and S. Wanapu. 2013. Using of jaccard coefficient for keyword similarity. *Proceedings of the International Multi Conference of Engineers and Computer Scientists* (1) IMECS 2013.
- Fatatik, N. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag yang Menginfeksi Bakteri *Ralstonia solanacearum* pada Pisang Asal Kabupaten Lumajang. *Skripsi*. Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. (PROTEACEAE). *Biologi* 8(1): 12-16.
- Radji, M., A. Puspaningrum, dan A. Sumiati. 2010. Deteksi cepat bakteri *Escherichia coli* dalam sampel air dengan metode PCR menggunakan primer 16EI dan 16E2. *Makara SAINS* 14(1): 39-43.
- Schmink, S., Reeves, M.W, Plikaytis, B., and Popovic. T. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA assay as a rapid tool in screening for neisseria meningitidis serogroup C isolates of electrophoretic type 24. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1622–1625.
- Schonfeld J., H. Heuer, J.D. Van Elsas, and K. Smalla. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragment. *Appl Environ Microbiol* 63(12): 7248-7256.
- Subandiyah, S., Hadiwiyono., E. Nur, A. Wibowo, M. Fegan, and P. Taylor. 2006. Survival of blood disease bacterium of banana in soil. p.76-77 in: *Proceeding of the 11st International conference on Plant Pathogenic bacteria*. 10th to 14th July 2006. Royal College of Physicians of Edinburgh, Edinburgh, Scotland United Kingdom.
- Suharjo, R., E Martono, dan S. Subandiyah. 2006. Potensi *Erionta thrax* sebagai agen penyebar patogen penyebab penyakit layu bakteri pada tanaman pisang (*Blood Disease Bacterium*). *HPT. Tropika* 6(2): 100-106.
- Suharsono, dan U. Widyastuti. 2008. *Penuntun praktikum; pengantar genetika molekuler*. Departemen Biologi-FMIPA. Institut Pertanian Bogor.

- Supeno, B. 2002. Isolasi dan karakterisasi penyakit darah pisang di Lombok. Dalam: A. Purwantoro, D. Sitepu, I. Mustika, K. Mulya, M.S. Sudjono, M. Mahmud, S.H. Hidayat, Supriadi, Widodo (Penyunting). *Prosiding Kongres XVI dan Seminar Nasional Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*. Jurusan Hama & Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian IPB & PFI, Bogor, p:31-33.
- Supriadi. 2011. Penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*): Dampak, bioekologi, dan peranan teknologi pengendaliannya. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 4(4): 279-293.
- Suwanda. 2008. *Pedoman Diagnosis Golongan Bakteri OPTK*. Jakarta: Departemen Pertanian Badan Karantina Pertanian.
- Thomsen, L., and Jensen, A.B. 2002. Application of nested PCR technique to resting spores from the entomophthora muscae species complex: implications for analyses of hostpathogen population interactions. *Mycologia*, 94: 794– 802.
- Yanti, Y. 2008. Aktivitas peroksidase mutan pisang kepok dengan Ethyl Methane Sulphonate (EMS) secara in vitro. *Natur Indonesia* 14(1): 32-36.
- Yusron, E. 2005. Pemanfaatan keragaman genetik dalam pengelolaan sumberdaya hayati laut. *Oseana*, 30(2):29-34.