

PERTANIAN

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

Characterization of Ralstonia solanacearum on Banana Plants in Lumajang Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technique

Aisyah Dwi Lestari¹, Hardian Susilo Addy^{2*}, Hartana¹

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember

²Laboratorium Divisi Molekular Biologi dan Bioteknologi *Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST)*
Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto, Jember 68121

*E-mail: hsaddy.faperta@unej.ac.id

ABSTRACT

Blood disease bacterium caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the important diseases in banana plants in Indonesia, especially in Lumajang Regency. This pathogen has a broad genetic variability and its ability to adapt to the local environment. 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 Regency used RAPD technique was conducted using 3 oligonucleotides (Primer). Amplification was carried at 35 cycles of denaturation at a temperature of 94°C for 20 seconds, annealing at a temperature of 30°C for 45 seconds and Elongation at 72°C temperature for 1 minute. At the end of the reaction, final elongation was carried out at a temperature of 72°C for 3 minutes. After the appearance of DNA amplification, calculation was made to identify the matrix by Jaccard method. Patterns of molecular markers of *R. solanacearum* bacteria in Lumajang Regency were polymorphic with the percentage of 71%, and dendrogram showed that there were 4 different groups in isolates of *R. solanacearum* in Lumajang.

Keywords: mapping; Blood disease bacterium; *R. solanacearum*; *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*.

ABSTRAK

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. 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 dengan menggunakan teknik RAPD dilakukan dengan menggunakan 3 Oligonukleotida (Primer). Amplifikasi dilakukan pada 35 siklus dengan kondisi 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 suhu 72°C selama 3 menit. Setelah terlihat amplifikasi DNA, dilakukan perhitungan untuk mengetahui matriks dengan metode Jaccard. Pola marka molekuler bakteri *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang bersifat polimorfisme dengan persentase 71%, dan dendrogram menunjukkan, terdapat 4 grup berbeda pada isolat *R. solanacearum* di Kabupaten Lumajang.

Kata kunci: pemetaan; Penyakit layu bakteri; *R. solanacearum*; *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*.

How to cite: Lestari AL, HS Addy and Hartana. 2015. Karakterisasi *Ralstonia solanacearum* pada Tanaman Pisang di Kabupaten Lumajang Menggunakan Teknik *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*. *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1): xx-xx

PENDAHULUAN

Tanaman pisang merupakan salah satu komoditi ekspor yang bernilai penting karena pisang memiliki beberapa keunggulan antara lain produktivitas, nilai gizi, dan 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 variabilitas genetiknya luas sehingga di alam dijumpai berbagai strain *R. solanacearum* dengan ciri yang sangat beragam. 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 intraspecies maupun antarspecies (Pharmawati, 2009). 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.

BAHAN DAN METODE

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

Penentuan Lokasi Pengambilan Sampel. Penentuan lokasi 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.

Isolasi Bakteri *R. solanacearum*. Bonggol pisang yang bergejala dipotong dengan ukuran 5 mm kemudian didesinfeksi menggunakan alkohol dan dicuci dengan aquadest 3 kali kemudian ditanam pada media CPG+TZC, diinkubasi selama 24-48 jam. Setelah itu dilakukan pengujian reaksi hipersensitif menurut Suharjo et al. (2006).

Ekstraksi DNA Bakteri. Ekstraksi dilakukan dengan cara kultur bakteri pada media cair yang berumur 24-48 jam, diambil sebanyak 1500 µl suspensi dan dipindahkan ke tube eppendorf. Sentrifugasi selama 20 menit kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C dihomogenkan dengan 500 µl TE buffer pH 8. 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. Ditambahkan etanol absolut 97% sebanyak 2,5 × 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 rpm 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).

Deteksi gen *fliC* menggunakan PCR. Deteksi gen *fliC* dengan teknik PCR menggunakan primer *fliC* dengan amplicon 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 2x 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).

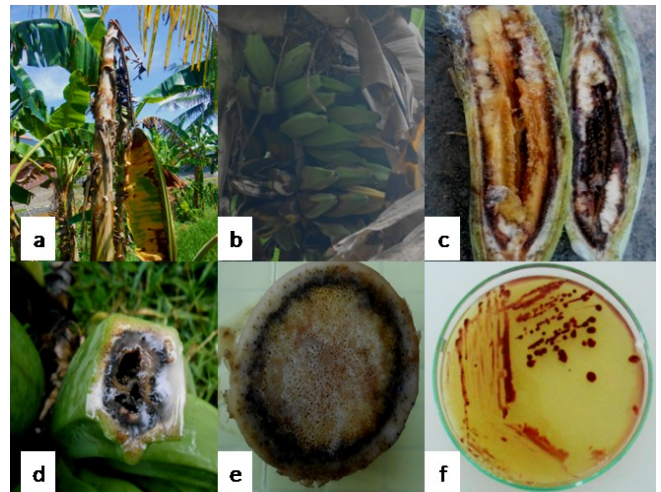
PCR-RAPD. Metode PCR-RAPD ini dilakukan dalam 30 µl campuran PCR Mix (15 µl larutan PCR Mix Solution, 1 µl

DNA Template, 2 µl Primer, dan 12 µl ddHO). Amplifikasi dilakukan 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. Setelah itu dilakukan perhitungan dengan metode Jaccard kemudian dibuat *phenogram similarity* menggunakan aplikasi Dendro UPGMA untuk melihat keragaman genetik patogen *R. solanacearum*.

Visualisasi Hasil PCR. Metode ini dilakukan dengan cara menyediakan gel agarosa 1,5%, kemudian dielektroforesis dengan bufer TBE 1 x. 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.

HASIL

Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Pisang dan Isolat Bakteri *R. solanacearum*. Sampel tanaman pisang diambil dari 21 kecamatan yang berada di daerah Kabupaten Lumajang, yang menunjukkan gejala penyakit layu bakteri. 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 Hardian Susilo Addy, SP., MP., PhD. (Laboratorium CDAST Universitas Jember) (Gambar 1F).

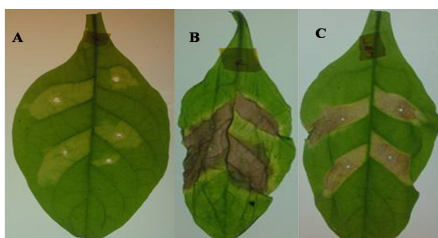


Gambar 1. Gejala penyakit layu bakteri pada tanaman pisang (A) gejala tanaman pisang yang layu dan mati, (B) gejala pada buah tampak menguning, (C) gejala pada buah yang dipotong membujur, (D) gejala pada buah yang dipotong melintang, (E) gejala bonggol pisang yang terserang penyakit layu bakteri, (F) Karakteristik pertumbuhan koloni bakteri *R. solanacearum* pada media CPG +TZC 0,01%, koloni bakteri berumur 24 jam.

Uji Gram Bakteri dengan Larutan KOH 3% dan Uji Hipersensitif. 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. Isolat- isolat bakteri tersebut diinventarisasi berdasarkan identitas sebagai koleksi (Tabel 1.). Hasil pengamatan 23 isolat bakteri *R. solanacearum* menunjukkan bahwa semua isolat termasuk bakteri Gram negatif yang ditandai dengan mengentalnya kultur bakteri setelah ditetes KOH 3% dan semua isolat juga mampu bereaksi positif pada hasil uji hipersensitif (Tabel 1). Pada daun tembakau yang di uji hipersensitif terdapat 3 tipe gejala hipersensitif yang berbeda. Tipe 1 memiliki gejala daun mengalami klorosis. Tipe 2 memiliki gejala adanya nekrotik pada daun dikelilingi warna kuning, sedangkan untuk tipe 3, daun hanya mengalami nekrotik (Gambar 2).

Tabel 1. Hasil uji gram bakteri dengan larutan KOH 3% dan uji hipersensitif

No	Nama Isolat	Uji Gram (+/-)	Uji HR (+/-)	Tipe Gejala Uji HR	No	Nama Isolat	Uji Gram (+/-)	Uji HR (+/-)	Tipe Gejala Uji HR
1	SKD	Gram -	+	A	13	GA1	Gram -	+	B
2	YS	Gram -	+	A	14	GA2	Gram -	+	B
3	TKG	Gram -	+	A	15	P	Gram -	+	A
4	TP2	Gram -	+	C	16	JR	Gram -	+	A
5	RA2	Gram -	+	B	17	RK	Gram -	+	C
6	KJ2	Gram -	+	B	18	K	Gram -	+	B
7	TP1	Gram -	+	C	19	PJ	Gram -	+	A
8	PR	Gram -	+	A	20	PRJ	Gram -	+	C
9	TS	Gram -	+	A	21	SD	Gram -	+	B
10	CP	Gram -	+	A	22	LMJ	Gram -	+	C
11	KK	Gram -	+	B	23	SS	Gram -	+	A
12	RY	Gram -	+	B					



Gambar 2. Reaksi positif uji hipersensitif (A) Gejala 1, (B) Gejala 2, (C) Gejala 3

Klimatologi Kabupaten Lumajang dan Varietas Tanaman Pisang yang didapat di Kabupaten Lumajang.

Tabel 2. *Klimatologi Kabupaten Lumajang dan varietas tanaman pisang yang didapat di Kabupaten Lumajang.*

No	Asal Isolat	Nama Isolat	Klimatologi ²⁾	Varietas Pisang
1	Sukodono ¹⁾	SKD	Iklm Sedang	P. Kepok (<i>Musa acuminata</i>)
2	Yosowilangun ¹⁾	YS	Iklm Kering	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
3	Tekung ¹⁾	TKG	Iklm Kering	P. Raja (<i>M. textilia</i>)
4	Tempeh 2 ¹⁾	TP2	Iklm Kering	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
5	Randuagung 2 ¹⁾	RA2	Iklm Sedang	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
6	Kedungjajang 2 ¹⁾	KJ2	Iklm Sedang	P. Raja (<i>M. textilia</i>)
7	Tempeh 2 ¹⁾	TP1	Iklm Kering	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
8	Pasirian	PR	Iklm Basah	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
9	Tempursari	TS	Iklm Sedang	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
10	Candipuro	CP	Iklm Basah	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
11	Klakah	KK	Iklm Sedang	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
12	Ranuyoso	RY	Iklm Sedang	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
13	Gucialit	GA1	Iklm Basah	P. Raja (<i>M. textilia</i>)
14	Gucialit	GA2	Iklm Basah	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
15	Padang	P	Iklm Sedang	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
16	Jatiroto	JR	Iklm Sedang	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
17	Rowokangkung	RK	Iklm Sedang	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
18	Kunir	K	Iklm Kering	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
19	Pronojiwo	PJ	Iklm Basah	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
20	Pasrujambe	PRJ	Iklm Basah	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
21	Senduro	SD	Iklm Basah	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
22	Lumajang	LMJ	Iklm Sedang	P. Kepok (<i>M. acuminata</i>)
23	Sumbersuko	SS	Iklm Sedang	P. Ambon (<i>M. paradisiaca</i>)

1. Koleksi isolat bakteri *R. Solanacearum* Hardian Susilo Addy, SP., MP., PhD

2. Badan Pusat Statistik Kabupaten Lumajang

Kabupaten Lumajang memiliki 3 tipe iklim yang berbeda, yaitu tipe iklim basah, sedang dan kering (Tabel 2). Sampel yang telah diambil pada 21 kecamatan di Kabupaten Lumajang, telah didapatkan 3 varietas tanaman pisang, yaitu pisang kepok (*Musa acuminata* L.), pisang ambon (*M. paradisiaca*) dan pisang raja (*M. textilia*) (Tabel 2).

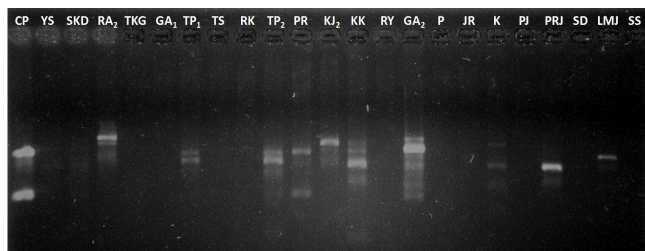
PCR genom *R. solanacearum* dengan primer *fliC*. Hasil amplifikasi PCR dari genom DNA yang diduga bakteri *R. solanacearum* menggunakan primer spesifik *fliC*, menunjukkan bahwa gen target teramplifikasi pada fragmen gen *fliC* sepanjang 400 bp untuk 23 isolat yang diidentifikasi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Fatatik (2015), bahwa uji PCR bakteri *R. solanacearum* yang menggunakan primer *Rsol flic* teramplifikasi pada 400 bp (Gambar 3).



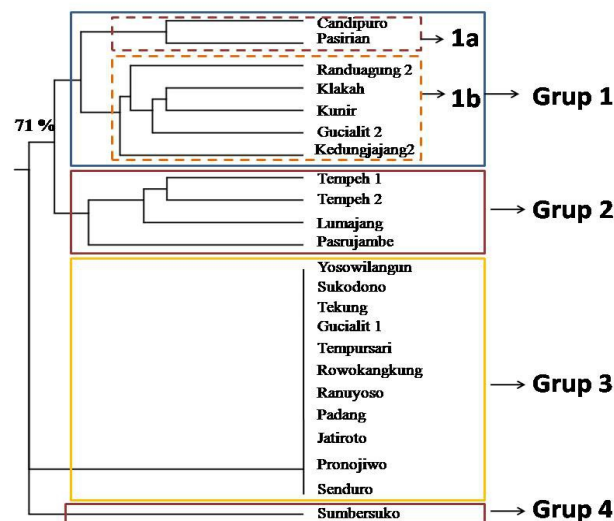
Gambar 3. Elektroforesis hasil PCR bakteri *R. solanacearum* menggunakan primer *fliC* pada 1% gel agarose.

Keragaman Genetik Bakteri *R. solanacearum*. Hasil PCR-RAPD 23 isolat bakteri *R. solanacearum* menunjukkan perbedaan hasil amplifikasi pita DNA menggunakan primer 4,5 dan 6 (Gambar 4A), Berdasarkan hasil yang telah didapat, 23 isolat bakteri *R. solanacearum* yang diambil di Kabupaten Lumajang memiliki 4 kelompok grup berbeda setelah di analisis menggunakan metode Jaccard (Gambar 4B).

A



B



Gambar 4. (A) Elektroforesis hasil PCR-RAPD bakteri *R. solanacearum* menggunakan primer 5 pada 1,2 % gel agarose, (B) Dendrogram Isolat *R. solanacearum* dengan metode jaccard menggunakan aplikasi Dendro UPGMA.

PEMBAHASAN

Penyakit layu bakteri yang menyerang tanaman pisang menunjukkan gejala daun menguning, layu dan jika serangan berat daun menjadi kering (Gambar 1A), pada buah jika di belah berwarna kecoklatan, rusak dan berbau busuk (Gambar 1C), dan pada bonggol pisang jika dibelah terdapat bintik-bintik berwarna kecoklatan sampai hitam pada jaringan pembuluh (Gambar 1E), hal ini didukung oleh pendapat Alvarez *et al.* (2010) bahwa serangan patogen *R. solanacearum* menyebabkan gejala layu, daun menguning, bonggol jika dibelah terdapat bintik-bintik berwarna merah kecoklatan. Isolasi 23 isolat bakteri menggunakan media CPG+TZC memiliki karakteristik koloni berwarna merah jambu, berbentuk cembung dan fluidal (Gambar 1F). 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 1) ditandai dengan terbentuknya gumpalan saat direaksikan dengan larutan KOH 3%. Hal ini didukung oleh pendapat Suwanda (2008), bahwa bakteri *R. solanacearum* termasuk gram negatif apabila suspensi berubah menjadi menggumpal, lengket dan terangkat seperti benang bersama jarum ose. Isolat bakteri terbukti menunjukkan hasil positif pada uji hipersensitifitas pada daun tembakau (Tabel 1). Reaksi positif ditunjukkan dengan munculnya gejala nekrotik setelah diinokulasi dengan suspensi bakteri. Hal ini sesuai dengan pendapat Lelliot *et al.* (1987), bahwa hasil positif pada uji hipersensitifitas terjadi apabila terdapat 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 menyandikan gen *fliC* dengan ukuran 400 bp. 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 (Tidak ditampilkan) 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 (Tabel 1). dan untuk grup 3 memiliki kesamaan pada faktor lingkungan dan varietas tanaman inang (Tabel 2), sedangkan untuk grup 4 memiliki kesamaan pada faktor lingkungan. 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). Menurut Bahagiawati *et al.* (2005), bahwa teknik RAPD dapat membedakan spesies sampai tingkat strain atau pathovar yang berbeda.

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 3A). Variasi tersebut dapat dilihat dari perbedaan jumlah fragmen, ukuran fragmen, jumlah pita polimorfik dan persentase similaritas (Gambar 4). Sebanyak 23 isolat yang telah didapat dari Kabupaten Lumajang, dapat diketahui memiliki persentase polimorfik sebesar 71% (Gambar 4B). Menurut Anggereini (2008), bahwa identifikasi polimorfisme DNA digunakan sebagai penanda genetik untuk membedakan populasi dan menentukan hubungan kekerabatan pada suatu spesies. Semakin tinggi persentase polimorfisme, maka semakin dekat kekerabatan suatu spesies.

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.

DAFTAR PUSTAKA

- Aini EN. 2007. Efektifitas beberapa isolat *Bacillus* spp. Dalam menghambat *Ralstonia solanacearum* pada cabai. *Skripsi*. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
- Alvarez B, EG Biosca, MM 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*.
- Anggereini E. 2008. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*, suatu metode analisis DNA dalam menjelaskan berbagai fenomena biologi. *Biospecies*, 1(2): 73-76.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Lumajang. 2014. *Kabupaten Lumajang Dalam Angka*. Lumajang.
- Bahagiawati, H Rijzaani. 2005. Pengelompokan biotipe wereng coklat berdasarkan hasil PCR-RAPD. *Hayati*, 12(1): 1-6.
- BPS. 2014. *Produksi Buah-buahan Menurut Provinsi Tahun 2012 dan 2013*. Jakarta.
- Djatmiko HA, B Prakoso, N Prihatiningsih. 2011. Penentuan patotipe dan keragaman genetik *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada tanaman padi di wilayah keresidenan Banyumas. *J. HPT Tropika* 11(1): 35-46.
- 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.
- Karsinah, Sudarsono, L Setyobudi, H Aswidinnoor. 2002. Keragaman genetik plasma nutfah berdasarkan analisis penanda RAPD. *Biologi Pertanian* 7(1): 8-16.
- Kristian P, E Zubaidah, E Saparianti. 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 RA, DE Stead. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of plants*. Oxford: Blackwell Sci. Publ.
- Pharmawati M. 2009. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. (PROTEACEAE). *Biologi* 8(1): 12-16.

- Schonfeld J, H Heuer, JD Van Elsas, 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.
- Suharjo R, E Martono, 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, U Widyastuti. 2008. *Penuntun Praktikum; Pengantar Genetika Molekuler*. Departemen Biologi-FMIPA. Institut Pertanian Bogor.
- 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.
- 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.