

KERAGAMAN GENETIK ISOLAT *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* DARI KABUPATEN JENEPONTO DAN PANGKEP



**OLEH :
ANDI FAISAL
H41101024**



UNIVERSITAS HASANUDDIN	
Tgl. Terima	27-1-06
Astid/Dis	Fale. Mipa
Banyak	1 (satu) ek
Harga	H
No. Inventaris	479/27-1-06
No. Klas	

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2005**

SKRIPSI

OLEH :
ANDI FAISAL
H41101024

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2005

**Keragaman Genetik Isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dari
Kabupaten Jeneponto dan Pangkep**

**OLEH :
ANDI FAISAL
H41101024**

*SKRIPSI INI DIBUAT UNTUK MELENGKAPI TUGAS DAN MEMENUHI SYARAT UNTUK
MEMPEROLEH GELAR SARJANA SAINS BIOLOGI*

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2005**

HALAMAN PENGESAHAN

Keragaman Genetik Isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dari Kabupaten Jeneponto dan Pangkep

OLEH :
ANDI FAISAL
H41101024

Disetujui oleh
Pembimbing Utama


(Dra. Rosana Agus, MSi.)
NIP. 131 959 055

Pembimbing Pertama


(Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, MSc.)
NIP. 131 862 603

Pembimbing Kedua


(Drs. As'adi Abdullah MSi.)
NIP. 131 846 41

PRAKATA

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Syukur Alahamdulillah segala puji dan syukur bagi Allah SWT atas limpahan Rahmat, Hidayah serta taufiknya telah memberikan kekuatan, ketabahan, kesabaran dan kesehatan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Keragaman Genetik Isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dari Kabupaten Jeneponto dan Kabupaten Pangkep" sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dengan selesainya penulisan skripsi ini, tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada:

- ↓ Ibu Dra. Rosana Agus, M.Si., Ibu Dr. Tutik Kuswinanti, M.Sc., dan Bapak Drs. As'adi Abdullah, M.Si., masing-masing selaku Pembimbing Utama, I, dan II, yang telah mengarahkan dan membimbing penulis sejak penyusunan rencana penelitian hingga penyusunan laporan ini selesai
- ↓ Bapak Drs. As'adi Abdullah, M.Si., selaku Penasehat Akademik, yang telah memberi nasehat dan bimbingan akademik serta penuh tanggung jawab memonitoring dan mengarahkan penulis sejak menjadi mahasiswa hingga selesai.

- ↓ Ibu Dr. Hj. Dirayah R. Husain, DEA., selaku Ketua Jurusan Biologi dan seluruh staf dosen yang telah mendidik dan membimbing selama penulis menimba ilmu di perguruan tinggi ini serta staf pegawai yang telah membantu.
- ↓ Ibu Dra. Risco B. Gobel, MS., Ibu Irma Andriani, S.Pi, M.Si, Ibu Hj. Sri Suhadyah, M.Agr, dan Ibu A. Masniawaty, S.Si, M.Si., masing-masing selaku Ketua, Sekretaris dan anggota penguji, yang telah memberi saran-saran dalam penelitian.
- ↓ Kepala Lab. Bioteknologi Pertanian Unhas, yang telah memberi bantuan penggunaan fasilitas selama penulis melaksanakan penelitian. Kawan-kawan peneliti, Kak Ahmad, Mas, Kak Uni, Rahma, serta rekan-rekan yang lain yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.
- ↓ Sahabat dan kawan-kawanku angkatan 01 tanpa terkecuali atas segala kisah kasih dan kebersamaan dalam mewarnai aktifitas perkuliahan penulis terkhusus buat sobatku Widie, Bhair, Anita, Ondo, Titi', Evendi, Thini, Udha, serta Rekan-rekan asisten lab. Genetika, Kanda-kanda senior dan ade-ade yunior serta seluruh warga HIMBIO F.MIPA UNHAS yang tak sempat disebut satu persatu.

Sembah sujud dan ucapan terima kasih yang sangat mendalam dan tak terhingga penulis haturkan kepada ayahanda tercinta *Andi Patajangi* dan Ibunda tersayang *Andi Nurhayati* serta saudara-saudaraku *Wawan* and *Meyri*, *Fifink*, *Imma*, *Ijha*, dan ponakanku *Tenri* yang senantiasa memberikan dukungan moril dan material serta doa yang tiada henti dipanjatkan kehadirat Ilahi untuk memohon keberkahan dan kesuksesan bagi penulis. Kakakku tercinta *Andi Fahriadi* (almarhum) yang

senantiasa ada dihati walau kematian telah memisahkan kita. Tak lupa pula buat *Kak Asni, Kak Tenri, A. Mawank, Ollenk, Puang Acho* yang senantiasa mendukung dan mengarahkan penulis hingga selesainya penelitian ini.

Demikian skripsi ini dipersembahkan dengan penuh rasa cinta kepada almamater yang telah memberi tempat kepada penulis dalam meraih gelar sarjana. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua dan untuk perkembangan sains dan teknologi.

Akhir kata, penulis memohon kepada Allah SWT semoga membalas budi baik semua pihak yang membantu hingga selesainya penelitian dan laporan ini. Semoga Allah SWT memberikan dan menunjukkan jalan terbaik bagi kita semua.

Amin Yaa Rabbal Alamin

Makassar, Desember 2005

Penulis



ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk melihat keragaman isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) yang berasal dari kabupaten Jeneponto dan Pangkep melalui pengamatan karakter morfologi dan molekuler. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian Pusat Kegiatan Penelitian Universitas Hasanuddin Makassar, yang berlangsung mulai bulan Mei sampai Nopember 2005. Pada tahap awal, penelitian ini difokuskan pada karakterisasi morfologi isolat *Foc* berdasarkan perbedaan warna koloni, bau, kecepatan pertumbuhan dan ukuran makro dan mikrokonidianya. Selanjutnya analisa molekuler dilakukan melalui ekstraksi dan purifikasi DNA pada 14 isolat *Foc*, kemudian diamplifikasi dengan metode Rep-PCR menggunakan primer ERIC. Hasil amplifikasi selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa dan gel polyacrilamid dan divisualisasi dengan ethidium bromida kemudian diamati dan dianalisis pada sinar UV. Tingkat keragaman ditetapkan berdasarkan perhitungan jarak genetik tiap isolat.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa secara morfologi isolat yang berasal dari kabupaten Pangkep dan Jeneponto berbeda baik dari segi warna koloni, bau, kecepatan pertumbuhan dan ukuran makrokonidianya. Secara molekuler isolat *Foc* dari kabupaten Pangkep memiliki variasi yang lebih kecil dengan nilai d_{ab} tertinggi 0,33, sedangkan isolat *Foc* dari kabupaten Jeneponto memiliki variasi yang lebih besar dengan nilai d_{ab} tertinggi 0,43. Terdapat variasi yang lebih tinggi antara isolat dari Kab. Pangkep dan Kab. Jeneponto dengan nilai d_{ab} tertinggi 0,5.

Kata kunci : *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, keragaman genetik, Rep-PCR

ABSTRACT

The objective of this research was to analyze the genetic variability of several *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) isolates from Jeneponto and Pangkep. This research was held in Agricultural Biotechnology Laboratory, Research Center of Hasanuddin University, Makassar, from May - Nopember 2005.

In the first step we focused to morphological characterisation of *Foc* isolates by the observation of colony colour, growth type and growth rate, smell, and size of macroconidia. For molecular characterisation, DNA from *Foc* isolates were extracted and purified according to Moller (1992). DNA of *Foc* isolates were futhermore amplified with Rep-PCR by using of ERIC primer. Amplified DNA was separated through electrophoresis on agarosa and polyacrilamid gel, and then visualised by ethidium bromide staining and analyzed under UV lamp.

The result showed that isolates from Jeneponto and Pangkep were morphologically different in their colony colour, smell, growt type and growth rate , as well as in the size of macroconidia.

Molecular characterisation showed that isolates from Pangkep had a smaller variability with d_{ab} 0,33, whereas isolates from Jeneponto had higher variability wih d_{ab} 0,43. There were gretaer variation between both regions with d_{ab} 0,5.

Key Word : *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, genetic variability, Rep-PCR

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
JUDUL SKRIPSI	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Tujuan Penelitian	4
I.3 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 Tinjauan umum Pisang.....	5
II.1.1 Sistematika Pisang Kepok (<i>Musa balbisiana</i> (ABB)).....	5
II.1.2 Morfologi Pisang Kepok	5

II.1.3 Penyakit Layu Fusarium pada Tanaman Pisang.....	6
II.2 Tinjauan umum <i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	8
II.2.1 Sistematika <i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	9
II.2.2 Reproduksi dan Morfologi <i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	9
II.3 Kelompok Kompabilitas Vegetatif.....	10
II.4 Isolasi DNA	11
II.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)	12
II.6 Metode Repetitive- Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR).....	16
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	18
III.1 Waktu dan Tempat Penelitian	18
III.2 Alat.....	18
III.2.1 Alat-Alat Ekstraksi dan Purifikasi DNA.....	18
III.2.2 Alat-Alat untuk PCR.....	18
III.2.3 Alat-Alat Elektroforesis Gel Agarosa dan Poliacrylamid.....	19
III.3 Bahan.....	19
III.3.1 Bahan-Bahan Ekstraksi dan Purifikasi DNA	19
III.3.2 Bahan-Bahan PCR	20
III.3.3 Bahan-Bahan Elektroforesis Gel Agarosa & Poliacrylamid 25	20
III.4 Cara Kerja	20
III.4.1 Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Isolat <i>F. o .c</i>	20
III.4.2 Ekstraksi dan Purifikasi DNA.....	21
III.4.3 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	22

III.4.4 Deteksi Produk PCR	22
III.4.5 Analisis Data	23
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	24
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	38
V.1 Kesimpulan	38
V.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pengamatan karakteristik morfologi isolat <i>F o c.</i>	29
2. Jarak genetik isolat <i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i> berdasarkan pola pita DNA hasil amplifikasi dengan metode Rep-PCR menggunakan primer ERIC	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Daun pisang yang terserang <i>F o c</i>	7
2. Batang semu yang terserang <i>F o c</i>	8
3. Morfologi Fusarium	10
4. Siklus pembentukan DNA baru dalam PCR	15
5. Morfologi <i>F o c</i> isolat J. 12, J. 13 dan J.3	25
6. Morfologi <i>F o c</i> isolat J. 51, dan J. 42.....	26
7. Morfologi <i>F o c</i> isolat P. 13, P. 22 dan P. 31	27
8. Konidia isolat <i>F o c</i>	28
9. DNA total isolat <i>F o c</i>	32
10. Elektroforesis produk isolat <i>F o c</i> pada gel agarosa	33
11. Elektroforesis produk isolat <i>F o c</i> pada gel polyacrylamid 12%	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja	42
2. Bahan-Bahan Ekstraksi dan Purifikasi DNA ..	44
3. Bahan-Bahan PCR	45
4. Bahan-Bahan Elektroforesis Gel Agarosa.....	46
5. Bahan-Bahan Elektroforesis Gel Poliacrylamid.....	47
6. NCBI Sequence Viewer v2.0.....	48

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang

Tanaman pisang (*Musa sp*) merupakan tanaman buah yang sangat digemari oleh masyarakat. Di Indonesia tanaman ini dapat tumbuh subur, baik di daerah dataran rendah maupun di dataran tinggi, dari yang beriklim basah maupun yang beriklim kering. Buahnya setiap saat dapat kita jumpai karena tidak tergantung pada musim. Tanaman pisang dapat dijadikan komoditas ekspor yang diusahakan dalam skala besar, baik dalam buah segar, bahan olahan dalam kaleng, atau dalam bentuk pisang hasil industri rumah tangga seperti kripik pisang dan pisang goreng (Suhardiman, 2002).

Salah satu kendala dalam usaha pengembangan kualitas dan peningkatan produksi pisang kepok (*Musa balbisiana* (ABB)) adalah adanya berbagai jenis penyakit (Dwiastuti, *dkk*, 1990 dalam Widaranty, *et.al.*, 1995). Salah satu penyakit utama adalah penyakit layu Fusarium atau penyakit layu Panama yang disebabkan oleh cendawan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, yang tersebar secara luas dan telah menghancurkan ribuan hektar pertanaman pisang di seluruh dunia, termasuk Indonesia (Hwang, 1991 dalam Karsinah, *dkk.*, 1999).

Pada abad ke-19 pertama kali ditemukan Penyakit layu Fusarium di Amerika Tengah, tetapi kerugian karena penyakit layu Fusarium terjadi pada tahun 1910-an, pada waktu jenis pisang ambon diserang disana. Di Amerika Tengah dan Selatan

dalam jangka 50 tahun lebih dari 50.000 ha kebun pisang telah hancur dan terpaksa dimusnahkan. Selain di Amerika Tengah dan Selatan, penyakit ini diketahui menimbulkan kerugian besar di Malaysia, Thailand, Filipina, Burma, India, Sri Lanka, Fiji, Australia, Selandia Baru, dan Afrika (Semangun, 1989).

Penyakit layu Fusarium yang disebabkan oleh cendawan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* merupakan salah satu penyakit yang sangat merusak tanaman pisang (*Musa balbisiana* (ABB)). Intensitas serangan layu Fusarium di Sulawesi Selatan berfluktuasi dari tahun ke tahun. Dari tahun 2000 – 2004, hampir seluruh kabupaten di Sulawesi Selatan mengalami kegagalan panen akibat serangan layu Fusarium. Berdasarkan analisis intensitas serangan di Sulawesi Selatan bahwa di daerah Bulukumba, Pangkep dan Luwu dikategorikan sebagai daerah endemis. Daerah Bantaeng, Takalar, Maros dikategorikan sebagai daerah sporadis sedangkan daerah Selayar dikategorikan sebagai daerah potensial untuk serangan layu Fusarium (Anonim, 2004).

Berbagai usaha yang telah dilakukan didalam mengendalikan penyakit layu Fusarium, namun secara umum keefektifannya masih diragukan. Pengendalian dengan penanaman varietas resisten terhadap penyakit layu Fusarium merupakan salah satu alternatif pengendalian yang sangat dianjurkan (Sahlan, 1991 dalam Karsinah *et.al.*, 1999). Dewasa ini populasi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* diketahui memiliki ras seperti ras 1 yang menyerang Gros Michael, ras 2 yang menyerang Bluggoe, ras 3 yang menyerang Heliconia dan ras 4 yang menyerang Cavendish.(O'Donnell, 1998). Berdasarkan hal itu perlu diketahui kelompok ras

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* secara cepat dengan metode yang simple dan akurat.

Berbagai metode dapat dilakukan dalam membedakan ras dar *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Salah satunya adalah pengamatan morfologi baik bentuk maupun warna koloni pada media Potatoe Dekstrose Agar (PDA), media Komada dan media Yeast Ekstrak. Namun metode ini belum mampu memberikan hasil yang lebih akurat karena tingginya variasi dalam spesies.

Metode lain yang lebih akurat yaitu dengan penanda molekuler diantaranya dengan menggunakan metode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms). Metode ini memiliki beberapa keuntungan sebagai penanda molekuler karena jumlah dari penanda RFLP efektivitasnya tidak terbatas. Namun demikian, deteksi RFLP yang dilanjutkan dengan hibridisasi Southern Blot metodenya relatif sulit, memakan waktu, dan biayanya relatif mahal (Schäfer dan Wöstemeyer, 1994; Vought, *et al.*, 1995).

Penanda molekuler lain yang dapat digunakan untuk pemeriksaan dalam membedakan ras *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* secara cepat dan sederhana yaitu dengan metode PCR. PCR merupakan suatu teknik yang sangat baik dan sensitif yang dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti biologi molekuler, diagnostik, genetika populasi, dan analisa forensik. PCR pertama kali ditemukan oleh Carry Mullis dkk., tahun 1985.

Metode Rep-PCR merupakan suatu metode dalam PCR untuk membuat sidik jari DNA urutan nukleotida yang berulang secara acak pada genom. Metode ini

digunakan untuk menganalisa DNA secara spesifik dengan menggunakan primer DNA yang komplementer berdasarkan sekuens DNA yang berulang (Rademaker and De Bruijn, 2001). Metode Rep-PCR sangat tepat digunakan untuk mempelajari keragaman, mengidentifikasi, dan menganalisa epidemiologi molekuler patogen pada tanaman.

Informasi tentang keragaman genetik populasi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* sangat diperlukan untuk pengendalian penyakit layu pada pisang, karena dengan mengetahui ras yang ada di lapangan. Penggunaan varietas yang tahan terhadap ras tertentu secara tepat dilakukan, akan sangat berguna dalam program pemuliaan tanaman pisang yang tahan terhadap penyakit layu *Fusarium*, sehingga perlu dilakukan penelitian tentang keragaman genetik *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dari beberapa daerah di Sulawesi Selatan dengan menggunakan metode Rep-PCR..

I.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk melihat keragaman isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* yang berasal dari Kab. Jeneponto dan Pangkep.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat membantu dalam melakukan pemetaan ras *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* di lapangan secara cepat dan akurat sehingga dapat digunakan sebagai informasi untuk program pengendalian di lapangan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tinjauan umum Pisang

II.1.1 Sistematika Pisang Kepok (*Musa balbisiana* (ABB))

Menurut Tjitrosoepomo, (2002) sistematika Pisang Kepok (*Musa balbisiana* (ABB)) adalah sebagai berikut :

- Divisi : Spermatophyta
- Anak divisi : Angiospermae
- Kelas : Monocotyledoneae
- Bangsa : Zingiberales (Scitamineae)
- Suku : Musaceae
- Marga : *Musa*
- Jenis : *Musa Balbisiana* (ABB)

II.1.2 Morfologi Pisang

Pisang merupakan tanaman semak yang berbatang semu, tingginya bervariasi antara 1 – 4 meter, tergantung varietasnya. Daunnya lebar, panjang, tulang daunnya besar, dan tepi daunnya tidak mempunyai ikatan yang kompak sehingga mudah robek bila terkena tiupan angin kencang. Batangnya mempunyai bonggol (umbi) yang besar sekali dan terdapat banyak mata yang dapat tumbuh menjadi tunas anakan (Sunarjono, 2002).

Pisang memiliki batang yang berumpun dengan daun yang tunggal. Saat muda daunnya menggulung, melonjong, dan ibu tulang daun yang sangat jelas, serta pertulangan daun menyirip sejajar. Bunga di ujung dan memiliki bulir yang majemuk dan menggantung dimana setiap kelompok terdiri atas dua baris serta memiliki daun pelindung yang berwarna merah dan rontok setelah buah berkembang. Tanaman pisang digolongkan sebagai tanaman yang memiliki buah buni dan berwarna kuning pada saat masak (Wulandari, 2003).

II.1.3 Penyakit layu Fusarium pada tanaman pisang

Penyakit layu Fusarium atau penyakit Panama yang disebabkan oleh cendawan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* merupakan penyakit yang paling penting pada tanaman pisang (Wardlaw and Stover, 1972 dalam Cronauer and Krikorian, 1981). Penyakit ini telah menghancurkan 40.000 ha tanaman pisang di Amerika Selatan dan Tengah lebih dari 50 tahun. Penyakit ini pertama kali ditemukan di daerah Panama pada akhir 1890 sehingga disebut juga penyakit Panama (Cook: 1975).

Layu Fusarium disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Serangannya terjadi melalui akar atau bonggol yang terluka akibat terkena peralatan pertanian atau infeksi Nematoda. Penularannya melalui bibit, alat pertanian, maupun air (Sunardjono, 2002).

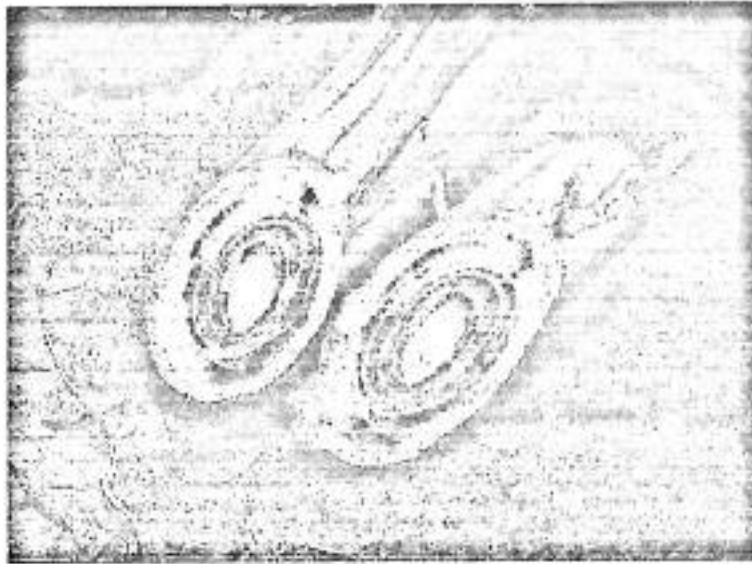
Gejala penyakit layu Fusarium atau Panama yaitu pada pangkal daun, tampak bintik-bintik atau garis-garis kuning. Tepi bawah daun berwarna kuning tua, lalu coklat, dan akhirnya mengering. Selanjutnya pelepah daun patah dan batang

semu terkadang terbelah. Batang yang terserang akan kehilangan banyak cairan dan berubah warna menjadi kecoklatan, tepi bawah daun menjadi kuning tua (layu), merambat ke bagian dalam secara cepat sehingga seluruh permukaan daun tersebut menguning. Sepanjang jalur daun menguning sampai ke tepi daun, akhirnya daun layu, tangkai daun patah, dan batang membusuk (Satuhu dan Supriyadi, 1999).



Gambar 1. Daun Pisang yang terserang penyakit layu Fusarium (Synder dan Hansen, 1940).

Jika pangkal batang dibelah membujur terlihat garis coklat atau hitam menuju ke semua arah dari pangkal batang (bongkol) ke atas, melalui jaringan pembuluh pangkal dan tangkai daun. Apabila bonggol pisang yang sakit dibongkar akan tampak sebagian besar leher akar membusuk dan berwarna kehitam-hitaman (Semangun, 1989).



Gambar 2. Batang semu yang terserang *Fusarium* (Synder dan Hansen, 1940).

Tanaman yang terserang tidak akan mampu berbuah atau buahnya tidak terisi. Lamanya waktu antara saat terjadinya infeksi penyakit sampai munculnya gejala penyakit berlangsung kurang lebih 2 bulan (Synder dan Hansen, 1940).

II.2 Tinjauan Umum *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Fusarium oxysporum merupakan spesies cendawan pada genus *Fusarium* yang terdiri atas banyak jenis yang sebagian besar menyerang pada tanaman pangan, menyebabkan penyakit busuk biji, busuk akar, busuk cabang, busuk batang, layu, dan penyakit kuning. *Fusarium* termasuk kelas Deuteromycetes tetapi mereka mempunyai alat perkembangbiakan seksual atau teleomorph yang sering dijumpai pada golongan Ascomycetes. Perkembangan fungi pada tanaman yang diinfeksi sangat dipengaruhi oleh kondisi suhu, lebih sering dijumpai pada temperatur hangat dan sedang dibanding pada temperatur yang dingin (Lucas, *et al*, 1978).

Morfologi *F. oxysporum* yaitu hifanya bersekat dan menyebar ke segala arah membentuk miselium seperti kapas. Pada medium PDA, mula-mula putih tetapi lambat laun berwarna krem atau kuning pucat dan dalam keadaan tertentu berwarna ungu kemerah-merahan. (Sastrahidayat, 1990).

II.2.1 Sistematika *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

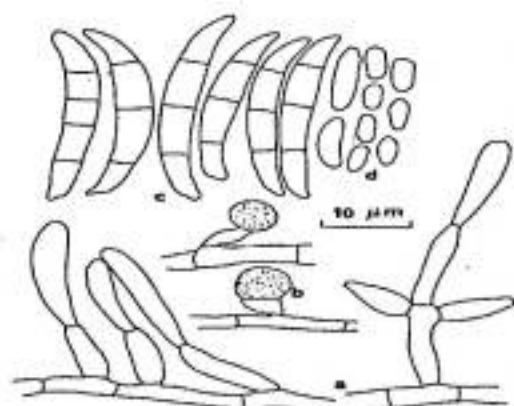
Menurut Dwidjoseputro (1978) dan Sastrahidayat (1990), bahwa cendawan ini tergolong dalam :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Mycota
Sub Divisi	: Eumycotina
Kelas	: Deuteromycetes
Ordo	: Moniliales
Famili	: Tuberculariaceae
Genus	: <i>Fusarium</i>
Spesies	: <i>Fusarium oxysporum</i>

II.2.2 Reproduksi dan morfologi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Cendawan ini menghasilkan tiga tipe spora asexual. Mikrokonidia diproduksi paling sering pada cabang konidiofor dalam sporodochia, di atas permukaan bagian tanaman yang terinfeksi, dapat juga diproduksi secara tunggal pada miselium, khususnya dalam kultur atau media buatan. Makrokonidia ini memiliki dinding tipis dengan sebuah sel dasar yang jelas, dan sebuah sel apikal pada ujungnya (Nelson, 1981). Makrokonidia ini mempunyai ukuran 4 – 5 x 22 – 36 mikro

meter, dengan tiga atau lebih septa. Mikrokonidianya berbentuk oval atau ginjal, yang terdapat di atas mikrokonidiofor pendek dalam miselium. Mikrokonidia ini hialin, dengan ukuran 2,5 – 3 x 5 – 7 mikro meter dengan satu septa atau tanpa septa). Makrokonidia dan mikrokonidia juga dapat diproduksi secara bersama dalam xylem tanaman yang terinfeksi, tetapi mikrokonidia biasanya lebih mendominasi dalam jaringan tanaman yang terinfeksi (Semangun, 1989). Klamidospora yang juga merupakan spora aseksual yang terbentuk di dalam hifa, berbentuk bulat yang terbentuk langsung dari proses transformasi sel-sel filamen tertentu atau seluruh filamennya, dan memiliki dinding tebal. Klamidospora berfungsi untuk bertahan hidup dalam tumbuhan atau dalam tanah, jika inangnya tidak ada (Nelson, 1981).



Keterangan :

- a. Hifa vegetatif
- b. Klamidospora
- c. Makrokonidia
- d. Mikrokonidia

Gambar 3. Morfologi *Fusarium* (Singh, Kuwant, *et.al.*, 1991)

II.3 Kelompok Kompabilitas Vegetatif

Isolat *F. Oxysporum* f. sp. *cubense* terdiri atas 6 grup kompatibilitas vegetatif atau disebut VCGs (0124, 0125, 0128, 01220, 01222 dan 01212), dan dapat dibedakan menjadi 2 kelompok yaitu kelompok yang membentuk kompleks Copper dibawah miseliumnya di atas permukaan medium. Kelompok yang lainnya yang tidak

bisa membentuk kompleks Copper pada medium. Koloni yang mampu membentuk kompleks Copper pada medium (CCG) nampak berwarna ungu pucat sampai ungu gelap atau hitam. Sedangkan koloni yang tidak mampu membentuk kompleks Copper (CNG) nampak berwarna hijau keunguan pucat sampai putih. (O'Donnell., Cigelnik, 1998).

II.4 Isolasi DNA

DNA merupakan bagian terbesar dari nukleus yang mengandung unit-unit yang disebut nukleotida dimana tiap nukleotida mengandung gula deoksiribosa, asam fosfat, dan suatu basa yang mengandung nitrogen yang dapat mengendalikan perkembangan sifat biokimia, anatomis, dan fisiologis, dan bertindak sebagai pembawa informasi genetik pada semua organisme (Pai, 1987; Watson *et al.*, 1988; Stansfield, 1991; Campbell *et al.*, 2000).

DNA sebagai pembawa informasi genetik terdapat pada semua makhluk hidup, terdapat di dalam sel khususnya di dalam inti sel (Muladno, 2002). DNA dapat diperoleh dari suatu makhluk hidup dengan suatu proses ekstraksi, sehingga memudahkan untuk mengidentifikasi DNA yang disebut proses isolasi DNA (Scleif, 1986).

Melalui proses tersebut DNA dipisahkan dari komponen seluler lain seperti protein RNA, dan lemak. Banyak metode yang digunakan untuk mengisolasi DNA, tergantung spesimen yang akan dideteksi. Metode tersebut pada dasarnya memiliki prinsip yang sama, namun ada beberapa hal tertentu yang biasanya digunakan

modifikasi untuk dapat menghancurkan inhibitor yang ada di dalam masing-masing sumber spesimen (Steen, 1999; Hatta, 2002).

Di dalam keperluan genetika, ahli rekayasa genetika biasanya menyiapkan paling sedikit dua jenis DNA yang berbeda, yaitu DNA obyek penelitian dan DNA vektor sebagai perantara. DNA plasmid merupakan vektor bagi gen berukuran kecil sedangkan DNA *fag* merupakan vektor bagi gen yang berukuran besar. Teknik-teknik yang telah disebutkan di atas dapat digunakan untuk mengisolasi berbagai jenis DNA tersebut.

Metode isolasi DNA dilakukan dengan 2 tahap ekstraksi dan purifikasi. Miselium yang telah digerus diekstraksi dengan menggunakan buffer TES (Tris-EDTA-SDS) dan CTAB (Cetil Trimetil Amonium Bromida) (Moller *et al.*, 1992). Penggunaan CTAB membutuhkan waktu tetapi DNA yang dihasilkan lebih besar. Proteinase K dan RNase digunakan untuk membersihkan protein dan RNA. Tahap ini juga memanfaatkan NH_4Ac (Amonium Asetat) yang berfungsi untuk mengurangi terjadinya presipitasi sejumlah kontaminan. Tahap selanjutnya yaitu membersihkan kembali protein dan sejumlah RNA yang masih tersisa dengan menggunakan larutan fenol, kloroform dan isoamilalkohol (25:24:1) (Chisholm, 1992; Steen, 1999)

II.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu thermocycler.

Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit sepasang primer. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru dikenal dengan enzim polymerase.

PCR merupakan suatu teknik yang sangat baik dan sensitif yang dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti biologi molekuler, diagnostik, genetika populasi, dan analisa forensik pertama kali ditemukan oleh Carry Mullis dkk., tahun 1985. PCR mampu mengamplifikasi sekuen DNA dari suatu spesies yang spesifik untuk suatu mikroorganisme, yang jumlahnya mencapai jutaan kali dalam waktu beberapa jam. Satu unit DNA mengandung phospat, gula, dan basa yang diketahui sebagai nukleotida. DNA dan RNA memiliki ujung 5' dan 3'. Ujung 5' pada satu rantai DNA yang komplemen dengan ujung 3' pada rantai DNA yang lain (Nasir, 2002).

PCR didasarkan pada amplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang komplemen dengan ujung 5' dari kedua untai sekuens target. Oligonukleotida ini digunakan sebagai primer (primer PCR) untuk memungkinkan DNA template dikopi oleh DNA polymerase (Michael *et al.*, 1990). PCR melibatkan 3 tahap siklus temperatur yang berurutan yaitu denaturasi, penempelan primer (annealing), dan pemanjangan primer (extension). Proses dari denaturasi-penempelan-ekstensi disebut sebagai satu siklus. Suhu denaturasi dan ekstensi bersifat permanen, masing-masing pada 95°C dan 72°C, sedangkan suhu penempelan bergantung pada panjang-pendeknya primer (Muladno, 2002; Nasir, 2002).

a. Tahap Denaturasi

Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan mengakibatkan gagalnya proses PCR. Denaturasi awal dilakukan sebelum enzim *Taq* polymerase ditambahkan di dalam tabung reaksi. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal (Muladno, 2002).

b. Tahap Penempelan Primer (Annealing)

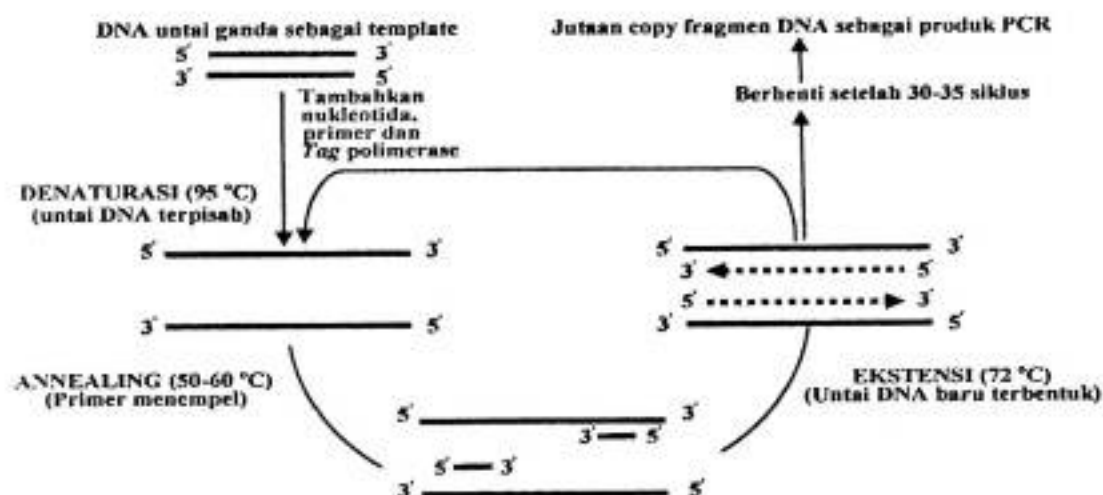
Waktu annealing yang biasa digunakan pada reaksi PCR yaitu 30-45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa digunakan antara 50-60°C.

c. Tahap Pemanjangan Primer (Extension)

Selama tahap ini, *Taq Polymerase* memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan antara 35 sampai 100 nukleotida perdetik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam, dan molekul DNA target.

Apabila ketiga tahap dalam proses PCR telah dilakukan maka setiap satu segmen DNA pita ganda diamplifikasikan menjadi dua segmen DNA pita ganda yang identik, sehingga jumlahnya dua kali lebih banyak dari jumlah semula. Siklus

diulangi kembali, mulai lagi dengan denaturasi, penempelan dan ekstensi primer (Mordechai, 1999).



Gambar 5. Siklus pembentukan molekul DNA baru dalam PCR (Muladno, 2002)

Proses PCR berlangsung dalam beberapa siklus. Kisaran siklus optimum dalam proses PCR adalah 30 – 35 siklus, bergantung pada enzim polimerase, jumlah templat dan sebagainya. Beberapa komponen yang diperlukan untuk proses PCR adalah alat PCR (DNA *Thermal Cycler*) dan bahan seperti DNA sampel yang diamplifikasi, dNTP yaitu bahan baku nukleotida saat polimerasi (terdiri atas dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP), oligonukleotida primer yaitu nukleotida pendek untuk mengawali reaksi polimerasi, enzim DNA polimerase untuk mengkatalisis reaksi pemanjangan primer, dan ddH₂O serta buffer PCR sebagai bahan pelarut bahan tersebut (Toha, 2001).

Keunggulan PCR dikatakan tinggi. Hal ini berdasarkan spesifitasnya, efisiensi, dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya

mengamplifikasi produk sesuai dengan yang diinginkan. Efisiensi PCR adalah kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus (Michael *et al.*, 1990). Keakuratan yang tinggi karena DNA polymerase mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk. Melalui PCR identifikasi suatu mikroorganisme dari suatu sampel dapat dilakukan dengan cepat dan spesifik. Hal ini dikarenakan kemampuan kerja PCR dengan jumlah sampel yang sangat sedikit dimana teknik kultur dan serologi sering terhambat (Blaber, 1998).

II.6 Metode Repetitive Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR)

Repetitive Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR) adalah suatu metode dalam PCR untuk membuat sidik jari DNA urutan nukleotida yang berulang secara acak pada genom. Rep-PCR pertama kali dikembangkan oleh J. R. Lupski (1998) pada suatu kerjasama tim yang dipimpinnya pada Perguruan Tinggi Medicine di Baylor (Hauston, Texas) dan telah berhasil diterapkan pada banyak studi keanekaragaman mikroba medis dan lingkungan industri (Rademarker and the Bruijn, 2001).

Berdasarkan bentuk dan urutan biasanya maka DNA dibagi atas dua, yaitu (Yatim 2000):

1. Urutan khas

Urutan khas adalah urutan yang merupakan gen struktur dimana gen struktur berperan dalam mengatur kehidupan sehari-hari sel, yakni metabolisme, mengontrol perubahan terhadap masuknya benda asing, pertumbuhan dan pembiakan.

2. Urutan berulang

Urutan berulang adalah terdapatnya basa purin dan pirimidin nukleotida berulang-ulang. Terdapatnya 50 % urutan berulang dari seluruh DNA dalam sel. Urutan ini terdapat di sekitar sentromer (kepala kromosom), telomere (ujung pangkal kromosom) dan gen-gen struktur yang disebut urutan selang. Panjang urutan berulang itu sangat bervariasi antar berbagai individu dalam suatu populasi. Oleh karena itu urutan berulang ini dimanfaatkan untuk identifikasi individu atau sidik jari DNA.

Rep-PCR pertama kali dilakukan pada sampel bakteri dan baru-baru ini dilakukan pada jamur dalam analisis genetik fungi penyebab penyakit. Sidik jari DNA digunakan untuk mengukur keanekaragaman dari genotipe yang didasarkan pada sekuens atau urutan DNA berulang yang biasanya terdapat pada kelompok eukarotik dan prokariotik (Radermarker and De Bruijn, 2001).

Primer DNA dapat dirancang untuk memenuhi repetitive dari suatu familia. Primer tersebut bekerja pada arah depan (5' – 3') dan primer lainnya bekerja pada arah berlawanan (3' – 5') pada suatu double heliks DNA. Rep-PCR menggunakan primer DNA yang komplementer secara alami terjadi pada urutan DNA yang berulang. Ada tiga jenis primer yang umum diketahui dimana urutan yang berulang ini telah dikenali yakni Rep-Primer (Repetitive Extragenic Polinromic) yang mencakup 30 – 40 bp yang berulang, 100 bp – 6 kb enterobacterial intergenic consensus yang berulang (ERIC), dan 154 bp unsur yang ada pada primer BOX (Radermarker and De Bruijn, 2001).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Mei – Oktober 2005 dan berlangsung di Laboratorium Bioteknologi Pertanian Pusat Kegiatan Penelitian Universitas Hasanuddin Makassar

III.2 Alat

III.2.1 Alat-alat untuk Ekstraksi dan Purifikasi DNA

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi dan purifikasi DNA yaitu erlenmeyer (Pyrex), shaker (IKA Labortechnik KS 501 digital), pompa vakum, mikrotip (Eppendorf), vortex (Labinco), sentrifugasi temperatur rendah, corong vakum, sendok tanduk, mortar, tabung ependorf, rak tabung ependorf, mikropipet (Eppendorf), penangas air (Dr. Lange Universal Thermostat), gelas ukur (Pyrex), botol reagen, hot plate magnetic (Labinco), magnetic stirrer, neraca analitik (Denver Instrument M-220), lemari pendingin (Sharp), termometer, dan block heater (Stuart Scientific).

III.2.2 Alat-alat untuk PCR

Alat-alat yang digunakan untuk PCR yaitu Freezer, laminary air flow (Labconco), mesin PCR (Robocycler Stratagena), tabung ependorf, rak tabung ependorf, mikropipet (Eppendorf), dan mikrotip (Eppendorf).

III.2.3 Alat-alat untuk Elektroforesis Gel Agarosa dan gel polyacrilamid

Alat-alat yang digunakan untuk elektroforesis gel agarosa yaitu : elektroforesis horizontal (Astec), elektroforesis vertikal (Biorad), power supply (Power Pac 100 biorad), neraca analitik (Denver Instrument M-220), sendok tanduk, gelas ukur (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), microwave (Sharp), mikropipet (Eppendorf), mikrotip (Eppendorf), botol reagen, lemari pendingin (Sharp), power supply (Power Pac 100 Biorad), elektroforesis horizontal (Astec), dan perangkat UV light + Geldoc (UVP UPLAND CAUK).

III.3 Bahan

III.3.1 Bahan-bahan untuk Ekstraksi dan Purifikasi DNA

Bahan-bahan yang digunakan untuk ekstraksi dan purifikasi DNA yaitu isolat *F. Oxysporum f. sp. cubense*, medium cair Czapek-Dox, kertas saring Whatman 10 mmΦ no. 14, bides steril, nitrogen cair, bufer TES (Tris-EDTA-SDS), proteinase K (promega), NaCl 5 M, CTAB 10 % (dalam 0,7 M NaCl dan 1×TE Bufer), kloroform isoamilalkohol (24:1), NH₄ Asetat 5 M (ammonium asetat), isopropanol dingin, etanol 70% dingin, RNase A (promega), bufer TE (Tris-EDTA bufer), fenol kloroform isoamilalkohol (25:24:1).

III.3.2 Bahan-bahan untuk PCR

Bahan-bahan yang digunakan untuk PCR yaitu ekstrak DNA (template), bides steril, PCR Mix, PCR bufer 10× (dengan 1,5 mM MgCl₂), dNTPS Mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), primer ERIC 1 (5'- ATG, TAA, GTC, CCT, GGG, GAT, TAC,

C - 3'), Primer ERIC 2 (5' – AAG, TAA, GTG, ACT, GGG, GTG, AGC, G – 3'), enzim Taq DNA Polimerase (finnzyme), mineral parafin.

III.3.3 Bahan-bahan untuk Elektroforesis Gel Agarosa dan gel polyacrilamid

Bahan-bahan yang digunakan untuk elektroforesis gel agarosa dan gel polyacrilamid yaitu agarosa 0,8% dan 1,5%, bufer TBE 1× (Tris Boric Acid EDTA), loading bufer 6 (promega), DNA size standard (Marker Finnzymes), etidium bromida (EtBr) 0,5 µg/ml, bides steril, Temed, loading dye, DNA size standard (Marker Finnzymes), etidium bromida (EtBr) 0,5 µg/ml, dan bides steril..

III.4 Cara Kerja

III.4.1 Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Sampel yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Kabupaten Jeneponto dan Kabupaten Pangkep. Isolat *Fusarium* dari Pisang diperoleh dari hasil isolasi pada bagian pelepahnya atau dari batang semu dengan cara memotong bagian pisang yang setengah terserang dan tidak kemudian disterilisasi permukaan dengan aquadest steril, alkohol, aquadest steril, aquadest steril. Kemudian ditanam pada cawan petri yang telah berisi dengan kertas saring lembab dan diinkubasi selama beberapa hari pada suhu kamar. Setelah miseliumnya tumbuh maka dipindahkan pada medium Potatoe Dekstrose Agar (PDA) untuk diperoleh biakan murni. Setelah itu dilakukan karakterisasi morfologi isolat tersebut.

III.4.2 Ekstraksi dan Purifikasi DNA

Tahapan ekstraksi dan purifikasi menurut Moller (1992) adalah sebagai berikut: Kultur *Fusarium* yang berumur satu minggu dipindahkan ke kultur cair Czapek-Dox+Yeast yang diinkubasikan pada shaker dengan suhu 18°C. Setelah 14 hari dilakukan pemanenan dengan menggunakan filter vakum kemudian dibekukan pada suhu 20°C selama 3 hari. Miselium yang telah dibekukan digerus dengan menggunakan mortar yang sebelumnya ditambahkan nitrogen cair. Bubuk miselium kemudian dimasukkan ke dalam tabung ependorf sebanyak 1/3 dari isi tabung dan ditambahkan 500 µl bufer TES kemudian divortex. Ditambahkan 5 µl Proteinase K dan diinkubasi pada waterbath (suhu 55°C, selama 1 jam). Kemudian ditambahkan 140 µl NaCl dan 65 µl CTAB (yang sebelumnya telah diinkubasi pada waterbath pada suhu 65°C) dan dilakukan inkubasi selama 10 menit pada suhu 65°C. Ditambahkan kloroform sebanyak 710 µl dan diinkubasi pada suhu 0°C selama 30 menit. Dilakukan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan dipindahkan pada 1,5 ml tabung ependorf dan ditambahkan 225 µl NH₄ asetat dan dihomogenkan perlahan dan diinkubasi selama semalaman. Dilakukan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan pada tabung ependorf baru dan ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 55% dari volume supernatan dan diinkubasi pada es selama 30 menit. Kemudian dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet dicuci sebanyak 2x dengan 500 µl etanol dingin 70% dan dikeringkan dengan blockheater. Pelet diambil dan disuspensikan

dengan 50 μ l TE Bufer dan ditambahkan dengan 3 μ l RNAase lalu diinkubasi selama 1 jam suhu 37°C. DNA dicek dengan elektroforesis agarosa (0,8% agarosa, 90 volt, 28 menit).

III.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Prosedur ini dikerjakan pada sampel DNA hasil isolasi dari ekstraksi DNA. Sebelumnya dibuat campuran reaksi PCR (PCR mix) untuk volume 25 μ l pada masing-masing tabung yaitu: 17,62 μ l bides steril; 2,5 μ l bufer PCR; 0,5 μ l dNTPs mix; 0,5 μ l primer ERIC 1, 0,88 primer ERIC 2, 2 μ l template (DNA), 0,75 μ l MgCl₂; dan 0,25 μ l Taq DNA Polimerase. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR. Amplifikasi ini sebanyak 36 siklus, dimana 1 siklus untuk denaturasi 95°C selama 5 menit Annealing 52°C selama 1 menit, dan extension 65°C selama 3 menit, 4 siklus untuk denaturasi 95°C selama 2 menit Annealing 52°C selama 1 menit, dan extension 65°C selama 3 menit, dan 31 siklus denaturasi 94°C selama 1 menit Annealing 52°C selama 1 menit, dan extension 65°C selama 3 menit.

III.4.4 Deteksi Produk PCR

Sebanyak 8 μ l produk PCR dipisahkan melalui elektroforesis horizontal dengan 2 % gel agarosa dan 2,3% gel agarosa dengan buffer TAE 1x dan TBE 1x pada voltase 90 volt selama 30 menit dan juga melalui elektroforesis vertikal dengan 12 % gel poliakrylamid pada 2 step yakni (1) voltase 90 volt selama 30 menit dan (2) voltase 120 volt selama 60 menit. Visualisasi profil DNA dilakukan dengan pewarnaan etidium bromida (1 μ g/ml) selama 15 menit, dilanjutkan pencucian dengan bides steril selama 5 menit, kemudian dideteksi dengan menggunakan sinar

UV pada UV-cabinet. Dokumentasi gel kemudian dilakukan dengan menggunakan Geldoc (UVP UPLAND CAUK).

III.4.5 Analisis Data

Hasil pemotretan DNA berupa pola pita DNA diterjemahkan dalam bentuk nilai dengan ketentuan nilai 0 (nol) untuk tidak adanya pita dan nilai 1 (satu) untuk adanya pita pada posisi yang sama dari setiap isolat yang dibandingkan dengan menggunakan rumus Nei dan Li (1979) sebagai berikut:

$$F_{ab} = \frac{2n_{ab}}{(n_a + n_b)}$$

Keterangan:

F_{ab} = Koefisien kesamaan antara a dan b

a dan b = Isolat yang dibandingkan

n_{ab} = Jumlah pita DNA yang sama posisinya pada isolat a dan b

n_a dan n_b = Jumlah pita pada masing-masing pita isolat a dan b

Untuk menghitung jarak genetik, digunakan rumus:

$$d_{ab} = 1 - F_{ab}$$

Keterangan:

d_{ab} = Jarak genetik antara a dan b

F = Nilai kesamaan yang dihitung dengan rumus Nei and Li

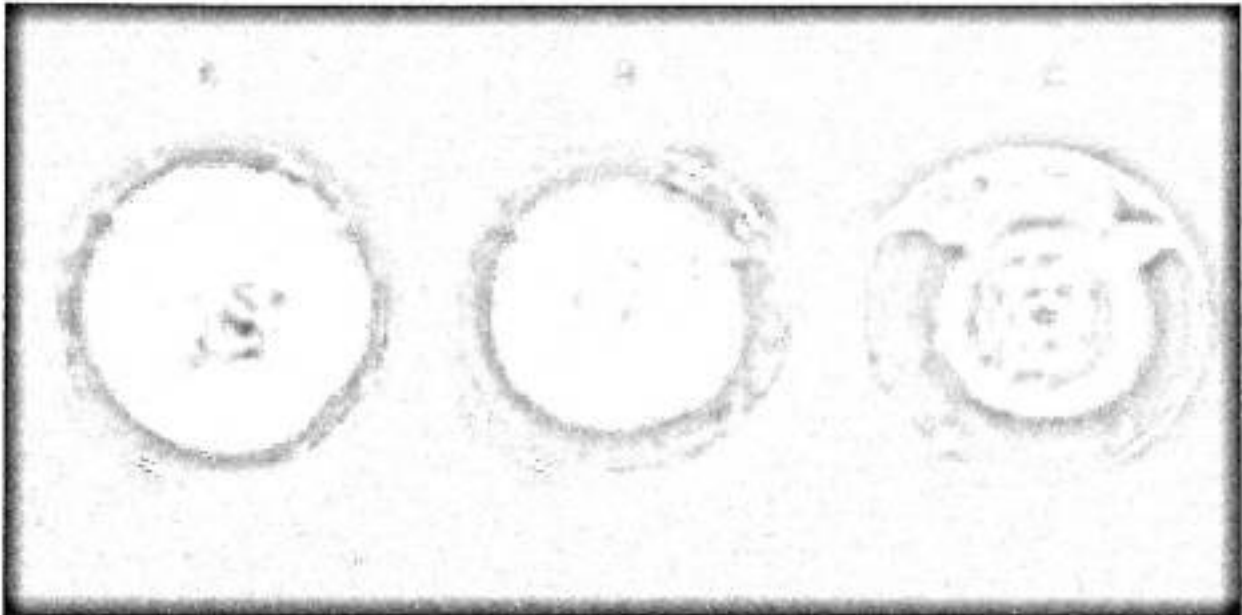
a dan b = Isolat yang dibandingkan

Selanjutnya nilai yang diperoleh dibuat dalam Dendrogram untuk menganalisa tingkat keragaman isolat yang diuji.

BAB IV

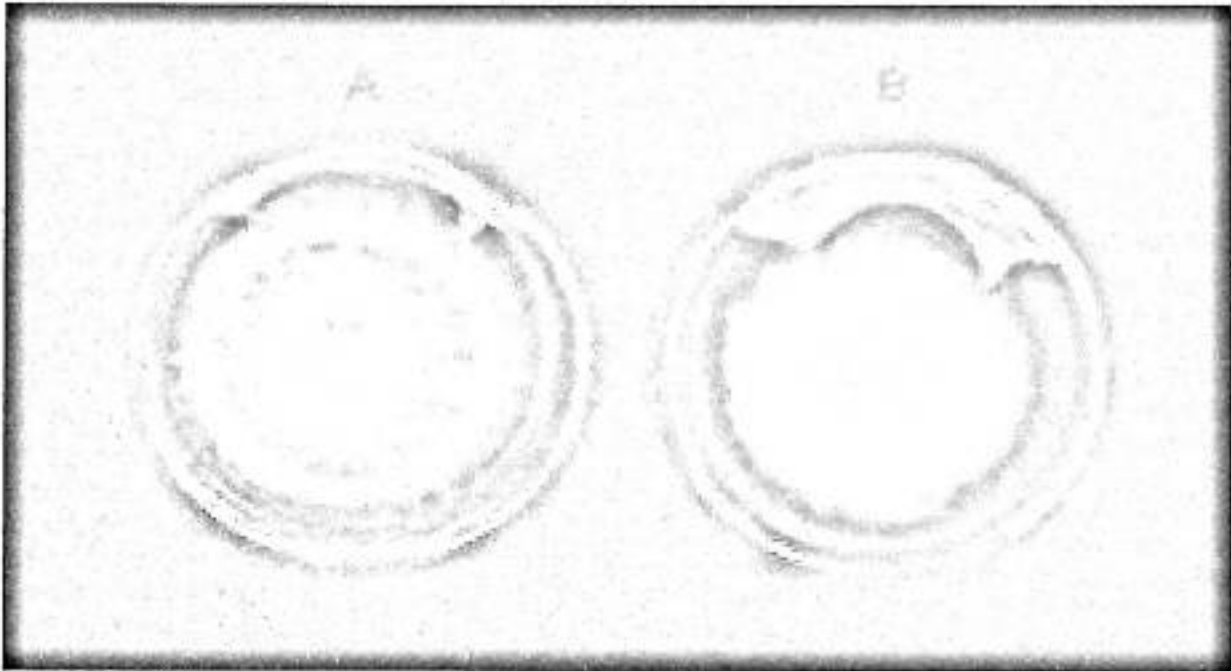
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan morfologi isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) yang diinkubasi selama 7 hari pada media Potato Dextrose Agar (PDA) menunjukkan bahwa isolat dari daerah Jeneponto dan Pangkep memiliki variasi yang beragam. Variasi tersebut diamati berdasarkan warna koloni, kecepatan pertumbuhan, bau yang dihasilkan serta jumlah septa pada makrokonidianya. Dari masing-masing isolat tersebut memiliki ciri khas yang tersendiri seperti isolat yang berasal dari Jeneponto yaitu isolat J.13 pada awal pertumbuhan memiliki koloni yang berwarna putih kemudian berubah menjadi putih kekuningan dengan pertumbuhan miselium yang menyebar ke samping secara merata dan tepi yang teratur serta memiliki miselium yang padat dan kasar (gambar 5.). Isolat J.12 pada awal pertumbuhan berwarna putih kemudian berubah menjadi merah muda dengan pertumbuhan koloni yang menyebar ke samping dan ke atas dan memiliki miselium yang padat dan kasar serta tepi koloni yang teratur (gambar 5.). Isolat J.3 berwarna putih kemudian berubah menjadi kuning dan akhirnya berubah menjadi merah kekuningan, memiliki pertumbuhan miselium yang menyebar kesamping dengan miselium yang padat dan kasar serta tepi koloni yang teratur (gambar 5.).



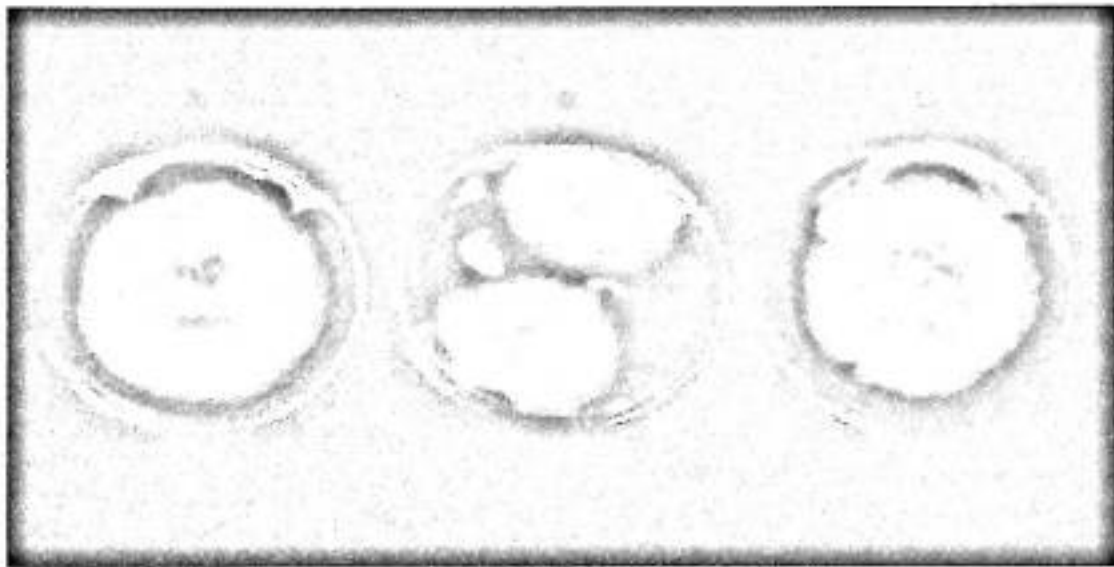
Gambar 5. Morfologi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (A) Isolat J.12, (B) Isolat J.13 (C) Isolat J.3

Isolat J. 42 awalnya berwarna putih kemudian berubah menjadi kekuningan dengan pertumbuhan koloni yang menyebar ke samping dan ke atas secara teratur serta memiliki miselium yang padat dan kasar dengan tepi koloni yang teratur (gambar 6.). Isolat J. 51 pada awal pertumbuhan berwarna putih kemudian berubah menjadi kuning kemerahan dengan pertumbuhan koloni yang menyebar ke samping secara merata serta memiliki miselium yang padat dan kasar dengan tepi koloni yang teratur (gambar 6.).



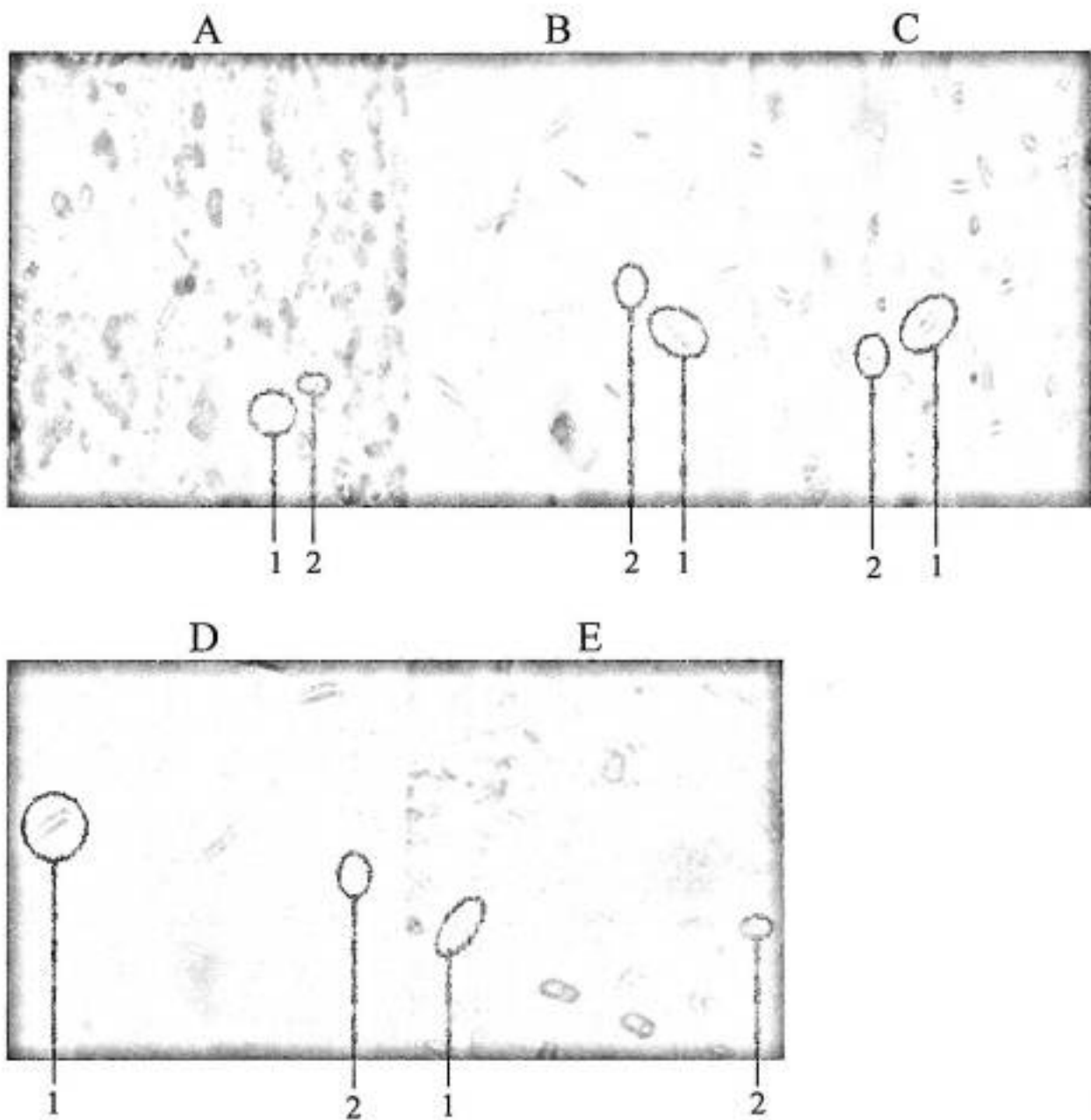
Gambar 6. Morfologi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (A) Isolat J. 51, (B) Isolat J. 42

Dibandingkan dengan isolat dari Jeneponto, isolat dari Pangkep memiliki ciri khas yang tersendiri. Isolat P.13 misalnya, koloninya yang berwarna putih kemudian berubah menjadi kekuningan dengan pertumbuhan miselium yang menyebar ke atas dan ke samping secara merata dan teratur serta memiliki miselium yang padat dan kasar (gambar 7.). Isolat P.22 pada awal pertumbuhannya berwarna putih kemudian berubah menjadi merah muda dengan pertumbuhan miselium yang menyebar ke atas, padat dan halus dengan tepi koloni yang tidak teratur (gambar 7.). Isolat P.31 dan P. 32 mulanya berwarna putih kemudian menjadi kekuningan, miselium menyebar ke samping secara merata dan teratur serta memiliki miselium yang padat dan halus (gambar 7.).



Gambar 7. Morfologi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (A) Isolat P.1.3, (B) Isolat P.2.2, (C) Isolat P.3.1

Selain perbedaan warna koloni, permukaan koloni, bau dan tepi koloni, juga terdapat perbedaan bentuk konidia dari isolat-isolat *Foc*. Bentuk konidia isolat-isolat *Foc* dari kedua daerah relatif sama. Makrokonidia berbentuk bulan sabit, relatif pendek dengan jumlah septa 3 – 6. Mikrokonidia berbentuk oval, berwarna bening dan tidak bersepta. Perbedaan bentuk konidia isolat *Foc* dapat dilihat pada gambar 8. berikut :



Gambar 8. Konidia *F.o.c* isolat J.22 (A), isolat J. 42 (B), isolat J. 52 (C), isolat J. 3 (D), dan isolat P. 31 (E).

Keterangan : 1. Makrokonidia
2. Mikrokonidia

Untuk dapat membedakan secara jelas karakteristik morfologi dari *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dapat dilihat pada tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1. Karakteristik morfologi isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Isolat	Warna koloni	Tepi koloni	Permukaan koloni	Bau	Jumlah septa
J.12	Koloni berwarna putih kemudian berubah menjadi merah muda	Teratur	Kasar	++	3-4
J. 13	Koloni berwarna putih kemudian berubah menjadi kekuningan	Teratur	Kasar	++	3-4
J.21 J.22	Koloni berwarna putih kemudian berubah menjadi kekuningan	Teratur	Kasar	++	3-4
J. 3 J.51 J.52	Koloni berwarna putih kemudian berubah menjadi orange	Teratur	Kasar	++	3-6
J.41 J.42	Koloni berwarna putih kemudian berubah menjadi merah muda	Teratur	Kasar	++	3-6
P. 13	Koloni berwarna putih kemudian berubah menjadi kekuningan	Teratur	Kasar	-	3-4
P. 22	Koloni berwarna putih kemudian berubah menjadi merah muda	Tidak teratur	Halus	-	3-4
P. 32 P. 31	Koloni berwarna putih kemudian berubah menjadi kekuningan	Teratur	Halus	-	3-4

Ket: ++: Bau alkohol, dan -: tidak berbau

Selain pengamatan morfologi berdasarkan warna koloni dan jumlah septa pada setiap konidia, juga diamati kecepatan pertumbuhan dan bau setiap isolat. Isolat yang berasal dari Jeneponto lebih cepat pertumbuhannya daripada isolat yang berasal dari Pangkep. Pertumbuhan maksimal (Φ 9 cm) diamati setelah 7 hari pada isolat dari Jeneponto, sedangkan pada isolat dari Pangkep belum menunjukkan pertumbuhan yang maksimal (Φ 7 cm). Isolat dari Jeneponto memiliki bau yang khas seperti tape

(odoratum), sedangkan isolat dari Pangkep tidak memberikan bau tape yang khas (inodoratum).

Perbedaan karakteristik morfologi cendawan tersebut menunjukkan adanya variasi pada setiap isolat dari masing-masing daerah tersebut. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sulistyowati dan Rustamsyah (1995). Berdasarkan senyawa volatile yang dihasilkan, karakterisasi isolat *Foc* asal Jawa dan Sumatera, terbagi dalam dua kelompok. Kelompok pertama berwarna ungu muda kemudian berubah menjadi ungu tua kemerahan-merahan setelah umur biakan 6 hari dan memiliki bau seperti tape (odoratum), sedangkan untuk kelompok kedua berwarna putih pada waktu masih muda dan menjadi putih kekuningan setelah umur biakan tua serta memiliki bau seperti tape (odoratum).

Pada metode ekstraksi DNA *Foc* dengan metode Moller, *et.al* (1992) dilakukan dengan cara fisik dan kimiawi. Oleh karena komponen penyusun dari dinding sel cendawan tersusun atas kitin dan selulosa, dimana keduanya merupakan suatu polisakarida yang tidak dapat larut dalam air, alkohol, asam lemak, dan larutan alkalis (Kartasapoetra, 1987), maka ekstraksi DNA dilakukan dengan penggerusan yang biasanya menggunakan pasir kwarsa dan nitrogen cair, setelah itu ditambahkan bahan kimia untuk keperluan ekstraksi yaitu buffer TES (Tris-EDTA-SDS) dan CTAB. Pemakaian buffer DNA yang mengandung EDTA tersebut dimaksudkan untuk menghilangkan ion magnesium yang sangat diperlukan untuk mempertahankan integritas keseluruhan selubung sel disamping dapat menghambat enzim seluler yang dapat merusak DNA (Russel, 1994) dan mengandung SDS yang merupakan jenis

detergen yang digunakan untuk membantu proses lisis sel dengan cara menghilangkan molekul lipid sehingga menyebabkan kerusakan dinding sel (Muladno,2000; Muhammad dan Praseno, 1991). CTAB yang digunakan dimaksudkan untuk menghasilkan DNA yang lebih baik.

Pada saat sel telah mengalami lisis, DNA yang diperoleh belum murni yaitu masih terdapat protein dan RNA dalam jumlah yang cukup besar dimana RNA tersebut berisosiasi kuat dengan DNA sehingga perlu dilakukan pembersihan debris sel yang biasanya dilakukan dengan penambahan RNase yang dapat memecah molekul RNA. Selain itu dilakukan penambahan fenol dengan tujuan untuk membersihkan protein dan sisa RNA yang masih ada, sehingga diperoleh molekul DNA yang jernih dalam bentuk supernatan.

Hasil ekstraksi DNA isolat *Foc* dapat dilihat pada gambar dibawah ini:

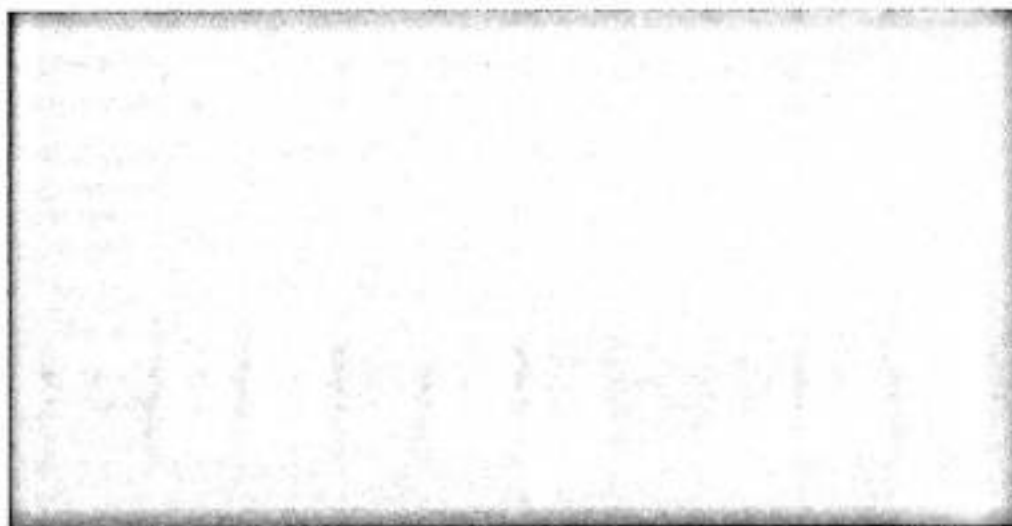


Gambar 9. DNA total isolat *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

Keterangan: Slot 1 – 9 Isolat dari Jeneponto (J. 12, J. 13, J. 21, J. 22, J. 3, J. 41, J. 42, J. 51, J. 52) dan Slot 10 – 13 Isolat dari Pangkep (P. 13, P. 22, P. 31, P. 32)

Hasil elektroforesis pada gel agarosa yang ditampilkan pada gambar 9 memperlihatkan pita-pita DNA yang telah bebas dari molekul lainnya. Pita-pita yang cukup terang menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh dalam jumlah yang cukup. Terdapat perbedaan secara kualitatif dari DNA yang diperoleh yang ditandai dengan tebal tipisnya pita yang muncul. Isolat P. 32 (slot 13) memperlihatkan konsentrasi atau kandungan DNA yang sangat tinggi sedangkan isolat P. 31 (slot 12) memperlihatkan konsentrasi atau kandungan DNA yang paling tipis. DNA murni yang diperoleh setelah diekstraksi, selanjutnya diamplifikasi menggunakan primer ERIC.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

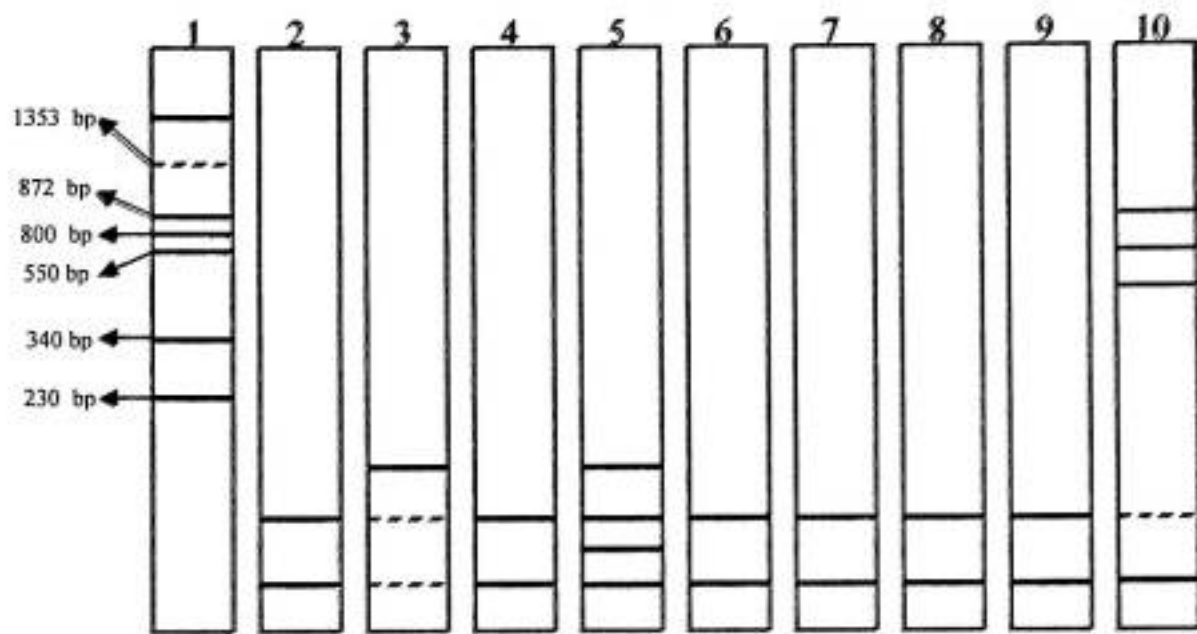


Gambar 10. Elektroforesis Produk DNA *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Menggunakan Primer ERIC

Keterangan: Slot 1: Marker, Slot 2 – 4 isolat Pangkep (P. 13, P. 31, P. 32), Slot 5 – 10 isolat Jeneponto (J. 12, J. 13, J. 22, J. 3, J. 42, J. 52).

Gambar 10 memperlihatkan hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer ERIC. Terjadinya amplifikasi pada bagian bawah berarti produk PCR memiliki ukuran atau fragmen yang kecil. Dari literatur yang diperoleh penggunaan primer ERIC akan mengamplifikasi fragmen berulang pada kisaran 100 bp- 6kb (Radermarker and De Bruijn, 2001) sedangkan ukuran fragmen DNA *Fusarium sp* berukuran 539 bp (V.Phaliip, *et al*, 2004). Pita yang muncul relatif beragam, namun kurang tajam disebabkan karena terbentuknya smier. Hal ini diduga akibat terikutnya minyak PCR pada saat proses loading untuk elektroforesis.

Untuk memperoleh gambaran yang lebih jelas dari amplicon yang diperoleh, selanjutnya dilakukan elektroforesis produk PCR dengan menggunakan gel Poly acrylamid 12%. penggunaan gel polyacrylamid 12% diharapkan dapat meningkatkan hasil resolusi elektroforesis melalui munculnya pita-pita yang berukuran kecil. Pola pita dapat dilihat pada gambar 11 di bawah ini:



Gambar 11. Elektroforesis Produk PCR *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Menggunakan Primer ERIC pada gel Poly acrylamid 12%.

Keterangan: Slot 1: Marker, Slot 2 – 5 isolat Pangkep (P. 13, P. 22, P. 31, P. 32), Slot 6 – 10 isolat Jeneponto (J. 12, J. 21, J. 3, J. 42, J. 52).

Dari hasil elektroforesis dengan menggunakan gel Polyacrylamid 12% memperlihatkan adanya pemisahan produk PCR yang lebih maksimal. Dari gambar 11 terlihat adanya 2 pita yang seragam untuk semua isolat pada ukuran dibawah 230 bp. Namun, terdapat pula 3 pita yang berukuran besar yaitu 872 bp, 550 bp dan antara 550 bp dengan 340 bp pada slot 10 (isolat . 52). Selain itu, terdapat variasi pita yang lain yaitu 3 pita pada slot 3 (isolat P.22) dan 4 pita pada slot 5 (isolat P. 32). Namun ukuran pita tersebut masih dibawah ukuran marker.

Tabel 2. Jarak genetik Isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* berdasarkan pola pita DNA hasil amplifikasi dengan metode Rep-PCR menggunakan primer ERIC

Isolat	2 P. 13	3 P. 22	4 P. 31	5 P. 32	6 J. 12	7 J. 22	8 J. 3	9 J. 42	10 J. 52
2 P. 13	0.0								
3 P. 22	0.2	0.0							
4 P. 31	0.0	0.2	0.0						
5 P. 32	0.33	0.14	0.33	0.0					
6 J. 12	0.0	0.2	0.0	0.33	0.0				
7 J. 22	0.0	0.2	0.0	0.33	0.0	0.0			
8 J. 3	0.0	0.2	0.0	0.33	0.0	0.0	0.0		
9 J. 42	0.0	0.2	0.0	0.33	0.0	0.0	0.0	0.0	
10 P. 52	0.43	0.5	0.43	0.34	0.43	0.43	0.43	0.43	0.0

Hasil analisis jarak genetik pada tabel 2, memperlihatkan variasi genetik yang lebih kecil pada isolat *Foc* yang berasal dari Kab. Pangkep. Hal ini ditandai dengan jarak genetik isolat tersebut dengan nilai d_{ab} terendah adalah 0 dan nilai d_{ab} tertinggi adalah 0,33, sedangkan isolat dari Jeneponto memperlihatkan variasi yang lebih besar dengan nilai d_{ab} terendah adalah 0 dan nilai d_{ab} tertinggi adalah 0,43.

Terdapat variasi yang lebih besar antara isolat yang berasal dari Kab. Pangkep dengan Kab. Jeneponto dengan nilai d_{ab} tertinggi 0,5. Hal ini menunjukkan bahwa

isolat yang berasal dari kedua daerah tersebut memiliki tingkat keragaman yang besar.

Timbulnya variabilitas oleh *Foc* dapat dipengaruhi oleh suatu interaksi yang kompleks antara patogen dan inang (West *et. al.*, 2001). Selain secara genetik cendawan memiliki sejumlah mekanisme yang menyebabkan timbulnya variasi dalam satu spesies. Mekanisme tersebut termasuk mutasi, hibridisasi, heterokariosis dan adaptasi sitoplasma. Akibat teradinya perubahan sifat pada patogen penyebab penyakit tumbuhan yang selanjutnya menimbulkan biotipe-biotipe, strain-strain atau ras-rasa baru yang secara morfologi tidak dapat dibedakan (Sastrahidayat, 1992).

Variasi genetik dari *Foc* dapat dideteksi berdasarkan kelompok Vegetatif kompartilintasnya (VCGs). Namun, dengan metode VCGs hanya sedikit variasi genetik yang dihasilkan karena pola pita DNA setiap isolat yang digunakan secara umum spesifik untuk analisis perbandingannya. Hasil pengamatan yang dilakukan oleh Bontley, *et. al.* (1998) menemukan kelompok vegetatif kompartilintas (VCGs) isolat *Foc* yang berasal dari Australia, India, Indonesia, Malaysia dan Filipina menunjukkan kelompok genotif yang sama yaitu kelompok VCGs 0120, 0126 dan 01211.

Deteksi keberadaan *Foc* dapat pula dilakukan dengan analisis RAPD. Hasil pengamatan yang dilakukan oleh Sinaga dan Maemunah (2004) dengan metode RAPD melaporkan bahwa isolat *Foc* berasal dari Medan Cianjur termasuk dalam ras 1 dan 2, sedangkan isolat *Foc* yang berasal dari Lampung memiliki indikasi kuat sebagai ras 4.

Metode Repetitive sekuens PCR (Rep-PCR) telah banyak digunakan untuk jenis strain bakteri dan untuk karakterisasi hubungan genotip dari isolat *Fusarium* (Redkar, RJ, *et al.*, 1996). Menurut Kontoyiannis, *et al* (2003) metode Rep-PCR dapat diperoleh data dengan mudah, akurat dan lebih cepat.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa:

- Secara morfologi isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dari Jeneponto dan Pangkep menunjukkan perbedaan yang nyata, baik dari segi warna koloni, bentuk pertumbuhan, maupun bau yang dihasilkan.
- Isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dari Kab. Pangkep memiliki variasi yang lebih kecil dibandingkan isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dari Kab. Jeneponto.
- Terdapat variasi genetik yang lebih besar antara kedua daerah tersebut dengan nilai d_{ab} 0,5.

V.2 Saran

- Untuk mengetahui keragaman genetik dari *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* lebih detail, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah isolat dan jenis primer yang lebih banyak

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2005. **Pemetaan Daerah Rawan (Endemis) OPT Buah di 8 Kabupaten Sentra Buah di Sulawesi Selatan**, Departemen Pertanian dan Hortikultura Propinsi Sulawesi Selatan, Makassar
- Bentley, S. *et. al.*, 1998. **Genetic Variation Among Vegetative Compability Groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Analyzed by DNA Fingerprinting**, Tropical Plant Pathology, The University of Queensland.
- Blaber, M., 1998. **Polymerase chain reaction (PCR)**. <http://wine1.sb.fsu/bch5425/lect22/lect22.htm> (22 Oktober 2004)
- Campbell, N.A., B.R. Jane, G.M. Lawrence, 2000. **Biologi** jilid 1 edisi kelima. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Chisholm, Rex L., 1992. **Molecular biology**. http://dicty.cmb.nwu.edu/Chis_lab/Lab20%20Manual/molecular_biology.htm (18 Juni 2004)
- Cook, A, A., 1975. **Disease of Tropical and Sub Tropical Fruits and Nuts**, Hoffner Press, New York
- Dwidjoseputro, D., 1978. **Pengantar mikologi**. Penerbit Alumni. Bandung
- Hatta, M., 2002. **Teknik isolasi dan pengukuran DNA**. Dibawakan pada Seminar Teknik Isolasi DNA. Makassar.
- Jedryczka, M., T. Rouxel, M.H. Balesdent, 1999. **Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland**. European Journal of Plant Pathology 105: 813-823. Kluwer Academic Publisher.
- Kontoyiannis. D, *et al.*, 2003. ***Fusarium* Discrimination Automated Rep-PCR DNA Fingerprinting**. The University Of Texas, Anderson Cncer Center. Houston.
- Karsinah, Sunyoto, Jumjunidang dan Nurhadi., 1999. **Teknik Kultur Double layer untuk seleksi in-vitro pisang tahan terhadap *Fusarium oxysporum***. Jurnal Holtikultura.

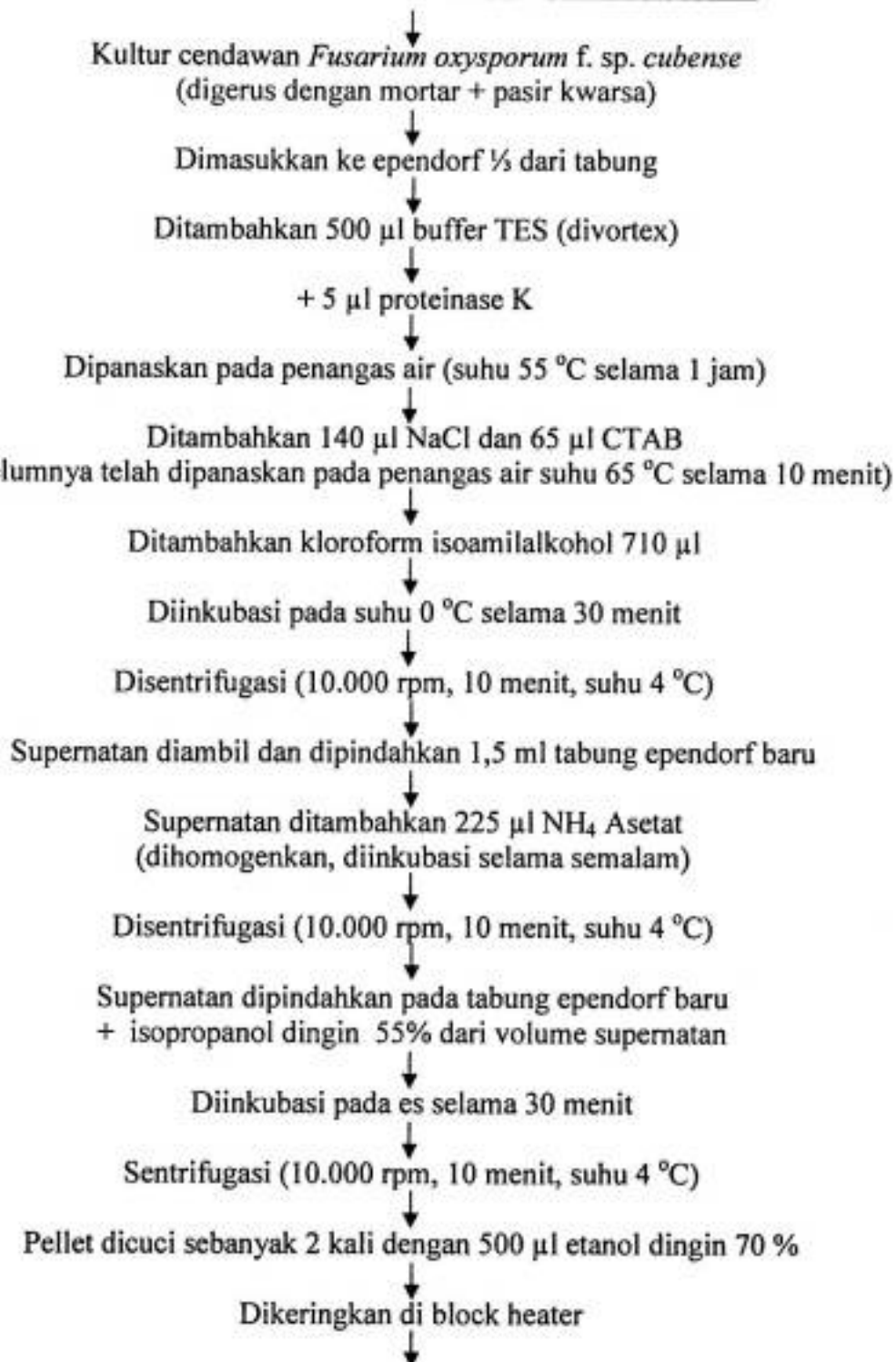
- Lucas B Goerge, *et al.*, 1982. **Introduction to Plant Diseases (Identification and management) second edition**. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Mahuku, G.S, R. Hall, P.H. Goodwin, 1996. **Co-infection and induction of systemic acquired resistance by weakly and highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape**. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49, 61-72.
- Mordechai, E., 1999. **Application of PCR the methodologies ini molecular diagnostic**. Burlington Country, USA.
- Muladno, 2002. **Seputar teknologi rekayasa genetika**. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.
- Nasir, M., 2002. **Bioteknologi molekuler, teknik rekayasa genetika tanaman**. PT. Citra Aditya Bakti. Bandung.
- Nei, M., and Li, W. M., 1979. **Mathematical Model For Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonuclease**, *Proc. Natl. Acad. Sci*
- Nelson, P. E., 1981. **Life Cycle and Epidemiology of *Fusarium oxysporum* in Mace**. Academic Press, Inc.
- O'Donnell., Cigelnik., 1998. **A DNA Sequence-Based Phylogenetic Structure For The *Fusarium oxysporum* Complex**. Abstracts Papers Presented At A workshop, International Convention Center. Jerusalem. Israel.
- Rademarker, J. L. W., and The Bruijn, F. J., 2001. **Characterization and Clasification of Microbes by Rep-PCR Genomic Fingerprinting and Computer-Assisted Pattern Analysis**, Michigan State University, USA.
- Redkar, RJ, *et al.*, 1996. **DNA Fingerprinting Of *Candida rugosa* Via Repetitive sequence-Based PCR**. *J.Clin, Microbiol.*
- Sastrahidayat, I R., 1990. **Ilmu Penyakit Tumbuhan. Usaha Nasional**, Surabaya
- Satuhu, S dan A. Supriyadi, 1999. **Pisang : Budidaya, Pengelolaan, dan Prospek Pasar**. Penebar Swadaya, Jakarta.

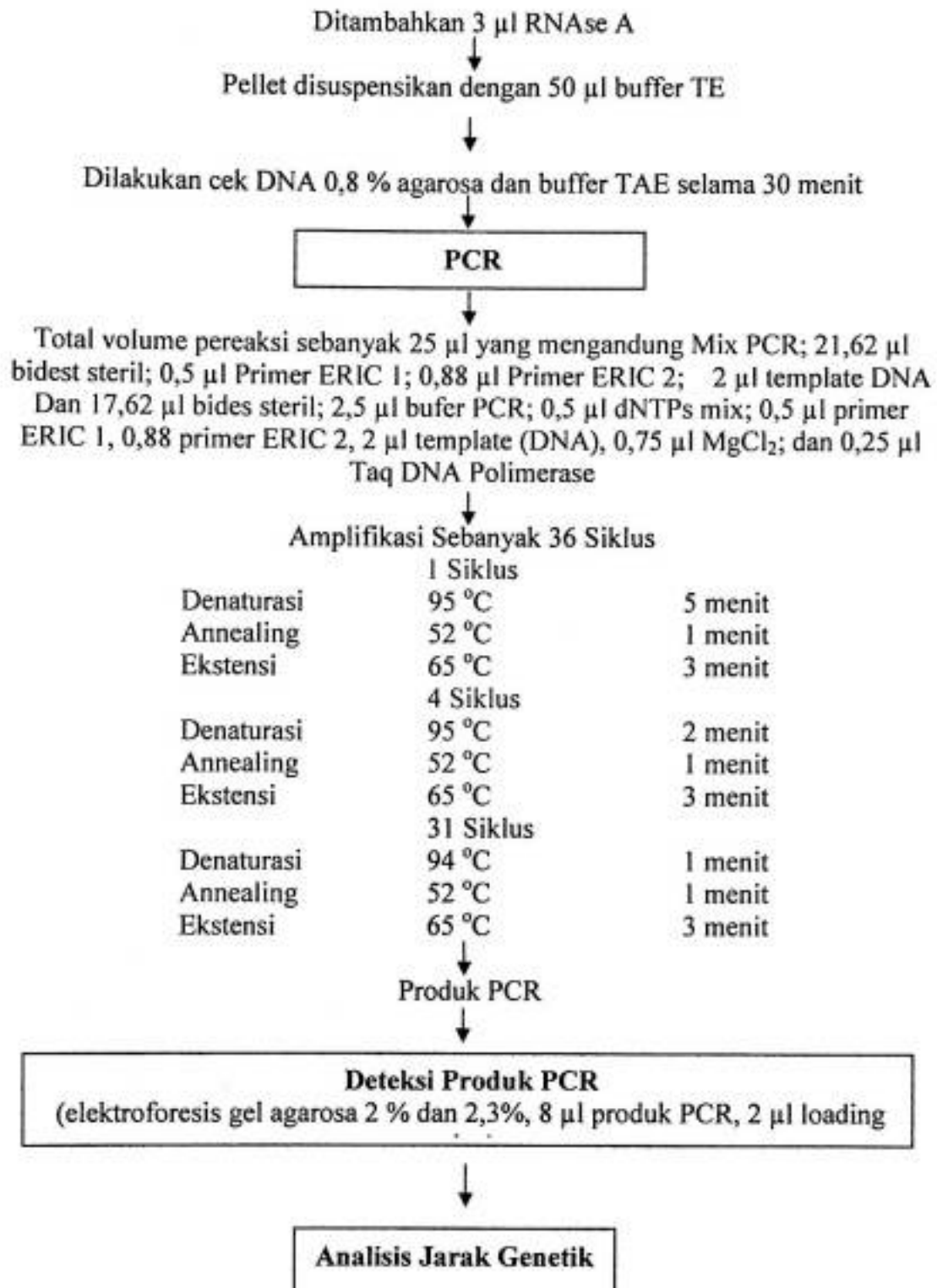
- Schafer, C dan Wostemeyer J., 1994. **Molecular Diagnosis of Rapeseed Pathogen *Leptosphaeria maculans* Based on RAPD-PCR**. In: Schots A., Dewey FM., Oliver R., eds. **Modern Assay For Plant Pathogenic Fungi : Identification and Quantification**. Wallingford, UK : CABI
- Scleif, R., 1986. **Genetics and molecular biology**. Benjamin Publishing. Canada.
- Semangun, H., 1989. **Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia**. Gajah Mada University Press, Yogyakarta
- Sinaga, M. S., dan Maimunah, 2004. **Ketahanan Lima Kultivar Pisang Tiga Macam Isolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Penyebab Layu** Jurnal Ilmiah Pertanian KULTURA.
- Singh, Kuwant, *et al.*, 1991. **An Illustrated Manual On Identification Of Some Seed-Borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *penicillia* And Their Mycotoxins**. Institute of Seed Pathology. Denmark.
- Steen, S.W., 1999. **Handbook for DNA isolation, RAPD-PCR and PCR-RFLP**. Botanical Garden and Museum. University of Oslo
- Suhardiman, P., 2002. **Budidaya Pisang Cavendish**, Kanisius, Jakarta
- Sunarjono, H, H., 2002. **Budidaya Pisang Dengan Bibit Kultur Jaringan**. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Suryo, 2003. **Genetika Manusia**, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Synder dan Hansen, 1940. http://www.deptan.90.id/ditlinhotri/opt/pisang/layu_fusarium.htm. 4-02-05.
- Tjitrosoepomo, G., 2002. **Taksonomi tumbuhan (spermatophyta)**. Gajah Mada University Press. Yogyakarta
- Toha, A. H., 2001. **Deoksi Nukleac Acid Ekspresi, Rekayasa, Keanekaragaman, Efek Pemanfaatannya**, Alfabeta, Bandung
- Voight, K., S. Schleier, J. Wöstemeyer, 1995. **Molecular analysis of mixed fungal infection on oilseed rape (*Brassica napus*)**. Microbiol. Res. 150 in press. <http://www.fgsc.net/ecfg/ecfg4.html>.
- Yatim, W., 2000. **Genetika**, Torsito, Bandung.

LAMPIRAN 1:

SKEMA KERJA

Ekstraksi dan Purifikasi DNA Cara Moller (1992)





LAMPIRAN 2

BAHAN-BAHAN EKSTRAKSI DAN PURIFIKASI DNA

1. Buffer TES
 - 0,1 M tris base pH 8,0
 - 10 mM EDTA
 - 2% SDS
2. NaCl 5 M
3. Buffer TE
 - 10 mM tris pH 8,0
 - 1 mM EDTA
4. CTAB
 - 10% CTAB
 - 0,7 M NaCl
 - 1x bufer TE
5. NH₄ asetat : 5 M
6. TAE : 40 Mm Tris-Acetate, 1 Mm EDTA pH 8
7. Kloroform isoamylalkohol (24 : 1)

LAMPIRAN 3

BAHAN-BAHAN PCR

1. Mix PCR
2. 21,62 μ l dan 17,62 μ l bidest steril
3. 2,5 μ l bufer PCR
4. 0,5 μ l Primer ERIC 1
5. 0,88 μ l Primer ERIC 2
6. 2 μ l Template DNA
7. 0,5 μ l dNTPs mix
8. 0,75 μ l MgCl₂
9. 0,25 μ l Taq DNA Polimerase.

LAMPIRAN 4

BAHAN-BAHAN ELEKTROFORESIS GEL AGAROSA

1. Buffer TAE 10x
 - 0,1 M Tris - Asam Acetat 4,8456 gr pH 8,0
 - EDTA 0,37224 gr
 - 100 ml bidest steril
2. Larutan pewarna
 - 0,5 μ l Ethidium bromida (EtBr)
 - 100 ml bidest steril
3. Gel agarosa 0,8% untuk DNA total
 - 0,16 gr agarosa
 - 20 ml TAE
4. Gel agarosa 2 % untuk hasil PCR
 - 0,66 gr agarosa
 - 33 ml TAE 1x

LAMPIRAN 5

BAHAN-BAHAN ELEKTROFORESIS GEL

POLIACRYLAMID 12%

1. Buffer TBE 10x

- 0,1 M Tris 5,4 gr
- Asam Boric 2,76 gr pH 8,0
- EDTA 0,46 gr
- 100 ml bidest steril

2. Gel Poliacrylamid

- Acrylamid 19 gr
- Bis acrylamid 1 gr
- Temed 4,17 ml
- APS 10%
- Bides 100 ml

2. Larutan pewarna

- 0,5 μ l Ethidium bromida (EtBr)
- 100 ml bidest steril

LAMPIRAN 6

NCBI Sequence Viewer v2.0

My NCBI
[Sign In] [Register]

[PubMed](#) [Nucleotide](#) [Protein](#) [Genome Structure](#) [PMC](#) [Taxonomy](#) [Sitemap](#) [Books](#)

Search for

You need JavaScript to work with this page.

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display Show

Range: from to Reverse complemented strand Features:

1: [AY842395](#). [Reports](#) [Fusarium sp. 04M](#) [Links](#)
...[gi:62131072]

LOCUS AY842395 539 bp DNA linear
PLN 30-NOV-2005

DEFINITION *Fusarium sp. 04M* 160 small subunit ribosomal RNA gene,
partial
sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S
ribosomal RNA gene,
and internal transcribed spacer 2, complete sequence;
and large
subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION AY842395
VERSION AY842395.1 GI:62131072
KEYWORDS .
SOURCE *Fusarium sp. 04M* 160
ORGANISM *Fusarium sp. 04M* 160
Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Pezizomycotina;
Sordariomycetes;
Hypocreomycetidae; Hypocreales; mitosporic
Hypocreales; *Fusarium*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 539)
AUTHORS Phalip,V., Hatsch,D. and Jeltsch,J.-M.
TITLE Global insight of fungal community diversity in
diseased hop
plantations
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 539)
AUTHORS Phalip,V., Hatsch,D. and Jeltsch,J.-M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-NOV-2004) *Phytopathology*, ESBS, UMR
7100, CNRS-ULP,
Boulevard Sebastien Brandt, BP 10413, Illkirch-
Graffentaden
F-67412, France

```

FEATURES             Location/Qualifiers
    source            1..539
                     /organism="Fusarium sp. 04M 160"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="04M 160"
                     /specific_host="Humulus lupulus"
                     /db_xref="taxon:318659"
    misc RNA          <1..>539
                     /note="contains small subunit ribosomal RNA,
internal            transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA,
internal            transcribed spacer 2 and large subunit
ribosomal RNA"
ORIGIN
    1 tctctcgctt attgatatgc ttaagttcag cgggtattcc tacctgatcc
gaggtcaaca
    61 ttcagaagtt ggggtttaac ggcgtggccg cgtcgattac cagtaacgat
gtgtaaatta
    121 ctacgctatg gaagctcgac gtgaccgcca atcaatttgg ggagtgttaa
ctaaaacagc
    181 tcccaacacc aagctgggct tgagggttga aatgacgctc gaacaggcat
gcccgccaga
    241 atactggcgg gcgcaatgtg cgttcaaaga ttcgatgatt cactgaattc
tgcaattcac
    301 attacttata gcattttgct gcgttcttca tcgatgccag aaccaagaga
tccgtttgtg
    361 aaagttttga tttatttgtt tttttactca gaagttccac taaaaacaga
gtttaggggt
    421 cctgcggcgg gccgttcctg gaggaacggg ctgatccgcc gaggcaacat
agaggtatgt
    481 tcacaggggt ttgggagttg taaactcggg aatgatccct ccgcaggttc
agctacgga
//

```

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)