

DETEKSI BAKTERI RHIZOSFER KELAPA SAWIT DI TANAH MINERAL MENGGUNAKAN METODE *PCR-RISA*

DETECTION OF RHIZOSPHERE BACTERIA OF OIL PALM AT MINERAL SOIL USING PCR-RISA METHOD

Achmad Himawan* dan Hangger Gahara Mawandha

Prodi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, INSTIPER Yogyakarta
Jl. Nangka II, Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta 55282

*E-mail korespondensi: achmad.himawan@instiperjogja.ac.id

ABSTRACT

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jack.) plantation is the biggest plantation in Indonesia. Indonesia is the biggest Crude Palm Oil (CPO) in the world since 2017. To maintain oil palm productivity is needed soil fertility research, especially rhizosphere bacteria. The aim of this research is to detect rhizosphere bacteria in mineral soil at oil palm plantation in Riau. Detection the bacteria used Polimerase Chain Reaction-Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (PCR-RISA) method. The research result showed that there is one bacterium species in the mineral soil.

Keywords: rhizosphere bacteria, oil palm, mineral soil, PCR-RISA

PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jack.) banyak dibudidayakan di Indonesia. Luas lahan perkebunan sawit mencapai 11.260.277 hektar pada tahun 2015. Dari luas lahan tersebut dapat dihasilkan 31.070.015 ton minyak sawit. Bahkan pada tahun 2017 diperkirakan mencapai 12.307.677 hektar dan dapat menghasilkan 35.359.384 ton minyak sawit (Anonim, 2016). Oleh karena itu, Indonesia menjadi negara pengekspor *Crude Palm Oil (CPO)* terbesar di dunia. Penghasil devisa terbesar di Indonesia sekarang adalah ekspor

CPO yang mengalahkan ekspor minyak bumi. *Crude Palm Oil* dapat diolah lebih lanjut menjadi bahan jadi yang banyak dipakai oleh manusia. Contoh bahan jadi adalah minyak goreng, sabun dan kosmetika. Untuk mendukung keberlanjutan budi daya kelapa sawit, perlu adanya penelitian tentang kesuburan tanah. Salah satu indikator kesuburan tanah adalah adanya mikrobia atau bakteri rhizosfer. Istilah rhizosfer diciptakan oleh Hiltner pada tahun 1904. Istilah ini menggambarkan bagian tanah, tempat mikroorganisme hidup dengan

pengaruh sistem perakaran (Berg & Smalla, 2009).

Penelitian tentang bakteri rhizosfer pada kelapa sawit telah banyak dilakukan antara lain oleh Abdullah *et al.* (2005), Chyng (2012), Seung *et al.* (2015) dan Shamsilawani *et al.* (2017) di Malaysia. Di Indonesia juga ada beberapa peneliti yang penelitiannya tentang bakteri rhizosfer antara lain Susanti (2014), Situmorang *et al.* (2016), Panggabean *et al.* (2016), Anandyawati *et al.* (2017) dan Wafa (2017). Penelitian bakteri rhizosfer dengan menggunakan metode *PCR-RISA* belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian bakteri rhizosfer dengan metode *PCR-RISA*. Metode *PCR-RISA* pertama kali diperkenalkan oleh Yu & Mohn (2001). Mereka memakai metode tersebut untuk mendeteksi diversitas bakteri di Laguna. Laguna (atau *lagoon* dalam bahasa Inggris) adalah sekumpulan air asin yang terpisah dari laut oleh penghalang yang berupa pasir, batu karang atau semacamnya (Anonim, 2018). Himawan (2015) dan Himawan & Subandiyah (2017) pernah memakai metode *PCR-RISA* untuk mendeteksi bakteri endosimbion pada serangga *Diaphorina citri*. Penelitian ini bertujuan untuk

mendeteksi bakteri rhizosfer kelapa sawit pada tanah mineral dengan menggunakan metode *PCR-RISA*.

METODE PENELITIAN

Tempat dan waktu

Penelitian dilakukan di kebun kelapa sawit sebanyak 1 kapling (1 kapling = 2 hektar). Tanah kapling itu termasuk ke dalam kelompok tani 314 *Group Manager* Amanah, Desa Trimulya Jaya, Kecamatan Ukui, Kabupaten Pelalawan, Propinsi Riau. Waktu pengambilan sampel tanah yaitu bulan April 2018 dan deteksi bakteri rhizosfer tanah dilakukan di laboratorium CV. Agri Bio Tech Yogyakarta pada bulan Mei 2018.

Bahan dan alat

Bahan yang dipakai adalah tanah di sekitar perakaran kelapa sawit, *PowerSoil® Isolation Kit*, *MOBIO Laboratories, Inc.* untuk ekstraksi bakteri rhizosfer dari tanah, *master mix PCR GoTaq Green (Promega)*, akuabides steril, primer *RISA*, gel agarosa, *TBE 1X*, etidium bromida dan marka *DNA 100* pasang basa (pb). Alat yang digunakan adalah tabung ependorf 0,2 ml untuk *PCR*, *yellow tip*, mikropipet, *autoclave*, *microcentrifuge*, mesin *PCR*, alat elektroforesis MUPID,

UV transilluminator dan kamera digital.

Cara penelitian

1. Pengambilan sampel bakteri rhizosfer

Dilakukan sampling 5 tanaman dari populasi tanaman kepala sawit dalam 1 kapling = 2 hektar. Tanaman kelapa sawit berumur sekitar 18 tahun. Sampling dilakukan dengan cara membuat garis imajiner secara diagonal dari sudut ke sudut yang berseberangan, sehingga akan ditemukan satu tanaman di tengah-tengah kapling. Selanjutnya, ditentukan tanaman di antara tanaman di tengah-tengah kapling dan sudut kapling. Akan ditemukan 4 tanaman lainnya. Jadi total ada 5 tanaman sampel. Pengambilan contoh tanah di sekitar perakaran kelapa sawit menggunakan parang pada kedalaman 0-10 cm. Untuk setiap tanaman diambil 4 titik pengambilan tanah berdasarkan arah mata angin (utara, selatan, barat, timur). Jarak titik pengambilan contoh tanah dengan pangkal batang adalah 2 meter. Contoh tanah dari ke-4 titik dicampur dan dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi keterangan dengan spidol permanen. Ada 5 sampel tanah yang berasal dari 5 tanaman sampel.

Selanjutnya contoh-contoh tanah tersebut dibawa ke laboratorium CV. Agri Bio Tech untuk analisis bakteri rhizosfer. Sebelum dilakukan ekstraksi DNA bakteri rhizosfer, contoh tanah tersebut disimpan dalam kulkas ($\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2. Ekstraksi DNA bakteri rhizosfer

Dilakukan ekstraksi DNA bakteri rhizosfer menggunakan *PowerSoil[®] Isolation Kit, MOBIO Laboratories, Inc.* Contoh tanah sebanyak 0,2 g dimasukkan ke tabung *PowerBead* dan digojok dengan tangan. Ditambahkan *Solution C1* sebanyak 60 μl dan tabung digojok dengan tangan selama 10 menit. Tabung disentrifus dengan kecepatan 9.500 rpm selama 1 menit. Supernatan sebanyak 500 μl dipindah ke tabung 2 ml. Ditambahkan *Solution C2* sebanyak 250 μl dan digojok dengan tangan selama 10 detik. Tabung tersebut disimpan pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit. Tabung disentrifus selama 1,5 menit dengan kecepatan 9.500 rpm. Supernatan sebanyak 600 μl dipindah ke tabung 2 ml. Ditambahkan *Solution C3* sebanyak 200 μl dan digojok dengan tangan selama 10 detik. Tabung disimpan pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit. Tabung disentrifus selama 1,5 menit dengan kecepatan 9.500 rpm.

Supernatan sebanyak 750 µl dipindah ke tabung 2 ml. Ditambahkan *Solution C4* sebanyak 1,2 ml dan tabung digojok dengan tangan selama 10 detik. Larutan sebanyak 650 µl dimasukkan ke *Spin Filter* dan disentrifus dengan kecepatan 9.500 rpm selama 1,5 menit. Larutan yang lewat saringan dibuang dan larutan supernatan dan *Solution C4* dimasukkan lagi ke *Spin Filter* sebanyak 650 µl. *Spin Filter* disentrifus dengan kecepatan 9.500 rpm selama 1,5 menit. Larutan yang lewat saringan dibuang dan sisa larutan supernatan dan *Solution C4* dimasukkan lagi ke *Spin Filter*. *Spin Filter* disentrifus dengan kecepatan 9.500 rpm selama 1,5 menit. Larutan yang lewat saringan dibuang dan *Solution C5* dimasukkan ke *Spin Filter* sebanyak 500 µl. *Spin Filter* disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 9.500 rpm. Larutan yang lewat saringan dibuang. *Spin Filter* disentrifus lagi selama 1 menit dengan kecepatan 9.500 rpm. *Spin Filter* dengan hati-hati dipindah ke tabung 2 ml. Jangan sampai ada percikan *Solution C5* masuk ke *Spin Filter*. *Solution C6* sebanyak 100 µl dimasukkan ke tengah-tengah membran filter putih. *Spin Filter* dan tabung 2 ml disentrifus selama 1 menit

dengan kecepatan 9.500 rpm. *Spin Filter* dibuang dari tabung 2 ml. Di dalam tabung 2 ml terdapat larutan DNA sebanyak 100 µl. Apabila tidak segera di *PCR* maka tabung berisi DNA bakteri rhizosfer disimpan dalam *freezer* – 20 °C.

3. Penggandaan potongan DNA bakteri rhizosfer dengan PCR-RISA

Master-mix PCR yang dipakai adalah *GoTaq® Green 2x* (Promega), dengan sepasang primer universal S926f (5'-CTY AAA KGA ATT GAC GG-3') dan L189r (5'-CTG AGA TGY TTM ART TC-3'). Volume total larutan adalah 25 µl yang mengandung masing-masing primer 2 µl, akuabides steril 6,5 µl dan DNA sampel 2 µl. Mesin PCR diprogram sebagai berikut: satu siklus denaturasi awal pada 95°C selama 2 menit; 30 siklus yang terdiri atas tahap denaturasi pada 94°C selama 0,5 menit, tahap annealing pada 47°C selama 0,5 menit dan tahap pemanjangan pada 72°C selama 2 menit; satu siklus pemanjangan pada 72°C selama 5 menit (Yu & Mohn, 2001).

4. Visualisasi pita-pita DNA hasil PCR-RISA

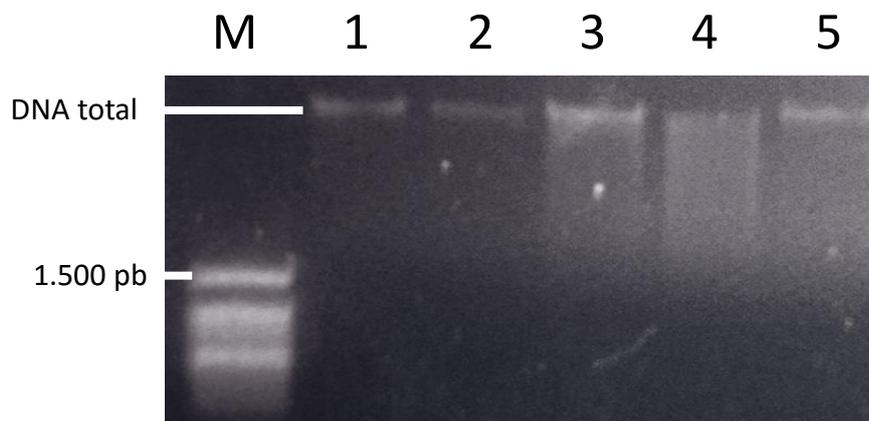
Visualisasi produk *PCR-RISA* menggunakan gel agarosa gel 2% dengan penambahan pewarna etidium

bromida. Elektroforesis dilakukan dalam larutan TBE 1x dalam wadah MUPID, tegangan listrik 100 Volt selama 30 menit. Gel agarosa diletakkan di atas *UV transilluminator*. Pita-pita *DNA* yang tampak didokumentasikan dengan kamera digital.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap pertama untuk deteksi bakteri rhizosfer adalah ekstraksi *DNA* menggunakan *PowerSoil® Isolation Kit*. Hasil ekstraksi *DNA* dicek secara

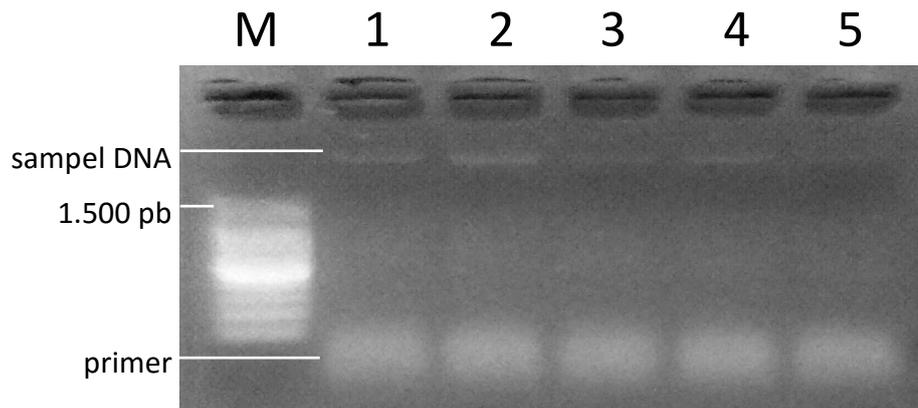
kualitatif menggunakan gel agarosa (gambar 1). Dari ke-5 sampel tanah mineral tampak adanya pita *DNA* total bakteri rhizosfer, walaupun tampak adanya *smear* pada sampel nomor 3 dan 4. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan *PowerSoil® Isolation Kit* untuk ekstraksi *DNA* bakteri rhizosfer dinyatakan berhasil. Cara ini cukup membutuhkan sampel tanah sebanyak 0,2 g. Hal ini berarti pengambilan sampel tanah tidak begitu merusak perakaran tanaman kelapa sawit.



Gambar 1. Visualisasi hasil ekstraksi *DNA* total bakteri rhizosfer tanaman kelapa sawit. Keterangan: M = marka *DNA* 100 pb; 1 – 5 = sampel tanah nomor 1 – 5.

Tahap selanjutnya adalah deteksi bakteri rhizosfer menggunakan metode *PCR-RISA*. Sampel *DNA* langsung dipakai untuk *PCR* tanpa pengenceran. Ternyata hasilnya tidak

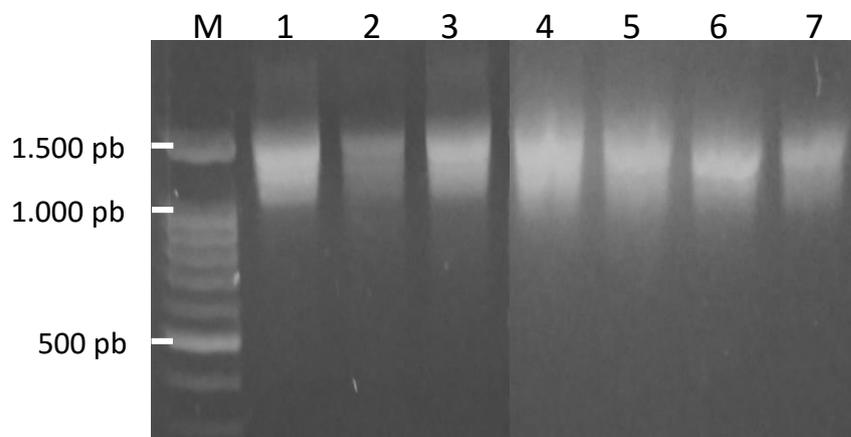
memuaskan karena tidak terjadi penggandaan pita *DNA* pada semua sampel tanah (gambar 2). Oleh karena itu perlu dilakukan pengenceran sampel *DNA*.



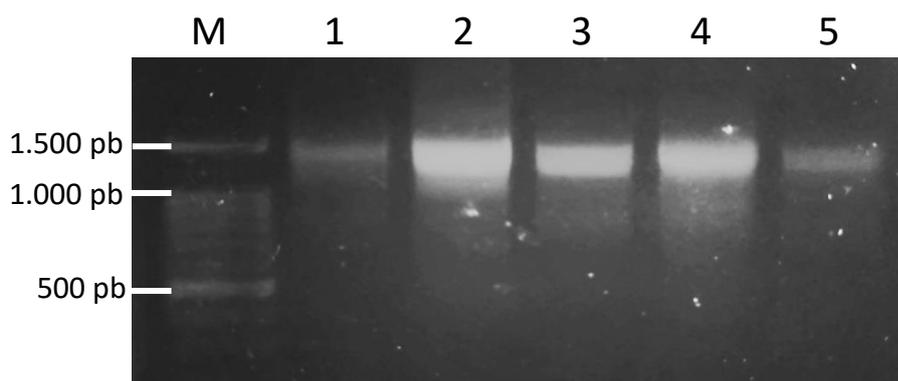
Gambar 2. Visualisasi tidak terjadinya penggandaan pita-pita *DNA* bakteri rhizosfer tanaman kelapa sawit. Keterangan: M = marka *DNA* 100 pb; 1 – 5 = sampel tanah nomor 1 – 5.

Awalnya sampel *DNA* bakteri tanah nomor 1 yang dipakai untuk uji pengenceran. Dilakukan pengenceran sampel *DNA* mulai dari 20x, 30x, 40x, 50x, 70x, 90x sampai 100x. Selanjutnya hasil pengenceran dipakai untuk *PCR*. Hasil visualisasi produk *PCR* menunjukkan bahwa sampai

pengenceran 100x, masih ada penggandaan pita *DNA* (gambar 3). Setelah membandingkan hasilnya maka yang dipakai untuk *PCR-RISA* seterusnya adalah pengenceran 100x. Selanjutnya sampel *DNA* bakteri tanah nomor 1 sampai 5 diencerkan 100x dan dipakai untuk *PCR-RISA*.



Gambar 3. Visualisasi penggandaan pita-pita *DNA* bakteri sampel tanah nomor 1 dengan berbagai variasi konsentrasi pengenceran. Keterangan: M = marka *DNA* 100 pb; 1 = $1/20x$; 2 = $1/30x$; 3 = $1/40x$; 4 = $1/50x$; 5 = $1/70x$; 6 = $1/90x$; 7 = $1/100x$



Gambar 4. Visualisasi pita-pita DNA produk *PCR-RISA* dari sampel DNA bakteri tanah nomor 1 – 5. Keterangan: M = marka DNA 100 pb; 1 – 5 = sampel tanah nomor 1 – 5.

Hasil penggandaan pita DNA bakteri dari sampel tanah nomor 1 - 5 terlihat bahwa ada satu pita DNA yang terletak di antara 1.000 – 1.500 pasang basa (pb) (gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa pemakaian metode *PCR-RISA* bisa digunakan untuk deteksi bakteri rhizosfer. Walaupun dalam penelitian ini hanya menunjukkan satu pita DNA, yang berarti mewakili satu spesies. Spesies ini belum diketahui namanya karena pita DNA yang terbentuk belum di sekuensing. Menurut Januar *et al.* (2014) ada lebih dari satu genus bakteri dominan dalam tanah dengan menggunakan metode *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP)*. Genus bakteri dominan tersebut adalah *Bacillus*, *Aeromonas*, *Deinococcus*, *Pseudomonas*,

Marinobacter, *Flavobacterium*, *Maribacter*, *Tannerella*, dan *Exiguobacterium*. Berdasarkan metode *TRFLP* dapat ditentukan juga 14,5% komunitas bakteri dapat dikultur dan 85,5% komunitas bakteri belum dapat dikultur. Seung *et al.* (2015) menyatakan bahwa bakteri rhizosfer pada tanaman kelapa sawit terdiri atas genus *Pseudomonas*, *Bacillus* dan *Burkholderia*. Penelitian Situmorang *et al.* (2016) dengan memakai metode *TRFLP* menunjukkan bahwa genus *Clostridium*, *Burkholderia*, *Catenibacterium* dan *Pasteuria* yang mendominasi terutama di tanah gambut pada perkebunan kelapa sawit di Sumatra.

Ada beberapa kemungkinan mengapa dalam penelitian ini hanya ada satu bakteri rhizosfer. Kemungkinan pertama adalah cara

penyimpanan sampel tanah yang kurang tepat. Menurut Husen (2007), suhu penyimpanan sampel tanah adalah 2 – 4 °C, untuk penyimpanan sampai 4 minggu dan suhu - 20 °C biasanya digunakan untuk penyimpanan contoh tanah dalam jangka panjang. Pada penelitian ini, sampel tanah disimpan di dalam kulkas +10 °C selama 4 minggu (satu bulan). Akibatnya banyak bakteri rhizosfer yang mati.

Kemungkinan kedua adalah primer universal *RISA* yang dipakai belum cocok untuk penggandaan *DNA* bakteri rhizosfer. Ada beberapa peneliti yang menggunakan primer *RISA* yang berbeda. Kemungkinan ketiga adalah gel agarosa tidak tepat untuk elektroforesis produk *PCR-RISA* karena ukuran pori-porinya relatif besar sehingga belum bisa untuk memisahkan pita-pita *DNA* yang berat molekulnya berdekatan. Sebaiknya untuk memisahkan pita-pita *DNA* yang berdekatan menggunakan gel poliakrilamida.

KESIMPULAN DAN SARAN

Ekstraksi *DNA* total bakteri rhizosfer tanah mineral pada tanaman kelapa sawit dapat menggunakan *PowerSoil® Isolation Kit*. *DNA* total bakteri rhizosfer harus diencerkan 100x agar dapat di *PCR* dengan bagus. Deteksi bakteri rhizosfer di tanah mineral dengan metode *PCR-RISA* menunjukkan ada satu spesies bakteri rhizosfer, namun belum diketahui nama spesiesnya.

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah menggunakan primer *RISA* yang berbeda, elektroforesis produk *PCR* dengan gel poliakrilamida dan melanjutkan sekuensing pita *DNA* yang terbentuk dari *PCR-RISA*, dengan harapan dapat diketahui nama spesiesnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Lukman, mahasiswa INSTIPER Yogyakarta, yang telah membantu pengambilan contoh tanah di kebun kelapa sawit di Desa Trimulya Jaya, Kecamatan Ukui, Kabupaten Pelalawan, Propinsi Riau.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, F., Rusli, M.H. and Sebran, N.H., 2005. Bacteria From An Oil Palm Agricultural System And Their Interactions With *Ganoderma boninense* and *Trichoderma harzianum*. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 28 (2): 95-102
- Anandyawati, Anwar, S., Nugroho, B., Widyastuti, R. and Sabiham S., 2017. Study Of Root Exudate Organic Acids And Microbial Population In The Rhizosphere Of Oil Palm Seedling. *J. Trop. Soils*, Vol. 22 (1): 29-36
- Anonim, 2016. Statististik Perkebunan Indonesia 2015-2017 Kelapa Sawit. Sekretariat Direktorat Jenderal Perkebunan. Direktorat Jenderal Perkebunan. Kementerian Pertanian. Website: <http://ditjenbun.pertanian.go.id> diakses pada tanggal 2 Juli 2018.
- Anonim, 2018. Laguna. Wikipedia bahasa Indonesia. <https://id.wikipedia.org/wiki/Laguna> diakses pada tanggal 2 Juli 2018
- Berg, G. and Smalla, K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68: 1-13
- Chyng, A.W. 2012. *Screening For Potential Rhizosphere Soil Bacteria Of Oil Palm Against Ganoderma boninense*. Dissertation. Crop Production Programme. School Of Sustainable Agriculture. Universiti Malaysia Sabah
- Himawan, A. 2015. Disertasi. Asosiasi *Liberibacter asiaticus* Candidatus dengan Jeruk Siem Bergejala Huanglongbing dan Penularannya pada Anggota Rutaceae. Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Himawan, A. dan Subandiyah, S., 2017. Deteksi Komunitas Bakteri Pada *Diaphorina citri* Jantan dan Betina, Vektor Penyakit Huanglongbing Pada Jeruk Menggunakan PCR-RISA. *Jurnal Agroista* Vol. 1 (1): 32-39
- Husen, E., 2007. Pengambilan Contoh Tanah Untuk Analisis Mikroba dalam *Metode Analisis Biologi Tanah*. Eds. Saraswati, R., Husen, E. dan Simanungkalit, R.D.M. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian. Departemen Pertanian. hal. 5 – 12
- Januar, I., Komala, O. dan Situmorang, E.C., 2014. Keragaman Bakteri Tanah Mineral Pada Perkebunan Kelapa Sawit Menggunakan Teknik *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP)*. Website: perpustakaan.fmipa.unpak.ac.id/file/ejurnal%20061110006.p

- df diakses pada tanggal 2 Juli 2018
- Panggabean, N., Sabrina, T. dan Lubis, K.S., 2016. Populasi Bakteri Tanah Pada Piringan Tanaman Kelapa Sawit Akibat pemberian Pupuk NPK Komplit. *Jurnal Agroteknologi* Vol. 4 (3): 2069-2076
- Seung, C.C.F., Chyng, A.W. and Hoe, N.W. 2015. Isolation Of Rhizospheric And Endophytic Soil Bacteria SPLUMS-1 And SPLUMS-2 Of Oil Palm Against *Ganoderma* sp. JN234427. *Malaysian Journal of Microbiology* Vol. 11 (2): 116-120
- Shamsilawani, A.B., Ramlah, S.A.A. and Shawal, M.T.M. 2017. Bacterial Biodiversity In Oil Palm And Different Forest Ecosystems In Mineral Soil In Sarawak. *Oil Palm Bulletin* 74: 12-16
- Situmorang, E.C., Nugroho, Y.A., Prameswara, A., Andarini, E., Hartono, Setyobudi, R.H., Toruan-Matius, N. and Liwang T., 2016. The Bacterial Diversity Investigation in Oil Palm Plantation using Terminal Restriction Length Polymorphism. AIP Conference Proceedings. https://www.researchgate.net/publication/303995102_The_bacterial_diversity_investigation_in_oil_palm_plantation_using_terminal_restriction_length_polymorphism diakses pada tanggal 2 Juli 2018
- Susanti, Y., 2014. Eksplorasi Agen Antagonis Di Sekitar Perakaran Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jack.) di Kabupaten Rokan Hulu. *Jurnal Sungkai* Vol. 2 (1): 37-42
- Wafa, A., 2017. Sebaran Vertikal Mikroba Fungsional Pada Perakaran Kelapa Sawit Dan Potensinya Sebagai Agens Pengendalian Hayati *Ganoderma boninense* Pat. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Yu, Z. and W.W. Mohn. 2001. Bacterial Diversity and Community Structure in an Aerated Lagoon Revealed by Ribosomal Intergenic Spacer Analysis and 16S Ribosomal DNA Sequencing, *Appl. and Environ. Microbiol.* 67 (4): 1565-1574.