

Analisis komunitas bakteri rhizosfer tanaman teh pada pembenihan menggunakan teknik terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP)

Analysis of tea rhizosphere bacterial community at the seedling stage using terminal restriction fragment length polymorphism (trflp) techniques

Dwi Ningsih Susilowati¹, Fani Fauziah², Mieke Rochimi Setiawati³,
Eko Pranoto², Ernin Hidayati⁴, Mamik Setyowati¹, Yati Rachmiati²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111, Tlp. 0251-8337975, Faks. 0251-8338820

²Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung
Desa Mekarsari, Kecamatan Pasirjambu, Kabupaten Bandung, 40972, Tlp. 022-5928185, Faks : 022-5928186

³Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran
Jalan Raya Bandung-Sumedang km 21, Jatinangor Sumedang 4536, Tlp: 022-7796316 / 7797321 Faks : 022-7796316

⁴Fakultas MIPA, Universitas Mataram
Jl. Majapahit No.62 Mataram 83125, Nusa Tenggara Barat, Tlp : 0370-646-506

Email: d_nengsusi@yahoo.com

Diajukan: 19 Oktober 2016; direvisi: 25 Oktober 2016; diterima: 1 November 2016

Abstrak

Bio-imunizer dengan bahan aktif bakteri *Chryseobacterium* sp. dan *Bacillus* sp. telah dikembangkan di PPTK Gambung. *Bio-imunizer* tersebut berpengaruh positif terhadap pertumbuhan tanaman teh serta berpotensi meningkatkan ketahanan tanaman teh. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh bakteri dalam *Bio-imunizer* terhadap komunitas bakteri rhizosfer serta konsistensi keberadaannya setelah diaplikasikan pada tanaman teh pada tahap pembenihan. Teknik yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* dengan pendekatan metagenom dan pengkulturan. Analisis dilakukan terhadap nilai kelimpahan relatif, indeks keragaman Shannon (H'), indeks kemerataan Pielou's (E'), dan indeks dominansi Simpson. Berdasarkan profil T-RF komunitas bakteri rhizosfer yang dihasilkan menunjukkan bahwa

Chryseobacterium sp. dan *Bacillus* sp. yang merupakan bahan aktif *Bio-imunizer* tetap konsisten ditemukan pada rhizosfer tanaman teh. Aplikasi *Bio-imunizer* dapat meningkatkan keragaman komunitas bakteri rhizosfer tanpa mempengaruhi komunitas bakteri awal yang sudah ada.

Kata kunci : tanaman teh, bakteri rhizosfer, *Bio-imunizer*, T-RFLP

Abstract

Bio-imunizer contains an active compound of *Chryseobacterium* sp. and *Bacillus* sp. has been developed by PPTK Gambung. This formula has positive effect on the growth of tea plants also potentially increasing resistance of the plant. The purpose of this study was to determine the effects of bacteria in *Bio-imunizer* to the rhizosphere bacterial communities as well as the consistency of its existence after application on tea plants at the nursery stage.

The technique used in this research is Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism based on metagenomic and culture dependent approaches. The value of relative abundance, Shannon diversity index, Pielou's evenness index, and Simpson dominance index were calculated. Based on the T-RF profiles of rhizosphere bacterial communities show that Chryseobacterium sp. and Bacillus sp. which is the active compound of Bio-imunizer consistently found in the tea plant rhizosphere. Application of Bio-imunizer can increase the diversity of rhizosphere bacterial community without affecting the communities that already exist.

Keywords : tea plant, rhizosphere bacteria, Bio-imunizer, T-RFLP

PENDAHULUAN

Teh merupakan komoditas strategis yang menjadi unggulan nasional. Pertumbuhan dan produktivitas tanaman perkebunan ini seringkali terganggu oleh hama dan penyakit mikrobaial. Beberapa di antara mikrobaa penyebab penyakit pada tanaman teh adalah *Pseudomonas syringae* pv. *theae* (Hori) Young, Dye & Wilkie, *Colletotrichum theae-sinensis* (Miyake) Yamamoto, *Rhizoctonia solani* Kühn, dan *Exobasidium vexans* Masee. Penyakit tersebut mengganggu pertumbuhan tanaman sejak masa pembenihan. Penyakit cacar daun teh yang diakibatkan oleh *E. vexans* merupakan penyakit penting tanaman teh di Indonesia. Pengendalian penyakit ini masih terbatas pada penggunaan klon tahan penyakit, kultur teknis, dan aplikasi fungisida.

Berbagai formula *bio-control* dan *Bio-imunizer* mulai dikembangkan untuk mengatasi penyakit mikrobaial dan sebagai pupuk hayati sekaligus merangsang sistem

imun pada tanaman. Beberapa hal yang sering menjadi kendala terkait dengan formula berbasis mikroba adalah kemampuannya mengekspresikan aktivitas pada kondisi lapang, tingkat kelulushidupannya setelah diaplikasikan di lapang, serta interaksi dan pengaruhnya terhadap komunitas mikrobaa *indigenous*. Hal yang sama dikemukakan oleh Subowo (2014) bahwa pengembangan agen hayati perlu mempertimbangkan pengaruhnya terhadap komunitas mikroba rhizosfer tanaman.

Formula *Bio-imunizer* berbahan aktif bakteri *Chryseobacterium* sp. dan *Bacillus* sp. telah dikembangkan di PPTK Gambung bekerjasama dengan Universitas Padjadjaran dan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya G enetik Pertanian. Kombinasi kedua bakteri tersebut dipilih berdasarkan uji sinergisme di laboratorium, aktivitasnya sebagai *Bio-imunizer* terhadap pertumbuhan tanaman teh, serta potensinya dalam meningkatkan ketahanan tanaman teh terhadap penyakit cacar daun (Fauziah *et al.* 2016). Untuk keperluan pengembangan selanjutnya, perlu dilakukan kajian mengenai pengaruh aplikasi *Bio-imunizer* tersebut terhadap komunitas bakteri rhizosfer *indigenous* tanaman teh pada tahap pembenihan.

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) merupakan salah satu teknik analisis komunitas bakteri berdasarkan sekuen gen 16S rRNA. T-RFLP telah lama dikembangkan untuk mendeteksi struktur dan perubahan komposisi komunitas mikroba (Osborne *et al.*, 2006). Adanya perbedaan komposisi komunitas mikroba yang diberikan perlakuan yang berbeda dapat diketahui dengan melihat

perbedaan profil ukuran-ukuran basa dari fragmen terminal yang terpotong oleh enzim restriksi. Teknik T-RFLP dapat diaplikasikan untuk membandingkan komposisi komunitas yang diperoleh dari pengkulturan maupun metagenom.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh bakteri dalam *Bio-imunizer* terhadap komunitas bakteri rhizosfer serta konsistensi keberadaannya setelah diaplikasikan pada tanaman teh dengan melihat profil komunitas bakteri rhizosfer yang dianalisis menggunakan teknik T-RFLP dengan pendekatan metagenom dan pengkulturan.

BAHAN DAN METODE

Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor, Jawa Barat. Benih tanaman teh diperoleh dari Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung.

Tanaman percobaan dan perlakuan *Bio-imunizer*

Tanaman teh yang digunakan adalah tanaman teh klon TRI 2024 pada tahap pembenihan. Tanaman yang tidak diberikan perlakuan *Bio-imunizer* digunakan sebagai kontrol. Komunitas bakteri dalam tanah rhizosfer dari perlakuan aplikasi *Bio-imunizer* dan kontrol selanjutnya dianalisis menggunakan teknik T-RFLP. Bakteri yang terkandung dalam tanah rhizosfer digunakan sebagai sumber DNA genom total yang dianalisis berdasarkan pendekatan

metagenom. Sampel tanah rhizosfer yang dikoleksi dari tanaman dengan perlakuan aplikasi *Bio-imunizer* dinamakan perlakuan tanah. Adapun sampel tanah rhizosfer yang dikoleksi dari tanaman tanpa aplikasi *Bio-imunizer* sebagai kontrol tanah. Bakteri yang berasal dari tanah rhizosfer tersebut juga dikulturkan menggunakan media agar ekstrak tanah. Selanjutnya keseluruhan bakteri yang dikulturkan digunakan sebagai sumber DNA genom total yang dianalisis berdasarkan pendekatan pengkulturan. Kultur bakteri dari sampel tanah rhizosfer yang dikoleksi dari tanaman dengan perlakuan aplikasi *Bio-imunizer* disebut perlakuan kultur. Adapun kultur bakteri dari sampel tanah rhizosfer yang dikoleksi dari tanaman tanpa aplikasi *Bio-imunizer* disebut kontrol kultur.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA genom total bakteri terhadap semua sampel dilakukan menggunakan *kit* ekstraksi DNA *Power Soil* (MoBio) dengan tahapan sesuai petunjuk manufaktur. DNA genom yang diperoleh dicek konsentrasinya secara kuantitatif dan kualitatif dengan *NanoDrop* dan divisualisasikan menggunakan gel agarosa melalui metode elektroforesis.

Amplifikasi dan Purifikasi Gen 16S rRNA

DNA genom hasil ekstraksi selanjutnya diamplifikasi gen 16S rRNA-nya menggunakan *primer* 27F berlabel 6-FAM *carboxyfluorescein* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Moeseneder *et al.*, 1999) dan 1492R tidak berlabel (5' - TACGGTTACCTTGTTAC GACT-3') (Marchesi *et al.*, 1998). Campuran PCR untuk satu kali reaksi terdiri

atas *GoTaq(R) Green* (Promega) (25 µl), *primer* forward dan reverse (masing-masing sebanyak 1 µl), *DNA template* (5 µl), dan *nuclease free water* (NFW) merk Promega sebagai pelarut (18 µl) hingga volume 50 µl. Amplifikasi dijalankan menggunakan mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Swift Maxi Thermal Cycler merk ESCO pada kondisi 1 siklus denaturasi awal pada suhu 98°C (3 menit); 30 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 98°C (45 detik), *annealing* pada suhu 55°C (45 detik), dan pemanjangan pada suhu 72°C (45 detik); serta 1 siklus pemanjangan akhir pada suhu 72°C (7 menit). Produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa selama 30 menit. Produk PCR selanjutnya dimurnikan menggunakan *kit* purifikasi DNA *QIAquick* (Qiagen).

Pemotongan Sekuens Gen 16S rRNA dengan Enzim Restriksi

Sekuens gen 16S rRNA dari produk PCR murni selanjutnya dipotong menggunakan enzim restriksi yaitu *RsaI* dan *MspI* (Thermo Scientific). Hasil pemotongan oleh enzim restriksi berupa *terminal restriction fragmen* (T-RF). Target ukuran T-RF pada penelitian ini adalah antara 50-500 *base pair* (bp).

Analisis T-RFLP

Produk hasil restriksi selanjutnya dianalisis fragmen di 1st Base Malaysia. T-RF yang dihasilkan dianalisis menggunakan *software* GeneMapper v4.0. Ukuran T-RF dicocokkan dengan ukuran T-RF yang ada dalam *database MICA III* untuk mengetahui identitas dari masing-masing T-RF atau filotipe.

Penghitungan Kelimpahan Relatif, Keragaman, Dominansi dan Kemerataan Komunitas Bakteri.

Perhitungan kelimpahan relatif didasarkan pada luas wilayah puncak (*peak area*) dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Luas wilayah puncak TRF ukuran tertentu}}{\text{Total luas wilayah puncak seluruh ukuran TRF}} \times 100$$

Perhitungan keragaman komunitas menggunakan indeks Shannon (H') dengan rumus sebagai berikut:

$$H' = -\sum (P_i \times \log P_i)$$

dimana $P_i = n_i/N^{-1}$, n_i adalah wilayah puncak dan N adalah jumlah total wilayah puncak.

Perhitungan kemerataan komunitas menggunakan indeks Pielou's sebagai berikut:

$$E = H'/\ln(S)$$

di mana S adalah jumlah total T-RF.

Dominansi ditentukan berdasarkan ada tidaknya ukuran T-RF yang lebih mendominasi dibandingkan yang lainnya. Perhitungan tingkat dominansi menggunakan indeks dominansi Simpson sebagai berikut:

$$D = \sum (n_i N^{-1})^2$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik T-RFLP pada penelitian ini digunakan untuk memonitor komunitas bakteri rhizosfer benih tanaman teh yang telah diberikan perlakuan *Bio-imunizer* dan benih tanpa perlakuan *Bio-imunizer* (kontrol). Hasil analisis T-RFLP ditunjukkan dalam bentuk ukuran-ukuran T-RF dalam *base pair* (bp) yang menggambarkan

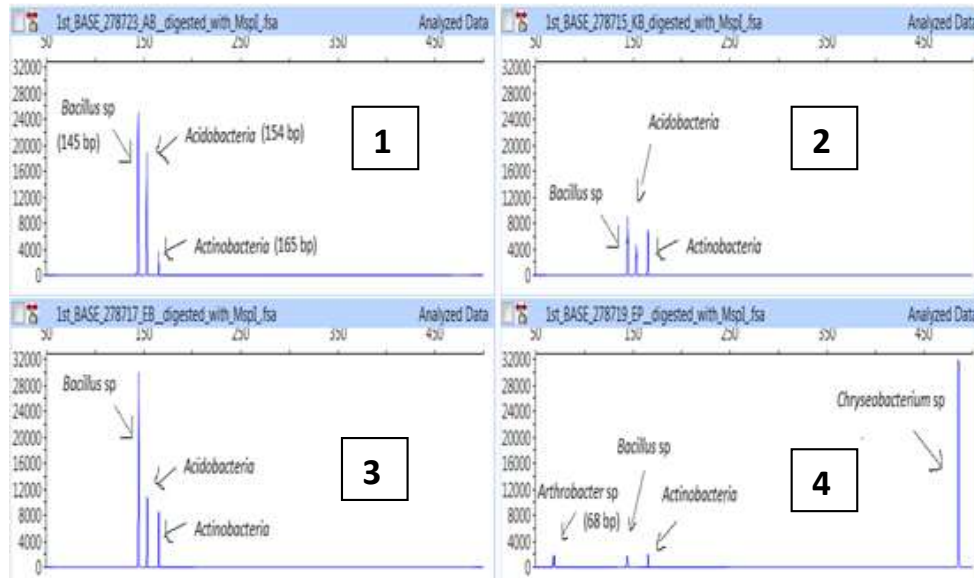
kan bakteri yang terdapat pada masing-masing sampel, serta tinggi dan luas area dari masing-masing T-RF. Ukuran-ukuran T-RF yang diperoleh dari hasil pemotongan enzim restriksi terhadap gen 16S rRNA disebut filotipe (Dunbar *et al.*, 1999). Satu T-RF dianggap sebagai satu filotipe, dan luas area puncak T-RF menunjukkan kelimpahan relatif dari T-RF tersebut. Tinggi T-RF menunjukkan intensitas kemunculan T-RF yang terdeteksi dari pendaran fluoresen. Semakin banyak jumlah gen yang teramplifikasi, maka semakin tinggi intensitas kemunculan.

Profil T-RFLP komunitas bakteri dalam setiap sampel tanah disajikan pada Gambar 1. Berdasarkan elektroforegram profil T-RFLP pada Gambar 1, sampel kontrol kultur, kontrol tanah, dan perlakuan kultur menunjukkan kesamaan hasil, yaitu adanya bakteri *Bacillus* sp, *Actinobacteria*, dan *Acidobacteria*. Perbedaan hanya terdapat pada sampel perlakuan tanah, di mana *Acidobacteria* tidak ditemukan pada sampel tersebut. Profil T-RFLP pada sampel perlakuan tanah juga menunjukkan adanya bakteri *Arthrobacter* sp. Tidak ditemukannya *Acidobacteria* pada sampel perlakuan tanah dapat disebabkan karena adanya kompetisi pada lingkungan rhizosfer tanaman teh, sehingga menyebabkan konsentrasi DNA yang terambil sangat rendah yang mengakibatkan puncak tidak dapat terdeteksi (Dunbar *et al.*, 2001). Adapun *Arthrobacter* sp. dapat terdeteksi pada sampel perlakuan tanah dapat disebabkan karena pendekatan metode *metagenomic* yang digunakan mampu mendeteksi keberadaan kelompok bakteri yang hidup dalam sampel tetapi tidak dapat terkultur menggunakan media agar ekstrak

tanah yang digunakan.

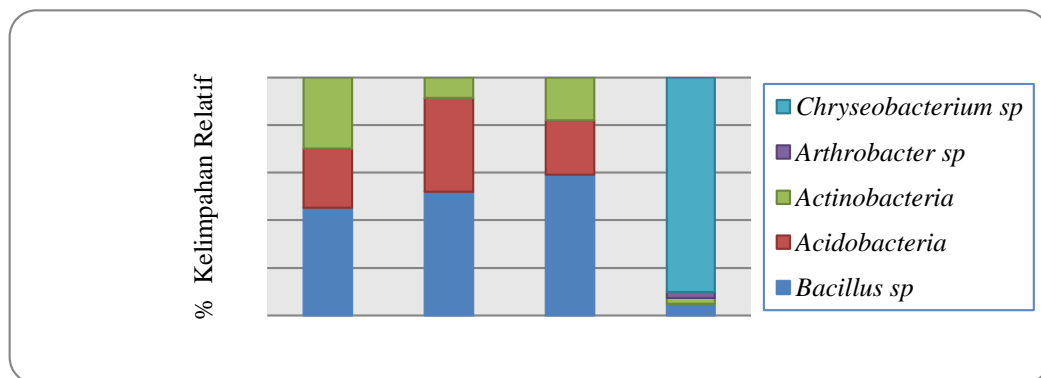
Penambahan *Chryseobacterium* sp. pada rhizosfer tanaman teh ini dapat menekan komunitas mikrobial pada rhizosfer tanaman teh, sehingga *Chryseobacterium* sp. ada dalam jumlah yang sangat melimpah pada rhizosfer tanaman teh, seperti yang terlihat pada sampel perlakuan tanah. Namun pada Gambar 1 menunjukkan bahwa *Chryseobacterium* sp. hanya terdapat pada sampel perlakuan tanah, dan tidak terdapat pada sampel perlakuan kultur. Hal ini disebabkan bakteri ini ternyata kurang cocok jika ditumbuhkan pada media agar ekstrak tanah, sehingga tidak tampak adanya pertumbuhan bakteri tersebut. Penelitian yang dilakukan oleh Nishioka *et al.* (2016) dan Krishnan *et al.* (2016) menyatakan bahwa *Chryseobacterium* sp. dan *Arthrobacter* sp. yang berasal dari daerah rhizosfer lebih cocok dikulturkan dengan media R2A dari pada media agar ekstrak tanah.

Status kelimpahan relatif setiap ukuran T-RF dalam komunitas pada pendekatan metagenom dan pengkulturan disajikan pada Gambar 2. Grafik kelimpahan relatif ini menunjukkan bahwa komunitas bakteri rhizosfer tanaman teh antara lain terdiri atas *Chryseobacteria* sp, *Arthrobacter* sp, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, dan *Bacillus* sp. Kelompok yang hanya terdeteksi pada sampel perlakuan tanah menggunakan pendekatan metagenom yaitu *Chryseobacteria* sp (90%) dan *Arthrobacter* sp (25%). Kehadiran *Bacillus* sp, *Acidobacteria*, dan *Actinobacteria* ditemukan dalam jumlah yang cukup melimpah pada pendekatan pengkulturan namun jumlah kelimpahannya menurun pada pendekatan metagenom.



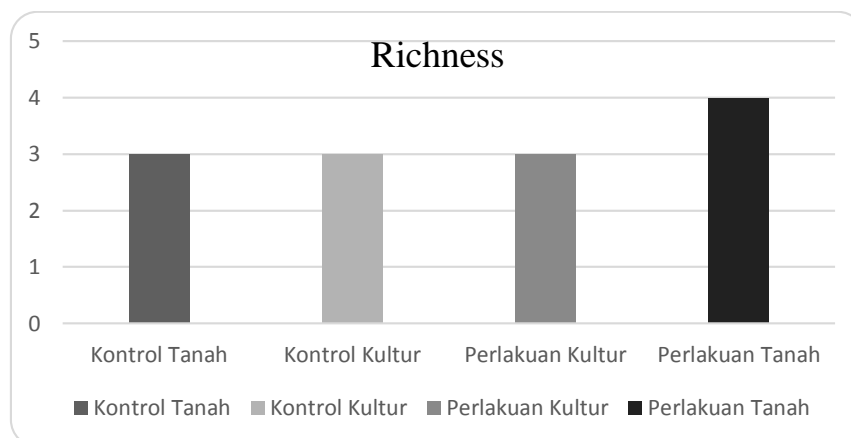
GAMBAR 1

Elektroforegram profil T-RFLP gen 16S rRNA asal rhizosfer tanaman teh yang dipotong dengan enzim restriksi *MspI* dari (1) Kontrol Kultur, (2) Kontrol Tanah, (3) Perlakuan Kultur, (4) Perlakuan Tanah. Sumbu x adalah ukuran T-RF (bp) dan sumbu y adalah intensitas kemunculan (unit fluorescens).



GAMBAR 1

Elektroforegram profil T-RFLP gen 16S rRNA asal rhizosfer tanaman teh yang dipotong dengan enzim restriksi *MspI* dari (1) Kontrol Kultur, (2) Kontrol Tanah, (3) Perlakuan Kultur, (4) Perlakuan Tanah. Sumbu x adalah ukuran T-RF (bp) dan sumbu y adalah intensitas kemunculan (unit fluorescens).



GAMBAR 3

Tingkat kekayaan spesies (*species richness*)

Bacillus sp. dan *Acidobacteria* ditemukan dengan presentase melimpah di beberapa sampel. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Wafula, (2013) mengenai analisis bakteri tanah teh di wilayah Ngere Kenya, di mana genus *Bacillus* merupakan bakteri dominan di tanah teh yaitu sekitar 45% dan genus *Chryseobacterium* ditemukan dengan presentase 9%. Zhao *et al.*, (2012) melaporkan dalam penelitiannya mengenai analisis komunitas bakteri tanpa pengkulturan pada teh menggunakan metode DGGE didapatkan bahwa *Acidobacteria* merupakan bakteri dominan dalam tanah rhizosfer teh dan penting dalam siklus nutrient pada tanah teh yang bersifat asam. Çakmakçı *et al.*, (2010) melaporkan bahwa *Actinobacteria* juga dapat ditemukan dalam tanah rhizosfer teh. Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 1 dan 2 terlihat bahwa setelah diaplikasikan, *Bacillus* sp. dan *Chryseobacterium* sp. yang merupakan formula dari *Bio-imunizer* tetap berada pada sampel tanah. Berdasarkan kajian komposisi komunitas bakteri juga menunjukkan bahwa aplikasi *Bio-imunizer* tidak mengubah komposisi bakteri rhizosfer.

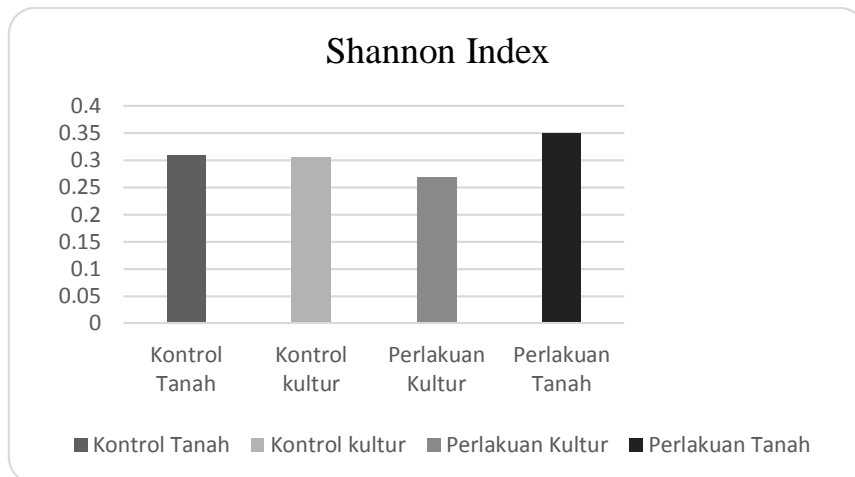
Kekayaan spesies (*species richness*) atau jumlah filotipe yang terdeteksi pada komunitas bakteri rhizosfer tanaman teh berkisar antara 3 - 4 sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3. Tingkat kekayaan spesies yang lebih tinggi pada perlakuan tanah disebabkan karena selain bakteri yang dapat dikultur, bakteri yang tidak dapat dikultur juga dapat terdeteksi menggunakan pendekatan metagenom.

Nilai indeks keragaman Shannon (H') komunitas bakteri pada masing-masing perlakuan disajikan pada Gambar 4. Indeks keragaman Shannon diperoleh dari data profil *MspI* dan *RsaI*. Komunitas bakteri

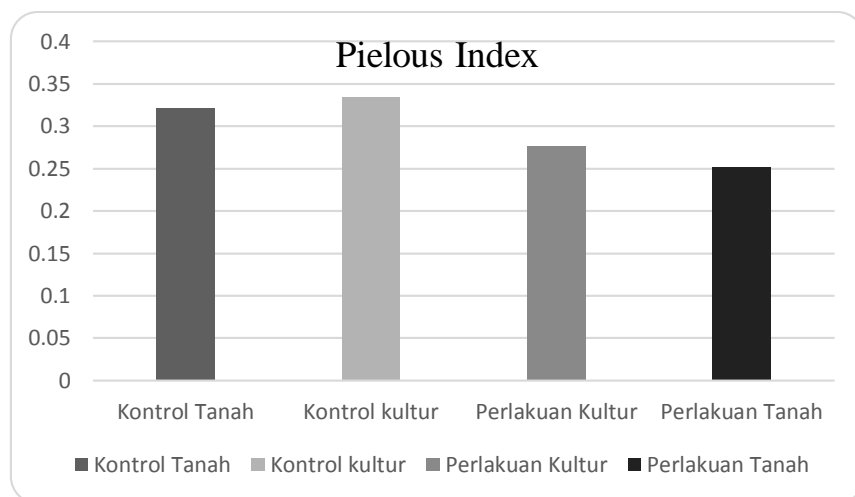
pada perlakuan tanah memiliki tingkat keanekaragaman lebih tinggi dari pada perlakuan kultur. Rendahnya tingkat keragaman pada sampel pengkulturan dapat disebabkan karena sumber keragaman hanya berasal dari bakteri yang terkultur. Di samping itu, perlakuan tanah yang telah diberi *Bio-imunizer* memiliki tingkat keragaman lebih tinggi dibandingkan kontrol tanah tanpa penambahan *Bio-imunizer*. Adapun pada perlakuan tanah, keragaman yang lebih tinggi disebabkan karena sumber keragaman berasal dari komunitas bakteri yang terkultur dan yang tidak dapat terkultur.

Nilai indeks kemerataan (E') komunitas bakteri pada masing-masing perlakuan disajikan pada Gambar 5. Indeks kemerataan juga diperoleh dari data profil *MspI* dan *RsaI* untuk menggambarkan tingkat kemerataan sebaran T-RF yang muncul pada komunitas rhizosfer tanaman teh. Rendahnya indeks kemerataan pada perlakuan tanah mengindikasikan adanya spesies yang mendominasi spesies lainnya. Spesies dominan tersebut adalah *Chryseobacterium* seperti yang terlihat pada Gambar 2.

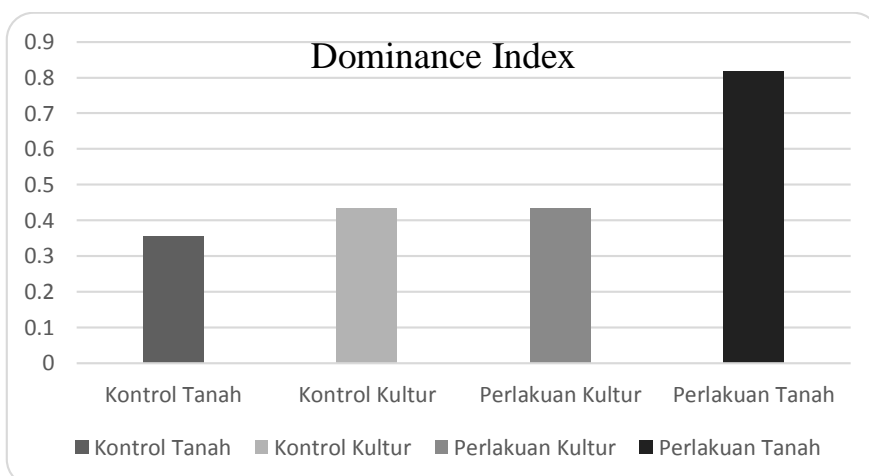
Nilai indeks dominansi komunitas bakteri pada masing-masing perlakuan disajikan pada Gambar 6. Nilai indeks dominansi berkisar antara 0 – 1. Jika nilai indeks dominansi mendekati 0 berarti tidak ada spesies yang mendominasi spesies lainnya, sedangkan jika nilai indeks mendekati 1, berarti terdapat spesies yang mendominasi spesies lainnya (Yuliana, 2012). Nilai indeks dominansi yang tinggi pada perlakuan tanah mengindikasikan adanya spesies yang mendominasi yaitu *Chryseobacterium* seperti yang terlihat pada Gambar 2. Data tersebut juga berkaitan dengan data bahwa perlakuan tanah



GAMBAR 4
Indeks Keragaman Shannon



GAMBAR 5
Indeks Kemerataan Pielous



GAMBAR 6
Indeks Dominansi Simpson

perlakuan tanah menunjukkan nilai pemerataan yang rendah (Gambar 5).

Berdasarkan data yang diperoleh dari analisis T-RF, terlihat bahwa bakteri *Chryseobacterium* sp. dan *Bacillus* sp. tetap terdapat pada tanah yang diberikan perlakuan *Bio-imunizer*. Nilai indeks pemerataan yang rendah diikuti dengan nilai indeks dominansi yang tinggi pada sampel tanah yang diberikan perlakuan *Bio-imunizer* menunjukkan bahwa bakteri yang terdapat pada sampel tidak tersebar merata. Hal tersebut dikarenakan adanya spesies yang mendominasi. Meskipun demikian, sampel tanah tersebut tetap mempunyai nilai keragaman yang lebih tinggi karena jumlah kelompok bakteri yang ditemukan lebih banyak dibandingkan pada sampel lainnya. Hasil penelitian yang mirip juga ditemukan pada komunitas bakteri rhizosfer tanaman jagung. Seperti yang dijelaskan Hidayati *et al.*, (2015) bahwa komunitas bakteri rhizosfer tanaman jagung dengan tingkat pemerataan yang rendah dan tingkat dominansi yang tinggi menunjukkan tingkat keragaman yang tinggi.

KESIMPULAN

Komunitas bakteri pada rhizosfer tanaman teh tanpa perlakuan penambahan *Bio-imunizer* terdiri atas *Bacillus* sp., *Acidobacteria*, dan *Actinobacteria* sp. Komunitas bakteri pada rhizosfer tanaman teh dengan perlakuan *Bio-imunizer* diperoleh *Bacillus* sp., *Actinobacteria* sp., *Chryseobacterium* sp. dan *Arthrobacter* sp. Keberadaan *Bacillus* sp. dan *Chryseobacterium* sp. menunjukkan konsistensi komposisi *Bio-imunizer* yang diaplikasikan. Aplikasi *Bio-imunizer* juga

tidak mengubah komposisi bakteri rhizosfer. Komunitas bakteri pada sampel tanah yang diberi perlakuan *Bio-imunizer* dengan pendekatan metagenom memiliki tingkat keanekaragaman dan nilai indeks dominansi yang lebih tinggi dibandingkan dengan pendekatan pengkulturan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian melalui Program Kerjasama Kemitraan Pertanian dan Pengembangan Pertanian Nasional (KKP3N) tahun anggaran 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Çakmakçı, R., M. F. Dönmez, Y. Ertürk, M. Erat, A. Haznedar, and R. Sekban. 2010. Diversity and metabolic potential of culturable bacteria from the rhizosphere of Turkish tea grown in acidic soils. *Plant Soil* 332: 299-318.
- Dunbar, J., S. Takala, S.M. Barns, J.A. Davis, and C.R. Kuske. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl Environ Microbiol* (65): 1662-1669.
- Dunbar, J., L.O. Ticknor, and C.R. Kuske. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* (67): 190-197.

- Fauziah, F., M.S. Setiawati, D.N. Susilowati, E. Pranoto, dan Y. Rachmiati. 2016. Potensi mikrobaa *indegenous* tanaman teh terhadap pertumbuhan dan ketahanan terhadap penyakit cacar daun (*Exobasidium vexans* Masee). Jurnal Penelitian Teh dan Kina. Volume 19 Nomor 1. P-ISSN 1410-6507. E-ISSN 2527-2942.
- Hidayati, E., A.T. Wahyudi, A. Suwanto, dan R. Widyastuti. 2015. Penapisan komunitas bakteri rizosfer secara *in planta* untuk meningkatkan pertumbuhan jagung di lahan kering. *Disertasi*. Institut Pertanian Bogor.
- Krishnan, R., R.R. Menon. N. Tanaka, H. Busse. S. Krishnamurti, and N. Rameshkumar. 2016. *Arthrobacter pokkali* sp. nov, a novel plant associated actinobacterium with plant beneficial properties, isolated from saline tolerant pokkali rice, Kerala, India. *PLoS One* (3): e0150322.
- Marchesi, J. R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, and W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific pcr primers that amplify genes coding for bacterial 16s rRNA. *Appl Environ Microbiol* (64): 795–799.
- Moeseneder, M.M., J.S.M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, and G.J. Herndl. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* (65): 3518-3525.
- Nishioka, T., M.M. Elsharkawy, H. Suga, K. Kageyama, M. Hyakumachi, and M. Shimizu. 2016. Development of culture medium for the isolation of *Flavobacterium* and *Chryseobacterium* from rhizosphere soil. *Microbes Environ* (2): 104-110.
- Osborne, A.C., G.N. Rees, Y. Bernstein, and P.H. Janssen. 2006. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* (72): 1270-1278.
- Subowo. 2014. *Pemberdayaan Organisme Tanah untuk Pertanian Ramah Lingkungan*. IAARD Press, Jakarta.
- Wafula, E. N. 2013. Analyses of soil bacteria in Ngere Tea Catchment Area of Murang'a County, Kenya. *Thesis*. Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology.
- Yuliana, E.M. Adiwilaga, E. Harris, dan N.T.M. Pratiwi. 2012. Hubungan antara kelimpahan fitoplankton dengan parameter fisik-kimiawi perairan di Teluk Jakarta. *Jurnal Akuatika* (3): 160-179.
- Zhao, J., X. Wu, C. Nie, T. Wu, W. Dai, H. Liu, and R. Yang. 2012. Analysis of unculturable bacterial communities in tea orchard soils based on nested PCR-DGGE. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 1967-1979.