

**KERAGAMAN GENETIK BAKTERI *XANTHOMONAS ORYZAE*
PV. ORYZAE DARI BEBERAPA DAERAH DI INDONESIA
DENGAN *REP-PCR***

**GENETIC DIVERSITY OF *XANTHOMONAS ORYZAE PV. ORYZAE*
FROM DIFFERENT REGION OF INDONESIA USING *REP-PCR***

Fatimah, Tria Wulan, Mahrup, dan Laksmi Ambarwati

1. Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
2. Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian.
Jl. Tentara Pelajar no.3A Bogor, Jawa Barat 16111
3. Departemen Biokimia Institut Pertanian Bogor
Jalan Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor, Jawa Barat 16680
Email korespodensi: fatimahsuw@gmail.com

HP/Telp: 081318161204

ABSTRAK

Bakteri *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* merupakan bakteri penyebab penyakit hawar daun pada padi. Sebanyak 27 isolat Xoo yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia, dianalisis keragamannya menggunakan teknik *Rep-PCR* (*Repetitive PCR*). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik bakteri *Xanthomonas oryzae* dengan menggunakan metode *Repetitive PCR* berupa primer BOXA1R dan ERIC serta primer (GTG)₅. Hasil penelitian menunjukkan bahwa polimorfisme yang tinggi dihasilkan dari primer ERIC 93,75%. Keragaman genetik berdasarkan primer BOXA1R, terbentuk 5 kluster dengan koefisien kesamaan 0,86, pada primer (GTG)₅ membentuk 4 kluster dengan koefisien kesamaan 0,87, dan pada primer ERIC membentuk 6 kluster pada koefisien kesamaan 0,80. Gabungan dari ketiga primer tersebut membentuk 3 kluster pada koefisien kesamaan 0,75. Dengan menggunakan analisis komponen utama, primer BOXA1R dan (GTG)₅ menghasilkan 5 kluster dan primer ERIC menghasilkan 6 kluster.

Kata kunci: keragaman genetik, *Xanthomonas oryzae*, *Rep-PCR*

ABSTRACT

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) causes bacterial leaf blight (BLB) of rice. Twenty seven *Xoo* from several regions in Indonesia were analyzed their genetic diversity by using Rep-PCR (Repetitive PCR). The aim of this analysis is to determine the genetic diversity of *Xoo* isolates with Rep-PCR method using BOXA1R, ERIC and (GTG)₅ primers. High polymorphism resulted from ERIC primer 93,75%. The genetic diversity based on those primers formed 3 clusters with similarity coefficient of 0,75. Whereas using principal component analysis, primer BOXA1R and (GTG)₅ formed 5 clusters and ERIC formed 6 clusters.

Keywords: genetic diversity, *Xanthomonas oryzae*, Rep-PCR

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit utama padi sawah di Indonesia dan di Asia adalah hawar daun bakteri atau kresek yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (IRRI, 2010). Di Indonesia kehilangan hasil yang diakibatkan oleh penyakit kresek mencapai 70–80% sehingga menyebabkan kerugian yang besar secara ekonomi (Yasin *et al.*, 2005).

Informasi keberadaan populasi ras patogen di suatu daerah dapat digunakan untuk memilih dan membudidayakan plasma nutfah tahan terhadap *Xoo* pada tahap awal. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Djatmiko dan Fatichin (2007) menunjukkan bahwa di daerah pertanaman padi di Karesidenan Banyumas untuk wilayah Banjarnegara, Purbalingga, dan Purwokerto terserang berat oleh *Xoo* hingga mencapai 45% dan sampai saat ini patotipe dan genotipenya belum diketahui. Berdasarkan hasil penelitian Djatmiko dan Prakoso (2008) menunjukkan bahwa adanya perbedaan keragaman genetik *Xoo* yang berasal dari berbagai ketinggian tempat di Karesidenan Banyumas.

Kemajuan teknik marka molekuler telah menghasilkan metode-metode potensial untuk mempelajari keragaman spesies bakteri melalui pendekatan genetik. *Repetitive PCR* (Rep-PCR) merupakan metode amplifikasi dengan menggunakan primer tunggal yang mengandalkan urutan nukleotida berulang pada genom bakteri (Schneegurt dan Kulpa, 1998). Setiap mikroorganisme memiliki sekuen yang berulang (*repetitive sequence*) dengan jumlah dan jarak yang bervariasi (Prihantoro *et al.*, 2012). Dengan teknik marka molekuler ini dapat memonitor, menemukan dan mengidentifikasi bakteri dengan cepat dan akurat (Widada *et al.*, 2002).

Cruz *et al.* (1996) melaporkan studi keragaman pada *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dengan primer BOX untuk mendeteksi polimorfisme di dalam populasi *Xoo* namun pada primer REP lebih baik dalam mendeteksi polimorfisme. Popovic *et al.* (2013) telah mengkarakterisasi secara genetik bakteri *Xanthomonas*

campestris menggunakan PCR ERIC dan (GTG)₅ dan dihasilkan pola Xcc yang berbeda dan sangat efektif membedakan strain-strain dari tanaman inang yang berbeda. Asgarani *et al.* (2015) menggunakan primer ERIC pada bakteri *Xanthomonas* spp dan diperoleh bahwa hasil pola PCR-ERIC tidak saja dapat membedakan *Xanthomonas campestris* dengan *Xanthomonas translucens* namun dapat membedakan strain *Xanthomonas* ke dalam tiga klaster dengan 40% kemiripan berdasarkan koefisien Jaccard's coefficient.

Penelitian ini bertujuan mengetahui keragaman genetik dari isolat *Xoo* yang diperoleh dari beberapa daerah di Indonesia dengan menggunakan metode *Repetitive* PCR dan mempelajari efektivitas dari primer yang digunakan. Penelitian ini diharapkan dapat membantu pembentukan varietas padi yang tahan penyakit HDB.

BAHAN DAN METODE

Bakteri *Xoo* yang digunakan berasal dari koleksi BB Biogen (Tabel 1). Bakteri tersebut ditumbuhkan pada medium *Wakimoto Agar* (20 g sukrosa, 5 g pepton, 0.5 g Ca(NO₃)₄H₂O, 1.82 g Na₂HPO₄·7H₂O, 0.05 g FeSO₄·7H₂O, 18 g bakto agar). Bakteri yang telah tumbuh diinokulasikan ke dalam media cair NB (*Nutrient Broth*) lalu diinkubasi semalam dan selanjutnya digunakan untuk tahapan isolasi DNA.

Tabel 1. Daftar isolat *Xoo* yang digunakan dalam penelitian ini.

No.	Kode Isolat	Varietas Sumber	Lokasi
1	Xoo7608	Lokal	Cibadak-Jawa Barat
2	Xoo7624	Lokal	Bogor- Jawa Barat
3	Xoo8021	Lokal	Subang- Jawa Barat
4	Xoo8024	Lokal	Cianjur- Jawa Barat
5	Xoo93-229	Lokal	Harjobinangun-Jawa Tengah
6	Xoo11-003	Ciherang	Cianjur-Jawa Barat
7	Xoo11-020	Ciherang	Cianjur- Jawa Barat
8	Xoo11-021	Kuriak Putih	Maninjau-Sumatera Barat
9	Xoo11-022	Kuriak Putih	Maninjau-Sumatera Barat
10	Xoo11-030	Kuriak Putih	Maninjau-Sumatera Barat
11	Xoo12-011	Tidak Diketahui	Sudiang-Biringkanaya, Sulawesi Selatan
12	Xoo12-012	Tidak Diketahui	Sudiang-Biringkanaya, Sulawesi Selatan
13	Xoo12-176	Tidak Diketahui	Kauman-Batang, Jawa Tengah

No.	Kode Isolat	Varietas Sumber	Lokasi
14	Xoo12-177	Tidak Diketahui	Kauman-Batang, Jawa Tengah
15	Xoo12-183	Tidak Diketahui	Kauman-Batang, Jawa Tengah
16	Xoo12-190	Tidak Diketahui	Kalimanggis, Subah, Batang
17	Xoo12-195	Tidak Diketahui	Kalimanggis, Subah, Batang
18	Xoo12-198	Tidak Diketahui	Kalimanggis, Subah, Batang
19	Xoo12-200	Tidak Diketahui	Kalimanggis, Subah, Batang
20	Xoo12-207	Tidak Diketahui	Kalimanggis, Subah, Batang
21	Xoo12-225	Tidak Diketahui	Duwet-Pekalongan, Jawa Tengah
22	Xoo12-231	IR-64	Sawah, Tulis-Batang, Jawa Tengah
23	Xoo12-253	IR-64	Sawah, Tulis-Batang, Jawa Tengah
24	Xoo12-285	Ciherang	Ds. Wr. Nangka Subang Jawa Barat
25	Xoo12-286	Ciherang	Ds. Wr. Nangka Subang Jawa Barat
26	Xoo12-302	Inpari-13	BBPP Btg. Kaluku, Sulawesi Selatan
27	Xoo12-303	Inpari-13	BBPP Btg. Kaluku, Sulawesi Selatan

Isolasi DNA Genom *Xoo*

Isolasi DNA genom dilakukan dengan metode Shanti *et al.* (2001). Verifikasi DNA genom dilakukan dengan uji kualitatif DNA menggunakan 0,8% gel agarosa dan pewarnaan dengan etidium bromida. Gel agarosa yang telah selesai dielektroforasi kemudian divisualisasi dengan Chemidoc UV-Illuminator (Biorad) dan uji kuantitatif dengan Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, 2009).

Amplifikasi DNA dengan PCR

Proses amplifikasi DNA dari bakteri *Xoo* menggunakan mesin PCR Biorad. Reaksi PCR mengandung 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 25 ng DNA genomik, 10 pmol untuk setiap primer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM untuk setiap dNTP, dan 0.2 units DNA Taq polymerase (Fermentas). Primer Rep PCR yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer BOXA1R :5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3', ERIC1R :5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3', ERIC2 :5'-AAGTAAGTGACTGGGTGAGCG-3', dan (GTG)₅ :5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3' (Gevers *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2011).

Program PCR terdiri atas tahapan: predenaturasi 94°C selama 5 menit; denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan primer (BOXAIR dan (GTG)₅ pada 53°C, ERIC 43°C) selama 1 menit, pemanjangan primer 65°C selama 8 menit. Proses tersebut diulang sebanyak 35 siklus. Selanjutnya

pendinginan pada suhu 65°C selama 15 menit. Profil PCR yang digunakan untuk primer adalah pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 7 menit (awal pemanasan), denaturasi pada suhu 94°C selama 60 detik, penempelan primer pada suhu 53°C selama 1 menit, dan pemanjangan primer pada suhu 65°C selama 8 menit. Proses tersebut diulang sebanyak 35 siklus. Tahap terakhir ditambah 15 menit pada suhu 65°C. Setelah proses amplifikasi selesai kemudian gel divisualisasi dengan proses elektroforesis.

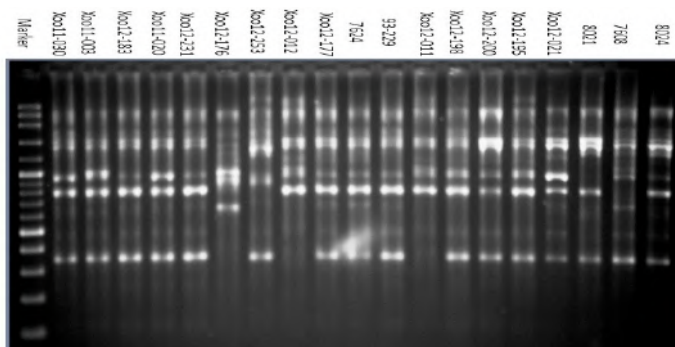
Analisis Data

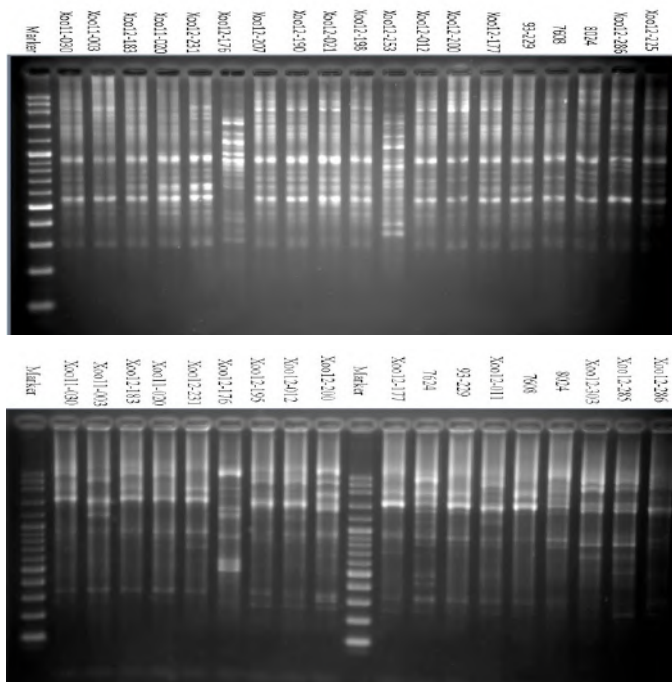
Hasil visualisasi berupa pita-pita hasil PCR dijadikan data biner terhadap pola pita yang terbentuk dan dibuat hubungan kekerabatan dengan metode *unweighted pair group method arithmetic mean* (UPGMA). Kemudian dilakukan juga analisis komponen utama dengan menggunakan program NTSYS 2.10 (Rohlf, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Hasil Amplifikasi Pita Polimorfik DNA Bakteri *Xoo*

Perhitungan polimorfisme secara kualitatif dilakukan dengan menganalisis semua pita hasil amplifikasi PCR yang diperoleh (Gambar 1). Tingkat polimorfisme diantara dua individu diskor atas dasar ditemukan atau tidaknya pita DNA yang diamplifikasi. Jumlah pita yang dihasilkan dari amplifikasi dengan primer rep-PCR (BOXA1R, ERIC, (GTG)₅) yaitu sebanyak 37 pita dari 27 isolat *Xoo* (Tabel 2). Pita terbanyak dihasilkan oleh primer ERIC yaitu sebanyak 16 pita, sedangkan pita yang paling sedikit dihasilkan oleh primer BOXA1R sebanyak 8 pita. Jumlah pita polimorfik paling banyak dihasilkan oleh primer ERIC dengan persentase pita polimorfik sebesar 93,75%, sedangkan untuk persentase pita polimorfik yang paling sedikit dihasilkan oleh primer (GTG)₅ sebesar 76,92% (Tabel 2).





Gambar 1. Elektroforegram hasil amplifikasi dengan primer Rep-PCR. Berturut-turut dari atas ke bawah: Primer BOX AIR, (GTG)₅ dan ERIC.

Tabel 2. Hasil jumlah pita polimorfik dan persentase pita polimorfik dengan primer Rep-PCR dari 27 isolat *Xoo*.

Primer	Jumlah Pita	Pita Polimorfik	% Pita Polimorfik
BOXAIR	8	7	87,5
(GTG) ₅	13	10	76,92
ERIC	16	15	93,75

Perhitungan statistik dengan menggunakan program Cervus untuk mengetahui hasil perhitungan jumlah alel per lokus yang dihasilkan dari tiap primer, nilai heterozigositas (He) untuk menggambarkan ukuran variasi genetik yang dihasilkan diperoleh nilai He terbesar pada primer ERIC, sedangkan *Polymorphism Information Content* (PIC) untuk mengetahui seberapa tingkat polimorfisme yang dihasilkan dari suatu marka molekular. Untuk nilai PIC terbesar diperoleh oleh primer ERIC yang memiliki nilai sebesar 0,34 (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil perhitungan statistik pada primer Rep-PCR

Primer	Jumlah alel/lokus	He*	PIC**
BOXA1R	3	0,3126	0,27
(GTG) ₅	3	0,2624	0,23
ERIC	2,4	0,4489	0,34

^{*)} Heterozigositas

^{**)} Polymorphism Information Content

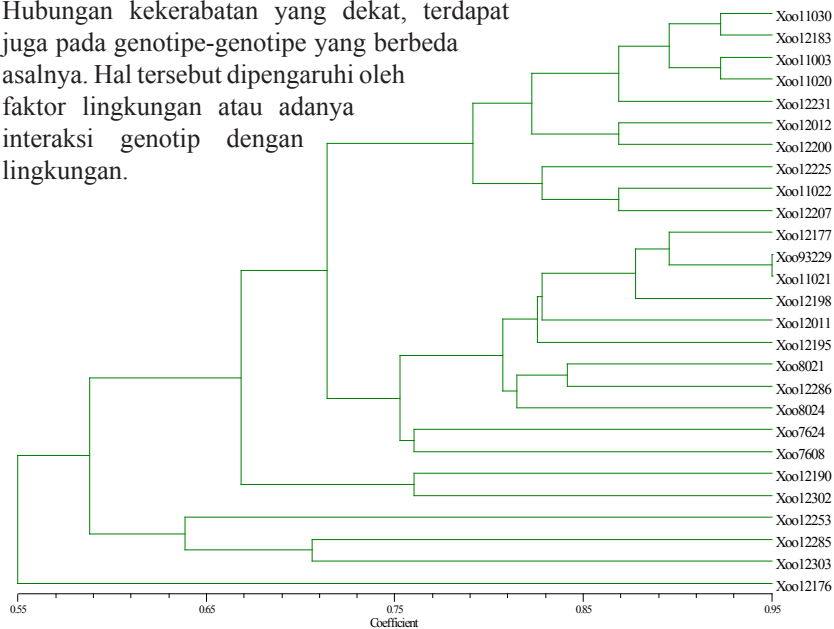
Berdasarkan analisis pita polimorfik hasil amplifikasi DNA dari 27 isolat *Xoo* (Tabel 2) yang menggunakan primer BOXA1R, (GTG)₅, dan ERIC diketahui bahwa persentase pita polimorfik terbanyak diperoleh dengan primer ERIC yaitu sebesar 93,75%. Jumlah pita yang dihasilkan sebanyak 16 pita dan jumlah pita polimorfik yang dihasilkan sebanyak 15 pita. Hal ini menandakan bahwa terdapat 1 pita yang monomorfik dengan ukuran pita sebesar 900 bp. Pita monomorfik ini berguna untuk identitas spesies sebagai penanda genetik (Munif *et al.*, 2004). Primer dengan persentase pita polimorfik yang paling sedikit yaitu (GTG)₅ sebesar 76,92% dengan menghasilkan jumlah pita sebanyak 13 pita dengan pita polimorfik sebanyak 10 pita. Hal ini menandakan terdapat 3 pita monomorfik yang dihasilkan, terdapat pada ukuran 300 bp, 700 bp, dan 970 bp. Jumlah pita yang dihasilkan dari amplifikasi dengan primer BOXA1R sebanyak 8 pita dan pita polimorfik sebanyak 7 pita dengan persentase pita polimorfik yang dihasilkan sebesar 87,5%. Terjadinya perbedaan tingkat polimorfisme tersebut karena primer mengamplifikasi DNA genom yang bervariasi. Semakin banyak variasi daerah DNA genom yang diamplifikasi oleh primer maka semakin tinggi juga tingkat polimorfisme suatu organisme (Nuryani, 2003).

Analisis Keragaman Genetik Bakteri *Xoo*

Analisis kluster dilakukan berdasarkan hasil amplifikasi DNA *Xoo* dengan gabungan primer BOXA1R, (GTG)₅, dan ERIC menghasilkan dendrogram dengan 3 kluster pada koefisien kesamaan 0,75 (Gambar 2). Dua kluster utama terdiri atas kluster I yaitu isolat Xoo11-030, Xoo12-183, Xoo11-003, Xoo11-020, Xoo12-231, Xoo12-012, Xoo12-200, Xoo12-225, Xoo11-022, dan Xoo12-207. Kluster II yaitu isolat Xoo12-177, 93-229, Xoo11-021, Xoo12-198, Xoo12-011, Xoo12-195, Xoo8021, Xoo12-286, Xoo8024, Xoo7624 dan Xoo7608, dan kluster III yaitu Xoo12-190 dan Xoo12-302. Isolat lain yang tidak termasuk kluster yaitu isolat Xoo12-253, Xoo12-285, Xoo12-303, dan Xoo12-176. Nilai kofenetik yang diperoleh sebesar $r=0,96$.

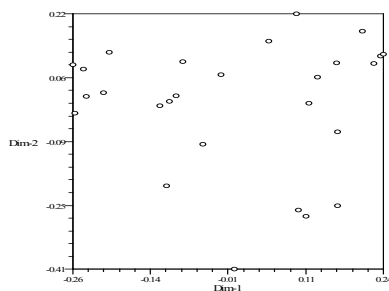
Berdasarkan pengelompokan yang terbentuk dari dendrogram dari BOXA1R dan (GTG)₅, terbentuk kluster yang terdiri atas isolat yang memiliki koefisien

kesamaan yang mencapai nilai 1. Hal ini disebabkan karena pita yang terbentuk tidak bervariasi dan banyak memiliki pita pada ukuran yang sama. Fenomena yang menarik dari hasil pengelompokan tersebut adalah mengelompoknya individu dari lokasi yang berlainan ke dalam satu kelompok. Dendrogram yang diperoleh dari amplifikasi dengan primer ERIC tidak ada isolat yang mencapai koefisien kesamaan sebesar 1 antar individu yang diisolasi. Menurut Poerba dan Martanti (2008), hal tersebut mengindikasikan adanya keragaman genetik yang disebabkan oleh rekombinasi genetik. Karuniawan *et al.* (2008) menambahkan, populasi dari habitat yang sama belum tentu memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat. Hubungan kekerabatan yang dekat, terdapat juga pada genotipe-genotipe yang berbeda asalnya. Hal tersebut dipengaruhi oleh faktor lingkungan atau adanya interaksi genotip dengan lingkungan.



Gambar 2 Dendrogram UPGMA hasil amplifikasi DNA 27 isolat Xoo dengan primer Rep-PCR.

Gambar 3 Plot dua dimensi analisis komponen utama 27 isolat Xoo berdasarkan primer ERIC Rep-PCR



Louws *et al.* (1994) menyatakan bahwa genus *Xanthomonas* yang diamplifikasi dengan primer ERIC dapat menghasilkan pola sidik jari yang kompleks karena menghasilkan pita yang lebih banyak dan bervariasi ukurannya. Jika dibandingkan dengan amplifikasi dengan primer BOXA1R dan (GTG)₅, jumlah pita yang dihasilkan tidak banyak dan ukuran yang kurang bervariasi. Versalovic *et al.* (1994) menyatakan bahwa primer BOXA1R cukup baik untuk membedakan spesies dari *E.coli*, *Salmonella*, dan *Streptococcus*. Li *et al.* (2011) juga menyatakan bahwa isolat *Xoo* tidak dapat dibedakan secara genetik dengan primer (GTG)₅, namun primer ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies pada *Lactobacillus*, *Enterococci*, dan bakteri asam asetat.

Pengelompokan yang dilakukan pada primer ERIC lebih baik dibanding dengan primer BOXA1R dan (GTG)₅ karena dapat mengelompokkan isolat *Xoo* berdasarkan daerah yang sama. Kluster 2 terdapat isolat yang memiliki kekerabatan yang cukup dekat yaitu isolat Xoo12-195 dan Xoo12-012 yang berasal dari daerah yang sama yaitu Jawa Barat, serta kluster 6 terdiri atas isolat yang berasal Jawa Tengah yaitu Xoo12-286 dan Xoo12-198. Menurut Indriani (2000), genotipe-genotipe yang berasal dari satu wilayah cenderung mengelompok pada jarak genetik yang kecil. Hal ini disebabkan adanya kisaran geografi yang rendah, secara genetika lebih seragam dibandingkan dengan populasi yang tersebar luas.

Analisis komponen utama pada primer BOXA1R membagi menjadi 5 kluster. Sebagian besar kluster terdiri atas anggota yang sama seperti pada kluster pada dendrogram. Pada isolat yang memiliki koefisien kesamaan yang nilainya sama, terlihat menumpuk pada satu titik. Hal ini juga terlihat pada analisis komponen utama pada primer (GTG)₅ dan ERIC. Namun pada komponen utama ERIC tidak ada isolat yang memiliki koefisien kesamaan yang sama, maka tampilan plot semuanya tampak menyebar (Gambar 3).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Sebanyak 27 isolat *Xoo* yang diuji dari beberapa daerah di Indonesia, secara genetik menunjukkan keragaman genetik yang cukup bervariasi dengan hasil amplifikasi *Rep*-PCR. Polimorfisme yang paling tinggi dihasilkan dari primer ERIC sebesar 93,75%. Keragaman genetik berdasarkan primer BOXA1R, terbentuk 5 kluster dengan koefisien kesamaan 0,86, pada primer (GTG)₅ membentuk 4 kluster dengan koefisien kesamaan 0,87, dan pada primer ERIC membentuk 6 kluster pada koefisien kesamaan 0,80. Gabungan dari ketiga primer tersebut membentuk 3 kluster pada koefisien kesamaan 0,75. Dengan menggunakan analisis komponen utama, primer BOXA1R dan (GTG)₅ menghasilkan 5 kluster dan primer ERIC menghasilkan 6 kluster.

Saran

Identifikasi molekuler yang cepat dan mudah dengan teknik *Rep*-PCR perlu menambahkan jumlah isolat Xoo agar lebih menyeluruh dan penggunaan primer ERIC sebagai primer yang cukup baik untuk membedakan diantara spesies *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

DAFTAR PUSTAKA

- Asgarani E. T. Ghashghaei, M.R. Soudi, dan N. Alimadadi. 2015. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR based genetic diversity of *Xanthomonas* spp. and its relation to xanthan production. *Iranian Journal of Microbiology*. 7 (1): 38-44.
- Cruz V.C.M, E.Y. Ardales, D.Z. Skinner, J. Talag, R.J. Nelson, F.J. Louws, H. Leung, T.W. Mew, and J.E. Leach. 1996. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. *Genetics Phytopathology* 86(12):1352-1359
- Djarmiko HA dan Fatichin. 2007. Ketahanan 20 varietas padi terhadap penyakit hawar daun bakteri. *Laporan Penelitian*. Purwokerto (ID): Universitas Soedirman.
- Djarmiko HA dan Prakoso. 2008. Keragaman patotipe dan genotipe *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada tanaman padi dari berbagai ketinggian tempat. *Laporan Penelitian*. Purwokerto (ID): Universitas Soedirman.
- Gevers D., G. Huys, dan J. Swings. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett*. 205(1):31-6.
- Indriani FC. 2000. Keragaman Genetik Plasma Nutfah Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) dan beberapa Spesies yang Sekerabat Berdasarkan Analisis Isozim. *Tesis*. Malang (ID): Universitas Brawijaya.
- [IRRI]. International Rice Research Institute. 2010. 29 Mei 2014. *Bacterial leaf blight* [terhubung berkala]. www.knowledgebank.irri.org/riceDoctor_MX/Fact_Sheets/Diseases/Bacterial_Leaf_Blight.htm
- Karuniawan A. B. Sahala, dan A. Ismail. 2008. Keanekaragaman genetik *Mucuna* berdasarkan karakter morfologi dan komponen hasil. *Jurnal Zuriat* 19 (1): 41-59
- Li B., R. Yu, Y. Shi, T. Su, F. Wang, M. Ibrahim, G. Xie, YWang, dan G. Sun. 2011. Reclassification of *Xanthomonas* isolates causing bacterial leaf spot of *Euphorbia pulcherrima*. *Plant Pathol. J.* 27(4): 360-366 doi.org/10.5423/PPJ.2011.27.4.360.

- Louws F.J., D.W. Fullbright, C.J. Stephens, and F. de Bruijn. 1993. Use of repetitive sequences and PCR technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* seroklaster 1, 2, 3, strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1702-1708.
- Munif A, M. Sudomo, Soelaksono, R. Maelita, dan D.P. Agus. 2004. Polimorfisme genetik dari *Anopheles barbirostris* kaitannya dengan prevalensi malaria di Kecamatan Cinema, Kabupaten Tasikmalaya. *Bul. Penel. Kesehatan* 32:1-16.
- Nuryani D. 2003. Analisis Keseragaman Genetik Tanaman Teh (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) asal Kultur Jaringan, Setek, dan Biji dengan Teknik RAPD. *Skripsi*. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Poerba YS dan D. Martanti. 2008. Keragaman genetik berdasarkan marka *Random Amplified Polymorphic DNA* pada *Amorphopallus muelleri* Blume di Jawa. *Jurnal Biodiversitas* 9 (4): 245 – 249.
- Popovic T., D. Josic, M. Starovic, P. Milovanovic, N. Dolovac, D. Postic dan S. Stankovic. 2013. Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* strains isolated from cabbage, kale and broccoli. *Archives of Biological Sciences*. Belgrade, 65 (2), 585-593, DOI:10.2298/ABS1302585P.
- Prihantoro I., T. Toharmat, D. Evvyernie, Suryani dan L. Abdullah. 2012. Kemampuan isolat bakteri pencerna serat asal rumen kerbau pada berbagai sumber hijauan pakan. *JITV*. 17 (3):189-200.
- Rohlf F.J. 1998. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide*. New York (NY): Applied Biostatistics Inc.
- Schneegurt M.A. dan C.F. Kulpa. 1998. Review: The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems. *J. Biotechnol. Appl. Biochemis* 27:73-79
- Shanti *et al.* 2001. Identification of resistance genes effective against rice bacterial blight pathogen in Eastern India. *Plant Disease* 85:506-512.
- Thermo Fisher Scientific. 2009. *Nanodrop 2000/200c Spectrophotometer V1.0 User Manual*. Wilmington (US): Thermo Fischer Scientific.
- Versalovic J., S. Maria, J. Frans, dan R. James. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology* 5:25-40.
- Widada J., H. Nojiri, dan T. Omori. 2002. Recent development in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol* 60:45-49.

Yasin S.I., T.U.Z. Khan, M. Ayub, J.A. Shah, dan M. Anwar. 2005. Economic evaluation of bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) disease of rice. *Mycopath* 3:65-67.