BULETIN AgroBio

ISSN 0853-9022 Vol. 5, No. 2, 2002

JURNAL TINJAUAN ILMIAH RISET BIOLOGI DAN BIOTEKNOLOGI PERTANIAN

Perkembangan Penelitian Regenerasi dan Transformasi pada Tanaman Kedelai **Saptowo J. Pardal** ... 37

Perkembangan Penelitian Kultur *In Vitro* pada Tanaman Industri, Pangan, dan Hortikultura **Ika Mariska** ... 45

Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya **Ragapadmi Purnamaningsih** ... 51

Keragaman Genetik Strain *Ralstonia solanacearum* berdasarkan Karakterisasi Menggunakan Teknik Berbasis Asam Nukleat **Yadi Suryadi dan M. Machmud** 59

Penyakit Hawar Daun (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) pada Kentang dan Tomat: Identifikasi Permasalahan di Indonesia **Haeni Purwanti** 67

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

BULETIN AgroBio

JURNAL TINJAUAN ILMIAH RISET BIOLOGI DAN BIOTEKNOLOGI PERTANIAN
VOL. 5, NO. 2, 2002

Penerbit

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Departemen Pertanian

Alamat Penerbit

Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

E-mail: borif@indo.net.id
Telepon: (0251) 339793, 337975
Faksimile: (0251) 338820

Kala Terbit

Dua nomor per volume

Penanggung Jawab

Sutrisno
Kepala Balai Penelitian
Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

Redaktur Teknis

Novianti Sunarlim
M. Machmud
Ida Hanarida Somantri

Redaktur Pelaksana

Faizal Abidin
Ida N. Orbani

Buletin AgroBio (*dahulu bernama* ***Buletin Penelitian***) memuat artikel tinjauan ilmiah hasil riset dalam bidang biologi dan bioteknologi tanaman. Naskah (boleh ditulis dalam bahasa Indonesia atau Inggris) yang diajukan untuk diterbitkan hendaknya belum pernah dipublikasikan pada media cetak manapun dan ditulis sesuai dengan "Pedoman Bagi Penulis" (lihat sampul belakang bagian dalam). Dewan Redaksi berhak menyunting naskah tanpa mengubah isi dan makna tulisan atau menolak menerbitkan suatu naskah.

Naskah dapat bersifat tinjauan ilmiah (kritis) atau tinjauan informatif (anotasi) terhadap subjek tertentu, atau gabungan antara keduanya. Tinjauan ilmiah merupakan hasil evaluasi, sintesis, dan analisis kritis tentang riset bagi kepentingan ilmu pengetahuan dan teknologi, sedangkan tinjauan informatif merupakan hasil evaluasi bagi kepentingan pengguna.

Isi naskah dapat membahas salah satu dari butir-butir berikut, yaitu: (a) status riset pada subjek tertentu, baik yang telah, sedang, maupun yang akan dikerjakan, (b) pengungkapan masalah dan pemecahannya, (c) pengembangan suatu metode atau konsepsi, dan (d) gagasan dan pendekatan yang dapat dijadikan landasan bagi suatu usulan riset. Sumber bacaan seyogyanya meliputi bahan pustaka terbitan dalam dan luar negeri yang terkini dan relevan.

Buletin AgroBio 5(2):59-66

Keragaman Genetik Strain *Ralstonia solanacearum* berdasarkan Karakterisasi Menggunakan Teknik Berbasis Asam Nukleat

Yadi Suryadi dan M. Machmud

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRACT

Genetic Variability of *Ralstonia solanacearum* Strain based on the Characterization using DNA Analysis Technique. *Yadi Suryadi and M. Machmud.* *Ralstonia solanacearum* the causal agent of bacterial wilt disease has a wide range of genetic variability. Nucleic acid-based analysis to characterize the pathogen i.e. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) technique has shown two different groups of strains which corresponded with geographical origins. The DNA fingerprint analysis developed recently included screening DNA primer of various PCR-based assay against genomic DNA of *R. solanacearum*. Studies on the characteristics of genomic DNA of *R. solanacearum* isolates have been done i.e. using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Repetitive Extragenic Palindromic (REP) analysis. These diagnosis assays will be of further used to provide specific DNA profiles that can be applied for epidemiological study and bacterial wilt control as well.

Key words: *R. solanacearum*, genetic variability, diagnosis

Ralstonia solanacearum (Yabuuchi *et al.*, 1995) syn. *Pseudomonas solanacearum* (Smith, 1914) merupakan bakteri penyebab penyakit layu yang cukup merusak pada berbagai tanaman penting seperti kacang tanah, kentang, tomat, pisang, dan jahe (Machmud, 1986; Hayward, 1991). Patogen layu bakteri mempunyai kisaran inang dan daerah sebaran yang luas, di samping kemampuannya untuk bertahan hidup dalam tanah serta tanaman inang pengganti (Hayward, 1991). Akhir-akhir ini, kajian genetika molekuler yang didasarkan pada analisis DNA terhadap strain bakteri *R. solanacearum* (Rs) telah beberapa kali menghasilkan perubahan taksa. Berdasarkan pada analisis hibridisasi rRNA : DNA, Palleroni *et al.* (1973) menempatkan kedudukan taksonomi Rs ke dalam kelompok homologi rRNA grup II *Pseudomonas*. Menurut Yabuuchi *et al.* (1995), semula *Pseudomonas* diusulkan ke dalam kelompok genus *Burkholderia* dan selanjutnya diusulkan kembali menjadi kelompok genus *Ralstonia*.

Bakteri Rs merupakan spesies yang kompleks karena mempunyai keragaman fenotipik dan genotipik yang cukup tinggi (Cook *et al.*, 1989; Hayward, 1991). Rs dikelompokkan ke dalam lima biovar berdasarkan ciri-ciri biokima dan lima ras berdasarkan kisaran tanaman inangnya (Hayward, 1991). Secara fenotipik, saat ini dilaporkan paling sedikit terdapat dua kelompok besar strain bakteri Rs menurut analisis RFLP dan untai gen 16S rDNA (Cook *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1993).

Pseudomonas syzigii, bakteri penyebab penyakit layu pada tanaman cengkeh merupakan kerabat terdekat Rs berdasarkan ciri-ciri fenotipik dan hibridisasi DNA : DNA (Roberts *et al.*, 1990). Strain *blood disease bacterium* (BDB) atau bakteri penyebab penyakit darah pada pisang mempunyai sifat-sifat fenotipik yang agak berbeda dengan Rs (Eden-Green dan Sastraatmadja, 1990), tetapi secara genotipik (berdasarkan urutan DNA pada gen 16S rRNA) sangat dekat dengan Rs (Taghavi *et al.*, 1996).

Penggunaan untai gen ribosomal RNA untuk klasifikasi mikroorganisme saat ini merupakan salah satu analisis yang cukup akurat untuk menentukan kekerabatan di antara mikroorganisme (Woese *et al.*, 1983). Situs DNA di antara molekul 16S dan 23S gen rRNA dikenal mempunyai informasi genetik yang cukup lengkap untuk melihat kekerabatan bakteri (Leblond-Bourget *et al.*, 1996). Metode analisis DNA lain seperti pola sidik jari DNA yang dapat dilakukan, yaitu dengan analisis RAPD menggunakan primer DNA random nukleotida (Williams *et al.*, 1990; Welsh dan McCleland, 1991). Holloway *et al.* (1994) menyebutkan adanya urutan *repetitive* DNA pada genom bakteri Rs dalam jumlah besar apabila dibandingkan dengan *P. aeruginosa*. Lupski *et al.* (1992) dan Versalovic *et al.* (1991) melaporkan bahwa *rep*-PCR mampu membedakan strain berbagai genus bakteri.

Pendekatan teknologi asam nukleat untuk mencirikan keragaman genetik di antara isolat Rs, pada akhirnya diharapkan dapat menyusun keterkaitan sistem pengelompokan atau diagnosis strain didasarkan pada tipe agroekologi (*ecotype*) yang bermanfaat, baik bagi para ahli penyakit maupun pemulia tanaman. Tulisan ini merupakan ulasan terhadap beberapa hasil penelitian mengenai keragaman genetik Rs dan diagnosisnya menurut pendekatan analisis DNA berikut aspek lainnya.

Hak Cipta © 2002, Balitbiogen

KERAGAMAN GENETIK STRAIN Rs DAN KENDALA YANG DIHADAPI DALAM KARAKTERISASI

Rs merupakan bakteri yang termasuk ke dalam anggota subdivisi β proteobacteria. Dalam kelompok ini Rs mempunyai jarak genetik yang sangat dekat dengan bakteri *P. pickettii* dan *P. syzigii* (Ralston *et al.*, 1973; Roberts *et al.*, 1990).

Istilah isolat digunakan untuk biakan tunggal (kultur) bakteri, sedangkan istilah strain digunakan untuk satu kelompok isolat yang mempunyai ciri-ciri fenotipik yang sama. Spesies Rs terdiri dari sejumlah strain yang sangat berbeda. Keragaman di antara strain ini menjadi masalah dalam upaya strategi pengendalian penyakit dengan menggunakan kultivar yang tahan. Upaya pemuliaan untuk menghasilkan varietas tahan seringkali mengalami kegagalan karena dihadapkan pada beragamnya strain patogen. Penyebaran individu strain yang tidak seragam, mengakibatkan kultivar tahan yang dihasilkan di suatu daerah menjadi tidak tahan lagi terhadap strain bakteri lainnya di daerah yang berbeda.

Dua skema untuk membedakan strain saat ini yang dikenal luas adalah berdasarkan sistem pengelompokan isolat ke dalam istilah ras dan biovar. Sistem pengelompokan isolat ke dalam ras didasarkan pada morfologi koloni dan kisaran inang. Strain ras 1 patogenik terhadap Solanaceae, pisang diploid, kacang tanah, jahe, dan zaitun. Strain ras 2 terbatas pada pisang triploid dan *Heliconia* spp., strain ras 3 menginfeksi kentang dan tomat (Buddenhagen *et al.*, 1962). Sistem biovar didasarkan pada pengelompokan isolat menurut kemampuannya untuk mendegradasi substrat gula disakarida dan heksosa alkohol (Hayward, 1964). Terdapat hubungan yang erat antarstrain biovar 2 dengan ras 3, tetapi strain biovar 2 yang dikoleksi dari daerah dataran rendah Amazon mempunyai ciri fenotipik yang berbeda (Hayward, 1991).

Strain Rs yang dibiakkan dalam media buatan akan kehilangan sifat virulensinya dengan cepat, sehingga menyulitkan upaya karakterisasinya. Kelman (1954) menggolongkan dua tipe koloni bakteri Rs berdasarkan virulensinya, yaitu tipe fluidal yang virulen dan tipe afluidal (tidak virulen). Bentuk koloni fluidal dikenal dapat berubah menjadi tipe afluidal pada kondisi tertentu. Ketidakstabilan ini disebabkan oleh adanya fenomena pengaturan dan penyusunan kembali seluruh material genetik dalam sel mikroorganisme (Anderson dan Roth, 1977).

Dalam proses infeksi pada tanaman tanpa adanya pelukaan, populasi bakteri minimal yang diperlukan untuk menginfeksi tanaman sebanyak 5000 sel bakteri per ml. Rs dapat bertahan hidup dalam tanah atau lahan kosong (bera). Beberapa faktor yang mempengaruhi sifat virulensi di antaranya (1) peningkatan aktivitas PG (polygalacturonase) apabila bakteri berinteraksi dengan tanaman, (2) akumulasi EPS (extraseluler polysakarida) yang diatur oleh gen *hrp* juga berperan dalam mengimbas (menginduksi) tanggap hipersensitif pada tanaman yang kompatibel dan inkompatibel, dan (3) akumulasi enzim pendegradasi dinding sel tanaman (endoglucanase) yang berperan pada patogenisitas.

Berdasarkan fenomena tersebut sangat sulit untuk mengkarakterisasi strain Rs yang bermanfaat untuk mempelajari epidemiologi karena kurangnya prosedur identifikasi yang mudah, cepat, dan akurat. Identifikasi yang akurat terhadap sifat patogenisitas dan ciri-ciri biokhemik strain Rs diperlukan untuk mengetahui proses yang mempengaruhi patogenisitas.

Metode yang didasarkan pada analisis DNA diharapkan dapat memperoleh informasi dan identitas suatu strain dan menduga berbagai ciri-cirinya secara lengkap. Salah satu keuntungan dari analisis ini adalah efisiensi waktu dalam mengidentifikasi strain secara *presumptive* (biasanya kurang lebih 2 hari) hingga dapat digunakan sebagai alat dalam mempelajari diagnosis dan epidemiologi.

Pengembangan pelacak DNA spesifik untuk Rs masih dihadapkan pada kendala, antara lain homologi yang tinggi dengan patogen lain seperti *P. syzigii* dan *P. pickettii.* Seal *et al.* (1994) menyatakan bahwa deteksi Rs pada tanah masih menjadi kendala, oleh karena itu sangat diperlukan suatu metode ekstraksi yang sederhana untuk deteksi yang akurat pada contoh Rs asal tanah. Metode analisis DNA yang paling efektif digunakan untuk identifikasi strain Rs saat ini belum diaplikasikan secara luas. Hal ini disebabkan terbatasnya sumber dana pada penelitian mendasar terutama bagi negara berkembang (French, 1992).

DIAGNOSIS STRAIN Rs BERDASARKAN PENDEKATAN BERBAGAI METODE ANALISIS DNA

Kajian genetik molekuler pada suatu mikroorganisme mempermudah pemahaman ciri-cirinya pada tingkat sel dan data genetik secara lebih rinci, yang selanjutnya dapat digunakan dalam mempelajari beberapa aspek biologi (interaksi bakteri tanaman, epidemiologi, dan sebagainya). Berbagai pengembangan teknik terhadap analisis fisik suatu material genetik secara ekstensif telah dipelajari (Smith dan Condemine, 1990).

Berbagai kajian terhadap struktur genomik asam nukleat pada bakteri Rs antara lain ditujukan untuk mempelajari dan mendiagnosis keragaman genetik di antara strain

Rs. Aplikasi teknik genetika molekuler telah digunakan untuk mengelompokkan strain Rs asal lapang yang berbeda ekologinya. Hubungan antara *ecotype* strain dengan ketahanan tanaman di lapang diharapkan dapat digunakan sebagai strategi untuk menentukan kriteria program pemuliaan tanaman terhadap penyakit layu bakteri. Beberapa teknik analisis DNA yang sudah diterapkan untuk kajian tersebut meliputi (1) analisis genom secara utuh (*whole genome analysis*), (2) analisis sidik jari DNA (*fingerprinting*) menggunakan penanda RFLP, ribotyping, RAPD, dan *rep*-PCR.

Analisis Schizotyping

Analisis schizotyping bertujuan untuk mengetahui struktur genetik Rs di antaranya pengenalan terhadap gen-gen yang mengatur virulensi dan patogenisitas. Penelitian DNA secara utuh pada genom Rs cukup potensial untuk dikaji lebih lanjut, sebab kebanyakan strain Rs mempunyai plasmid berukuran 100 kb yang membawa gen virulensi *hrp* (Boucher *et al.*, 1987). Gen ini berperan penting karena menyandi tanggap terhadap sifat hipersensitifitas dan patogenisitas. Teknik *schizotyping* atau disebut pula *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) dilakukan dengan menggunakan pemotongan DNA Rs dengan enzim pembatas *Spe*I seperti yang dilaporkan oleh Holloway *et al.* (1994). Isolat PS 100 (ACH 0171) yang berasal dari isolat asal tanaman terung (biovar 3) dipilih dalam kajian ini. Berdasarkan uji PFGE, DNA pada genom PS 1000 mempunyai ukuran minimum 5,548 Mbp. Hasil pemetaan terhadap gen virulen dari strain tersebut, menunjukkan satu fragmen (F-347 *Spe*I) yang mempunyai kelompok gen ribosomal (*rrn*) (Boucher *et al.*, 1987). Fragmen tersebut juga membawa lokus avirulen *avr*A dan gen virulen *pg*1A yang menyandi aktivitas poligalacturonase (Denny *et al.*, 1990).

Analisis RFLP dan Ribotyping

Bakteri mempunyai ukuran panjang genom yang sangat kecil biasanya berkisar antara 4-6 Mbp. Genom Rs terdiri dari kira-kira 5 Mbp. Pemotongan genom bakteri dengan enzim pembatas menghasilkan potongan fragmen yang relatif sangat banyak. Resolusi yang lebih baik dapat diperoleh apabila DNA dipotong dengan enzim yang mengenal situs 4 bp.

RFLP digunakan untuk membedakan tipe strain Rs antara kelompok ras dan biovar. Analisis RFLP yang dilakukan oleh Cook *et al.* (1989) menggunakan pelacak DNA (*probe*) asal gen virulensi menunjukkan derajat keragaman genetik yang tinggi pada strain Rs. Teknik ini memungkinkan untuk mengkaji ulang penggunaan pelacak DNA lain yang bersifat lebih terpelihara (*highly conserved*). Cook dan Sequeira (1994) menggunakan teknik *subtractive hybridization* untuk memperoleh pelacak DNA yang spesifik untuk ras 3. Mereka melaporkan terdapat 28 kelompok RFLP yang selanjutnya dapat dipisahkan lagi ke dalam dua kelompok besar multilokus dan secara genetik berbeda sifat-sifatnya, yaitu kelompok strain divisi 1 Asiaticum (biovar 3, 4, 5) dan divisi 2, Americanum (biovar 1, 2, dan N2).

Teknik untuk memperoleh pelacak DNA yang diperlukan untuk identifikasi spesies, biovar atau ras telah dilakukan Seal dan Elphinstone (1994). Mereka melaporkan bahwa fragmen DNA yang bersifat diagnostik untuk membedakan Rs dengan bakteri lainnya berukuran 309 bp, sedangkan Opina *et al.* (1997) melaporkan bahwa fragmen DNA berukuran 281 bp yang diisolasi dari klon strain 092 (biovar 4) bersifat diagnostik untuk semua strain Rs.

Penelitian pendahuluan terhadap cosmid Rs menunjukkan bahwa cosmid Rs biovar 3 mempunyai perbedaan urutan basa nukleotida terhadap strain biovar 3 lainnya. Fragmen DNA asal cosmid Rs yang diklon pada vektor *pGem*32f selanjutnya digunakan dalam pengujian pustaka cosmid (*cosmid library*) untuk memilih bagian DNA genomik yang sangat spesifik. Fragmen DNA yang diperoleh dilaporkan mempunyai situs DNA berulang (*repetitive* DNA) berukuran 347 kb (Holloway *et al.*, 1994). Berdasarkan hasil pemotongan genomik DNA dengan enzim pembatas *Eco*RI terhadap beberapa strain Rs asal tanaman pisang dan sayuran (terung, kentang, dan tomat) yang dihibridisasi dengan pelacak DNA *repetitive pM*114 menghasilkan kisaran pita DNA dari 0-16 fragmen. Polimorfisme tidak terlihat jelas pada isolat-isolat asal pisang. Pola DNA yang berbeda tampak apabila kedua sumber isolat dibandingkan.

Ribotyping merupakan analisis yang mirip dengan RFLP, perbedaannya terletak pada jenis pelacak DNA yang digunakan (gen ribosomal 5S, 16S, 23S). Amplifikasi fragmen DNA dapat dipercepat dengan bantuan PCR. Analisis ribotyping untuk membedakan strain Rs antara lain dilakukan terhadap strain Rs dari berbagai biovar menggunakan primer universal yang menyandi urutan nukleotida pada gen 16S rRNA, sehingga dihasilkan produk PCR berukuran 400 bp. Pola fragmen DNA yang dihasilkan berbeda antar biovar Rs (Suryadi *et al.*, 1994; Opina, *komunikasi pribadi*).

Analisis RAPD

Primer arbitrary selain digunakan untuk melacak sidik jari genom berbagai mikroorganisme juga untuk menyeleksi perbedaan fragmen DNA pada strain-strain Rs. Teknik ini diuji berdasarkan protokol Williams *et al.* (1990) mengguna-

kan perangkat primer yang bersifat acak (*random*). Tujuan dari penggunaan teknik tersebut adalah menyeleksi atau mengisolasi fragmen DNA tertentu yang ada pada satu strain tetapi tidak diperoleh pada strain lainnya. Tiga strain asal Queensland Australia, yaitu ACH 0158 (biovar 2), ACH 0171 (biovar 3), dan ACH 092 (biovar 4) dipilih dalam penelitian ini (Opina *et al.*, 1997). Hasil amplifikasi RAPD terhadap fragmen DNA spesifik yang ada pada genomik DNA strain tersebut selanjutnya diklon dan DNA diurutkan kembali untuk disintesis menjadi beberapa pasang primer DNA (Tabel 1).

Primer DNA 759f/760r menghasilkan satu produk fragmen PCR berukuran 281 bp pada semua strain Rs yang diuji dan tidak bereaksi terhadap genus Pseudomonas lainnya (Gambar 1). Analisis Southern untuk mengkonfirmasi hasil penelitian tersebut dilakukan di Taiwan. Dilaporkan bahwa bakteri Rs dapat dibedakan dari bakteri lainnya seperti *Xanthomonas glycinea, Erwinia carotovora* pv *carotovora, E. chrysanthemi, P. cepacia,* dan *P. gladioli* (Wang *et al.*, 1994). Semua isolat Rs, *P. syzigii*, dan BDB yang diuji dengan primer DNA 759f/760r menghasilkan produk DNA yang berukuran sama (281 bp). Pengujian terhadap *P. pickettii* dan *P. andropogonis* tidak menghasilkan produk DNA. Taghavi *et al.* (1996) menguji strain Pseudomonas berdasarkan urutan gen 16S rRNA. Strain bakteri *P. syzigii* dan BDB meskipun berbeda menurut ciri-ciri fenotipik dan patogenisitasnya tetapi secara filogenetik menunjukkan kesamaan dengan kompleks strain Rs. Primer DNA 759f/760r dilaporkan mampu mendeteksi patogen dari contoh tanaman. Teknik PCR menggunakan primer tersebut lebih peka dibandingkan dengan metode lain di mana hasil deteksi dapat diperoleh dalam satu hari. Pendeteksian dengan primer DNA mempunyai tingkat kepekaan dapat mendeteksi 1-20 sel bakteri (Maghirang, 1993). Saat ini, primer DNA tersebut diuji terhadap berbagai contoh yang berasal dari tanah dan tanaman yang diduga mengandung Rs.

Primer DNA OPD 7-T151 dapat mengamplifikasi isolat yang berasal dari Taiwan, Filipina, dan Indonesia. Beberapa isolat biovar 2 dapat diamplifikasi oleh pasangan primer DNA 630f/631r dan 765r/766r, namun primer tersebut belum berhasil mengamplifikasi biovar 2 asal Indonesia. Selanjutnya primer DNA 630f/631r juga dapat mengamplifikasi beberapa isolat biovar 1 asal Peru (isolat CIP 430, CIP 403, dan CIP 003) (Suryadi dan Fegan, 1999).

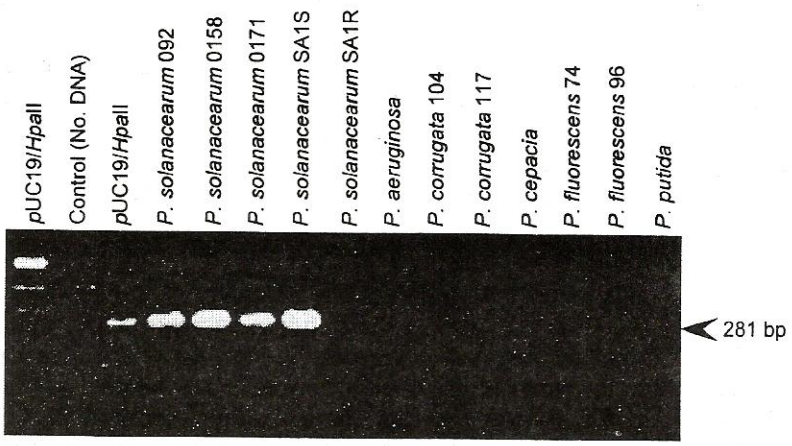
Beberapa primer DNA lain yang telah dikembangkan dari biovar 4 (761f/762r, 763f/764r) mampu mendeteksi beberapa isolat yang tergolong biovar 4. Primer DNA asal klon biovar 3 (767f/768r, 769f/770r, 771f/772r) juga telah diuji terhadap mayoritas isolat biovar 3 yang berasal dari Indonesia (Suryadi *et al., tidak dipublikasi*).

Tabel 1. DNA primer hasil amplifikasi produk RAPD

Primer	Asal klon	Isolat/biovar	Urutan basa nukleotida
630f	p.pS2.10	ACH 0158/bv 2	ATACAGAATTCGACCGGCAC
631r			AATCACATGCAATTCGCCTAC
759f	092-03B5	ACH 092/bv 4	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC
760r			GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG
765f	0158-19#13	ACH 0158/bv 2	CTGGGGACTTCCTTGGTGTG
766r			CTGGGGACTTACCGTGGCCAAAGGC
767f	0171-10#9	ACH 0171/bv 3	TTGGCAACGGGCGCGAACGGCAAG
768r			TTGCACGGGTAATGAGCAGATCGG

f = forward primer, r = reverse primer (5'-3' end)

Sumber: Opina *et al.* (1997)



Gambar 1. Pola deteksi bakteri menggunakan primer 759f/760r

Sumber: Opina *et al.* (1997)

Analisis Internal Transcribe Spacer region (ITS 16S-23S)

Daerah pengapit (*spacer*) di antara 16S-23S dilaporkan sangat bermanfaat untuk memperoleh informasi filogenetik (Leblond-Bourget *et al.*, 1996). Gen 16S-23S rRNA ITS dapat diamplifikasi menggunakan primer universal seperti 1100f dan 240r (Lane, 1991). Hasil pengurutan DNA terhadap berbagai isolat Rs, *P. syzigii*, dan BDB menunjukkan bahwa semua isolat *P. syzigii*, BDB, dan isolat Rs biovar 1, 2, dan N2 asal Indonesia termasuk dalam satu kelompok, sedangkan isolat Rs lain-

nya termasuk ke dalam kelompok strain yang berbeda (Gambar 2). Isolat Rs biovar 3, 4, 5 termasuk kedalam satu kelompok yang terpisah (Fegan *et al.*, 1998). Hal ini menunjukkan adanya keragaman antarstrain yang berasal dari geografi yang berbeda.

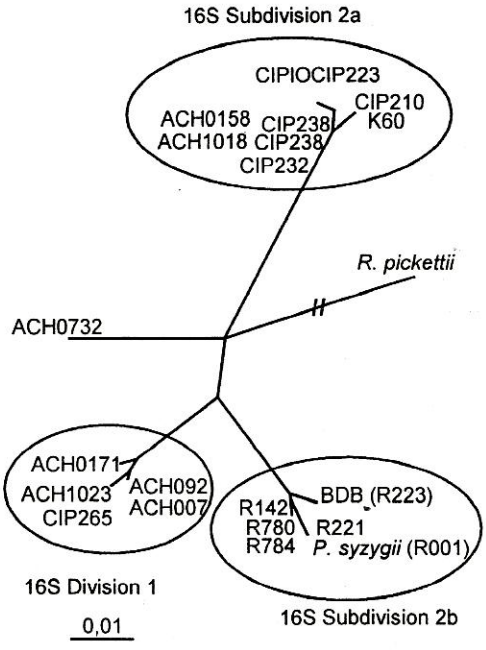
Urutan DNA pada biovar 2 dan N2 mempunyai derajat perbedaan yang tinggi sebab meskipun kedua biovar tersebut mempunyai ciri-ciri fenotipik yang sama (Hayward, 1991), tetapi mempunyai ciri-ciri genetik yang berbeda (Gillings dan Fahy, 1993). Gen pada untai ITS telah diuji oleh Fegan *et al.* (1998) dan Brunori (*komunikasi pribadi*) secara lebih rinci pada sejumlah isolat biovar 1 asal Peru dan dilaporkan menunjukkan pola *repetitive* PCR mirip dengan biovar 2.

Pengurutan basa nukleotida pada gen ribosomal 23S juga telah dipelajari oleh Opina *et al.* (1997). Berdasarkan hasil pemotongan enzim *Sau*3A terhadap gen 23S rRNA diikuti dengan visualisasi pada poliakrilamide gel elektroforesis menghasilkan fragmen DNA tunggal berukuran 276 bp yang dapat digunakan sebagai markah untuk membedakan DNA pada biovar 1 dan biovar 2. Strain *P. syzigii*, BDB, dan Rs divisi 2 (biovar 1, 2, dan N2) yang dipotong dengan enzim pembatas *Sau*3A dilaporkan menghasilkan perbedaan pola fragmen DNA antarstrain asal Indonesia (*P. syzigii* dan BDB) dengan strain Rs yang berasal dari Amerika Selatan (Seal dan Elphinstone, 1994).

Analisis *Repetitive* DNA

Bukti-bukti menunjukkan bahwa berdasarkan konstruksi fragmen *Spe*1, *repetitive* DNA ditemukan pada genom bakteri Rs dalam jumlah yang cukup banyak dibandingkan pada *P. aeruginosa* (Holloway *et al.*, 1994). Urutan *repetitive* DNA ini dapat digunakan untuk membedakan strain bakteri yang sebelumnya sulit dibedakan dengan metode klasifikasi yang baku (Louws *et al.*, 1993). Prosedur *repetitive* PCR (*rep*-PCR) melibatkan penggunaan satu primer nukleotida pada kelompok REP, ERIC, dan BOX *elemen*.

Studi perbandingan dengan *rep*-PCR telah dilakukan terhadap isolat biovar 2 asal Kenya dan French West Indies (Smith *et al.*, 1995). Prosedur *rep*-PCR menggunakan primer DNA BOX ternyata dapat menghasilkan pola sidik jari DNA yang lebih cepat untuk menentukan keragaman genetik berbagai isolat biovar 3 asal Taiwan, Filipina, dan Indonesia (Suryadi *et al., tidak dipublikasi*). Dengan menggunakan teknik yang sama, keragaman genetik pada biovar 4 di Jepang telah dilaporkan oleh Ito *et al.* (1996). *Rep*-PCR menghasilkan fragmen DNA yang homolog pada ukuran 400 bp. *Rep*-PCR dilaporkan dapat membedakan kelompok isolat biovar 3 asal Queensland Utara, Queensland Selatan, dan New South Wales Australia (Suryadi, 1999). Profil dendrogram strain Rs biovar 3 yang diuji dengan *rep*-PCR menggunakan penanda BOX A1R disajikan pada Gambar 3. Untai DNA pada ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic concensus*) juga dilaporkan dapat membedakan isolat dalam kelompok biovar 3 (Maghirang, 1993). Analisis *rep*-PCR terhadap biovar Rs menyimpulkan bahwa strain biovar 1 sangat dekat dengan strain biovar 2, di mana biovar 2 adalah mutan biovar 1 yang telah kehilangan sifat-sifat tertentu dan fungsinya (Fegan *et al.*, 1998).

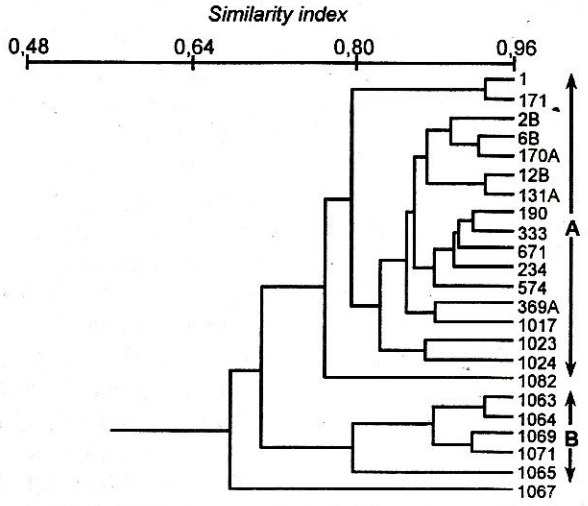


Gambar 2. Pola dendrogram strain Rs yang diuji berdasarkan untai gen ITS 16S-23S rRNA

Sumber: Fegan *et al.* (1998)

IMPLIKASI HASIL PENELITIAN ANALISIS DNA UNTUK DIAGNOSIS/ IDENTIFIKASI Rs DI MASA DEPAN

Bakteri Rs dapat menginfeksi berbagai tanaman seperti kentang, tomat, jahe, dan pisang tanpa menimbulkan gejala yang jelas. Oleh karena itu, suatu teknik pengujian yang akurat masih diperlukan untuk mendeteksi material yang terinfeksi (tidak menunjukkan gejala). Penyakit layu bakteri oleh *R. solanacearum* dapat dikendalikan lebih



Gambar 3. Profil dendrogram strain Rs biovar 3 yang diuji dengan *rep*-PCR menggunakan penanda BOX A1R

Sumber: Suryadi (1999)

efektif apabila patogennya dapat dideteksi secara dini pada tanah maupun bahan tanaman sebelum benih ditanam (Suryadi *et al.*, 1998). Hal yang perlu direkomendasikan untuk metode deteksi infeksi laten di antaranya adalah mengevaluasi metode deteksi pada persediaan benih (*seed lot*) dan umbi yang terinfeksi secara alami oleh patogen *R. solanacearum*.

Alat diagnostik molekuler yang diperlukan sebaiknya bersifat lebih cepat, spesifik, dan akurat. Pada dasawarsa ini teknik PCR banyak digunakan pada penelitian diagnosis DNA genomik Rs. Pengembangan metode deteksi dengan PCR secara kuantitatif diharapkan dapat menduga hubungan antara populasi awal bakteri di dalam jaringan tanaman yang berbeda tingkat ketahanannya. Upaya penyaringan ketahanan yang didasarkan pada populasi bakteri akan jauh lebih efisien apabila dibandingkan hanya berdasarkan gejala visual saja. Teknik ini cukup akurat dan praktis namun spesifisitasnya sangat bergantung jenis primer DNA yang digunakan.

Hasil penelitian karakterisasi strain Rs menggunakan berbagai analisis DNA seperti RFLP, RAPD maupun *rep*-PCR telah menghasilkan sejumlah besar kelompok keragaman genetik yang berbeda. Pengujian strain Rs pada tingkat DNA dapat menjelaskan hubungan antara strain dan validitas sistem pengelompokan strain yang ada pada saat ini. Sebagaimana dihasilkan oleh analisis RFLP, Rs merupakan spesies yang kompleks terdiri dari sejumlah kelompok genetik (multilokus) yang dibatasi oleh kisaran inang dan lokasi yang berbeda. Penggunaan kombinasi PCR, *subtractive hybridization*, pustaka cosmid, urutan gen ribosomal DNA, dan PFGE menghasilkan sejumlah perbedaan pola sidik jari DNA yang mempermudah untuk digunakan dalam membedakan keragaman genetik isolat Rs. Pencarian primer DNA sebagai pelacak yang unik sehingga dapat membedakan Rs dengan bakteri lainnya secara tepat saat ini akan sangat bermanfaat untuk tujuan karantina tumbuhan.

Kunci keberhasilan PCR pemilihan primer DNA, misalnya dengan DNA yang berukuran 20 mer nukleotida untuk amplifikasi DNA. Saat ini, satu kelompok primer DNA spesifik yang identik dengan hasil uji biovar dapat digunakan untuk mengelompokkan isolat. Strategi lain misalnya pencarian kombinasi primer DNA dengan berbagai pendekatan metodologi baru, yang selanjutnya dikembangkan untuk menguji keragaman isolat dari berbagai lokasi yang berbeda.

Identifikasi strain Rs asal lapang akhir-akhir ini sudah dapat diuji menggunakan DNA primer yang berasal dari produk RAPD, namun demikian prosedur yang lebih bersifat umum dan efektif masih perlu ditingkatkan untuk berbagai kondisi laboratorium termasuk jenis mesin *thermocycler* yang berbeda. Dalam uji PCR, konfirmasi terhadap hasil negatif pada contoh tanaman yang diuji perlu dilakukan agar hasil PCR negatif tersebut memang disebabkan karena tidak adanya sel atau DNA patogen yang dapat teramplifikasi, bukan disebabkan oleh pengaruh zat-zat yang menghambat reaksi polimorfisme (Seal dan Elphinstone, 1994; Suryadi *et al.*, 1998).

Primer DNA lain yang diperoleh dari isolat Rs asal tomat hasil pengembangan RAPD telah diuji terhadap sejumlah isolat tomat biovar 3 asal Indonesia, Filipina, dan Taiwan (Suryadi *et al., tidak dipublikasi*). Dari hasil penelitian ini diharapkan polimorfisme yang cukup tinggi antarisolat Rs, sehingga di masa depan Rs yang menginfeksi tomat dapat dikelompokkan ke dalam suatu kelompok strain yang spesifik lokasi (*ecotype*). Program strategi ketahanan tanaman tomat terhadap layu bakteri selanjutnya dapat diarahkan terhadap *ecotype* yang umum di lapang.

Hasil penelitian *ecotyping* menunjukkan keragaman genotipik dan fenotipik yang relatif lebar (*heterogeneity*) pada isolat asal Indonesia dibandingkan isolat asal Taiwan dan Filipina. Hal ini mengimplikasikan pergerakan material tanaman antardaerah/negara perlu dimonitor dengan seksama antara lain dengan peraturan karantina yang ketat. Keragaman *ecotype* Rs asal lokasi yang berbeda menunjuk-

kan korelasi dengan sifat agresifitas strain Rs. Hal penting yang masih perlu dilakukan adalah pemilihan metode *typing* secara molekuler yang paling tepat untuk melihat keragaman strain Rs.

Saat ini analisis PCR masih perlu dievaluasi lebih lanjut, adalah untuk mendeteksi bakteri Rs yang bersifat tular benih (*seed borne*) seperti pada kacang tanah dan kentang. Di samping hal tersebut perlu diteliti identifikasi gen virulen dalam kromosom dan plasmid genom Rs untuk melihat keragaman genetik lebih lanjut. Hal ini sangat penting baik bagi ahli penyakit maupun pemulia tanaman dalam mengembangkan strategi pengendalian penyakit layu bakteri.

KESIMPULAN

Penyakit layu yang disebabkan oleh bakteri Rs merupakan salah satu penyakit yang cukup merusak pada berbagai tanaman bernilai ekonomi penting dan patogennya dikenal mempunyai keragaman genetik yang tinggi. Oleh karena itu, saat ini diagnosis strain yang lebih informatif dibandingkan dengan metode yang sudah ada masih diperlukan.

Penelitian teknik genetik molekuler untuk diagnosis strain khususnya dengan PCR cukup akurat, cepat serta menghasilkan informasi yang lebih luas dibandingkan dengan metode konvensional. Beberapa pendekatan untuk penelitian lebih lanjut yang dapat dilakukan antara lain (a) karakterisasi keragaman alami Rs menggunakan berbagai analisis sidik jari DNA (*schizotyping*, hibridisasi DNA, RFLP, dan RAPD) serta menghubungkannya dengan keragaman virulensi dan ciri-ciri fenotipik dan kisaran inang, (b) pengembangan uji secara praktis dan akurat misalnya dengan PCR untuk deteksi patogen Rs terbawa benih (kualitatif dan kuantitatif) sehingga diharapkan menghasilkan benih bebas dari infeksi, dan (c) pengembangan sumber ketahanan layu bakteri berdasarkan *ecotype* strain yang dominan.

DAFTAR PUSTAKA

Anderson, R.P. and J.R. Roth. 1977. Tandem genetic duplication in phage and bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 31:473-505.

Boucher, C.A., F. van Gijsegem, P. Barberis, A.M. Arlat, and C. Zischeck. 1987. *P. solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. J. Bacteriol. 169:5626-5632.

Buddenhagen I., L. Sequeira, and A. Kelman. 1962. Designation of races of *P. solanacearum.* Phytopathol. 52:762.

Cook, D. and L. Sequeira. 1994. Strain differentiation of *P. solanacearum* by molecular genetic methods. *In* Hayward, A.C. and G.L. Hartman (*Eds.*). Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agents, *P. solanacearum.* CAB, International, Wallingford, UK. p. 77-93.

Cook, E. Barlow, and L. Sequeira. 1989. Genetic diversity of *P. solanacearum* detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitivity respons. Mol. Plant-Microbe Interactions 2:113-121.

Denny, T.P., B.F. Carney, and M.A. Schell. 1990. Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *P. solanacearum* to cause wilt symptoms. Mol. Plant-Microbe Interactions 3:293-300.

Eden-Green, S.J. and H. Sastraatmadja. 1990. Blood disease present in Java. FAO Plant Prot. Bull. 38:49-50.

Fegan, M., M. Taghavi, L. Sly, and A.C. Hayward. 1998. Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *R. solanacearum. In* Prior, P., C. Allen, and J. Elphinstone (*Eds.*). Bacterial Wilt Disease, Molecular and Ecological Aspects. Springer-Verlag Berlin, Germany. p. 19-33.

French. 1992. Host resistance. *In* Hayward, A.C. and G.L. Hartman (*Eds.*). Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *P. solanacearum.* CAB, International Wallingford, UK. p. 380-381.

Gillings, M. and P. Fahy. 1993. Genetic diversity of *P. solanacearum* biovars 2 and N2 assessed using restriction endonuclease analysis of total genomic DNA. Plant Pathol. 42:744-753.

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *P. solanacearum.* J. Appl. Bacteriol. 27:265-277.

Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *P. solanacearum.* Annu. Rev. Phytopathol. 29:67-87

Holloway, B., V. Khrisnapillai, and M.D. Escuadra. 1994. Whole genome analysis of Pseudomonads and its application to *P. solanacearum*. *In* Hayward, A.C. and G.L. Hartman (*Eds.*). Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *P. solanacearum.* CAB, International Wallingford, UK. p. 59-76.

Ito, S., T. Fujii, Y. Ushijima, S. Tanaka, M. Kanaya-Iwaki, S. Yoshiwara, and F. Kishi. 1996. Genomic diversity of field isolates of *B. solanacearum* in Japan. J. Phytopathol. 144:504-505.

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *P. solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathol. 44:693-695.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In* Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. John Willey and Sons, Chichester. p. 115-175.

Leblond-Bourget, N., H. Phillipe, I. Mangin, and B. Decaris. 1996. 16S rRNA and 16S to 23 S internal transcribed spacer sequence analysis reveal inter and intra specific *Bifidobacterium* phylogeny. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:102-111.

Li, X., M. Dorsch, T. Del Dot, L. Sly, E. Stackebrandt, and A.C. Hayward. 1993. Phylogenetic studies of the rRNA group II Pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. J. Appl. Bacteriol. 74:324-329.

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* serocluster 1, 2, 3, strains. Appl. Environ. Microbiol. 59:1702-1708.

Lupski, J.R. and G.M. Weinstock. 1992. Short interspersed repetitive DNA sequences in prokariotyc genomes. J. Bacteriol. 174(14): 4525-4559.

Machmud. M. 1986. Bacterial wilt in Indonesia. *In* Persley, G.J. (*Ed.*). Bacterial Wilt in Asia and Southern Pacific. ACIAR Proc. 13:30-34.

Maghirang, R.G. 1993. Development of biovar specific DNA probes for *P. solanacearum.* ACIAR. *Unpublished report.*

Opina, N., F. Tavner, G. Hallway, J.F. Wang, T.H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Khrisnapillai, W.F. Hong, B.W Holloway, and J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *P. solanacearum*). Asia Pacific J. Mol. Biol. and Biotechnol. 5:19-30.

Palleroni, N.J., R. Kunisawa, R. Contopollou, and M. Doudoroff. 1973. Nucleic acids homologies in the genus Pseudomonas. Int. J. Syst. Bacteriol. 23:333-339.

Ralston, E., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1973. *P. pickettii* a new species of clinical origin related to *P. solanacearum.* Int. J. Syst. Bacteriol. 23:15-19.

Roberts, S.J., J. Eden-Green, P. Jones, and D.J. Amblers. 1990. *Pseudomonas syzigii* sp. nov, the cause of Sumatra disease of cloves. Syst. and Appl. Microbiol. 13:34-43.

Seal, S.E. and J.G. Elphinstone. 1994. Advances in identification and detection of *P. solanacearum. In* Hayward, A.C. and G.L. Hartman (*Eds.*). Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *P. solanacearum.* CAB, International, Wallingford, UK. p. 35-57.

Smith, E.F. 1914. Bacteria in relation to plant diseases. Vol. 3. Washington. Carnegio Institution.

Smith, C.L. and G. Condemine. 1990. New approaches for physical mapping of small genomes. J. of Bacteriol. 72:1167-1172.

Smith, J.J., L.C. Offord, M. Holderness, and G.S. Saddler. 1995. Genetic diversity of *B. solanacearum* (synonim *P. solanacearum*) race 3 in Kenya. Appl. Environ. Microbiol. 61(12):4263-4268.

Suryadi, Y. 1999. Kajian keragaman genetik isolat *R. solanacearum* biovar 3 menggunakan penanda REP-PCR. J. Perlindungan Tanaman Indon. 5(1):13-19.

Suryadi, Y. and M. Fegan. 1999. Genomic fingerprinting for distinguishing biovars of *P. solanacearum* using different specific primer and repetitive PCR amplifications. J. Bioteknol. Pertanian 4(1):18-27.

Suryadi, Y., M. Fegan, dan A.C. Hayward. 1994. Penggunaan pelacak 16S rRNA untuk membedakan biovar *P. solanacearum.* Risalah Hasil Penelitian Tanaman Pangan 1:42-51.

Suryadi, Y., M. Machmud, Rusmadi, and M.A. Suhendar. 1998. Detection of *P. solanacearum* from latently infected potato tubers using ELISA and PCR techniques. J. Biol. Indon. 2(3):142-149.

Taghavi, M., A.C. Hayward, L.I. Sly, and M. Fegan. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *B. solanacearum. P. syzigii* and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:10-15.

Versalovic, J., T. Koeth, and J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19:6823-6831.

Wang, J.F., S. Li, and R. Maghirang. 1994. Detection of *P. solanacearum* in plant tissue using PCR. ACIAR *Unpublished report.*

Welsh and McCleland. 1991. Genomic fingerprinting produced by PCR with consencus tRNA gene primers. Nucleic Acids Res. 19:861-866.

Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphis amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

Woese, C.R., R. Guttel, R. Gupta, and H. Woller. 1983. Detailed analysis of the higher order structure of the 16S-like ribosomal ribonucleic acids. Microbiol. Rev. 47:621-669.

Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta, and Y. Nishiuchi. 1995. Transfer of two Burkholderia and an alcaligenes species to Ralstonia gen-nov-proposal of *R. Pickettii* (Ralston, Palleroni, and Doudoroff, 1973) comb-nov, *R. solanacearum* (Smith, 1896) comb-nov and *R. eutropha* (Davis, 1989) comb-nov. Microbiol. Immnunol. 39(11):879-904.