

BULETIN *AgroBio*

ISSN 0853-9022

Vol. 1, No. 1, 1996

JURNAL TINJAUAN ILMIAH RISET BIOLOGI DAN BIOTEKNOLOGI PERTANIAN



- Jamur Patogen Serangga: Potensi, Kendala, dan Strategi
Pengembangannya Sebagai Agen Pengendali
Biologi Wereng Coklat **Tri Puji Priyatno &
M. Kosim Kardin** 1
- Kemajuan Teknik Deteksi dan Identifikasi
Pseudomonas solanacearum **Yadi Suryadi &
Muhammad Machmud** 11
- Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Padi Sawah:
Masalah dan Pemecahannya **Hartini R. Hifni,
Soma Mihardja, Eddy Soetarwo, Yusida, &
M. Kosim Kardin** 18
- Rekayasa Genetik untuk Perbaikan Tanaman
Muhammad Herman 24



Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

Penerbit

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan,
(Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian,
Departemen Pertanian)

Alamat Penerbit

Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

Alamat Surat Elektronik

borif@indo.net.id & rifcb@indo.net.id

Telepon

+62 (251) 33-7975; 32-3420 [Suara]
+62 (251) 33-8820 [Faksimil]

Kala Terbit

Dua nomor per volume

Penanggung jawab Publikasi

Kepala Balai Penelitian
Bioteknologi Tanaman Pangan

Redaktur Eksekutif

Dr. Imam Prasadja

Redaktur Teknis

Dr. Sutaryo Brotonegoro
Dr. Ida Hanarida Somantri
Dr. Mohammad Iman
Ir. Budi Hari Priyanto
Dr. Muhammad Arifin
Dr. Muhammad Herman

Redaktur Pelaksana

Ir. Sri Purwandhari

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 mana pun 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.

Keterangan Gambar Sampul Luar (dari atas ke bawah):

- Jagung transgenik (biru), jagung non-transgenik (kuning)
- Infeksi cendawan patogen *Beauveria bassiana* pada walang sangit (*Leptocorsiva varicornis*)
- Penurunan efisiensi pemupukan akibat cekaman lingkungan

Kemajuan Teknik Deteksi dan Identifikasi *Pseudomonas solanacearum*

Y. Suryadi dan M. Machmud

Kelompok Peneliti Diagnostik dan Pengendalian Biologi
Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan

ABSTRACT

Y. Suryadi and M. Machmud. 1996. Progress on Detection and Identification of *Pseudomonas solanacearum*. Buletin AgroBio 1(1): 11-17. Bacterial wilt caused by *P. solanacearum* is a serious disease on various crops. The difficulties in the disease control is due to genetic variability of the pathogen. In the past few years, detection and identification of *P. solanacearum* which was based on host ranges and physiological/biochemical characteristics, resulted in five races and five biovars. The classification was not satisfactorily accepted. It is necessary to develop early, rapid, and accurate disease detection techniques amenable for analysis of genetic variability of the pathogen. This paper overviewed progress on *P. solanacearum* detection based on physiological and biochemical characteristics, such as the use of Bactid, Biolog, fatty acid profiles, and protein profiles. In addition new approaches on molecular *P. solanacearum* detection through DNA fingerprinting i.e., RFLP, RAPD, ribotyping, subtractive hybridization and PCR were also described. Future prospect on the application of these techniques in Indonesia is mentioned.

KEY WORDS

Pseudomonas solanacearum, detection, identification

Pseudomonas solanacearum merupakan penyebab penyakit layu bakteri yang sampai saat ini masih merupakan faktor pembatas produksi tanaman utama seperti pada kacang tanah, tomat, dan kentang. Patogen ini mempunyai inang lebih dari 200 spesies tanaman yang tergolong ke dalam 44 famili (17). Berdasarkan hasil survei di Indonesia, penyakit layu bakteri tersebar luas, di antaranya menyerang kacang tanah dengan intensitas mencapai 35% (22). Berbagai usaha pengendalian telah dilakukan, namun penyakit layu masih sulit dikendalikan karena keragaman patogennya sangat luas.

Berbagai aspek penyakit tanaman yang berhubungan dengan morfologi, fisiologi, epidemiologi, interaksi inang-patogen, dan pengendaliannya telah banyak dipelajari (5, 16, 21, 22, 31). Meskipun demikian, banyak hal yang belum

ditelaah. Pengelompokan penyakit layu bakteri sangat rumit karena patogennya mempunyai kisaran inang yang luas dan tidak terbatas pada satu spesies, sehingga tidak dapat dikelompokkan ke dalam tingkat patovar (kelompok isolat dengan sifat patogenitas terhadap inang tertentu).

Saat ini terdapat dua sistem yang berbeda untuk pengelompokan *P. solanacearum*, yaitu sistem ras dan biovar (28). Buddenhagen dan Kelman (5) mengelompokkan patogen menjadi lima ras, yaitu ras 1, 2, 3, 4, dan 5 berdasarkan kisaran tanaman inangnya. Penentuan isolat dengan cara ini sangat beragam hasilnya, meskipun antara isolat berasal dari inang yang sama. Abdulah (1) melaporkan bahwa isolat *P. solanacearum* asal jahe dan kacang tanah tidak patogenik terhadap kecipir, sedangkan isolat-isolat asal kecipir dan tanaman solanaceae beragam patogenitasnya pada kecipir. Hal yang sama

dilaporkan oleh Machmud & Hayward (21) dan Subandiyah & Hayward (31), bahwa selain biovar yang berbeda, isolat asal kacang tanah juga menunjukkan perbedaan virulensi.

Hayward (18) mengelompokkan isolat *P. solanacearum* ke dalam 4 biotipe atau biovar berdasarkan ciri biokimia dan fisiologi. Pengujian biovar didasarkan pada reaksi oksidasi terhadap tiga jenis gula disakarida (maltosa, laktosa, selobiosa), dan tiga jenis gula alkohol (manitol, sorbitol, dulcitol). Biovar 3 dominan di Asia, sedangkan biovar 4 dilaporkan terdapat di Cina, Filipina, dan Australia (17). Selanjutnya He *et al.* (18) menemukan biovar 5 asal tanaman murbei (*Morus alba*) di China (Tabel 1). Di Indonesia, isolat asal kacang tanah dari berbagai daerah yang diuji semuanya tergolong ras 1 biovar 3, kecuali satu isolat asal Irian Jaya termasuk biovar 4 (22). Ras dan biovar merupakan pengelompokan secara tidak resmi pada tingkat intrasubspesies, dan bukan dikembangkan melalui peraturan taksonomi bakteri yang resmi (*International Code for Bacterial Nomenclature, ICBN*) (17).

Deteksi dan identifikasi patogen merupakan kegiatan penting untuk mengetahui patogen dalam hubungannya dengan pengelompokan patogen.

Yang dimaksud dengan pengelompokan ialah penyusunan se-

Tabel 1. Pengelompokan biovar *P. solanacearum* berdasarkan ciri fisiologisnya (Hayward 1964, He *et al.* 1984).

Uji	Biovar				
	1	2	3	4	5
Oksidasi					
Selobiosa	-	+	+	-	+
Laktosa	-	+	+	-	+
Maltosa	-	+	+	-	+
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

cara sistematis isolat ke dalam kelompok alamnya (taksa). Teknik pengelompokan patogen layu bakteri belum memadai, sehingga perlu dikembangkan teknik-teknik baru yang lebih sesuai. Perkembangan teknik identifikasi dapat mempengaruhi tatanama sehingga menghasilkan peringkat-peringkat baru dalam pengelompokannya. Deteksi yang cepat, khas, dan peka sangat diperlukan untuk menghindari kerusakan akibat penyakit. Idealnya, patogen dapat terdeteksi pada tanah dan bahan tanaman sebelum benih ditanam.

Tulisan ini berkenaan dengan kemajuan penelitian deteksi dan identifikasi isolat layu bakteri yang relatif baru. Deteksi yang bersifat dini, cepat, dan tepat terhadap *P. solanacearum* diharapkan dapat dijadikan sebagai rujukan untuk mengembangkan teknik-teknik pengendalian penyakit layu bakteri.

TEKNIK DETEKSI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI

Diagnosis penyakit bakteri biasanya dilakukan berdasarkan suatu gejala dan munculnya eksudat bakteri dari jaringan tanaman. Pengamatan lebih lanjut masih diperlukan untuk mengkonfirmasi hasil diagnosis. Identifikasi ialah proses yang diterapkan terhadap suatu isolat, sehingga melalui proses tersebut isolat dapat dirujuk kepada taksa yang telah diketahui. Sifat-sifat yang telah dikembangkan untuk identifikasi ke tingkat taksa, di antaranya ciri fenotipik, biologi, dan genetik. Ciri fenotipik, misalnya pewarnaan Gram, morfologi koloni, dan tipe metabolisme secara umum. Patogenisitas yang berkaitan dengan hubungan antara inang dan patogen merupakan salah satu ciri biologis; sedangkan ciri genetik berkaitan dengan sifat-sifat materi genetik sel (asam nukleat).

Ada beberapa cara tradisional untuk deteksi dan isolasi bakteri dari contoh. Perkembangan metode deteksi *P. solanacearum* di antaranya menggunakan media selektif untuk menghitung populasi bakteri dari dalam tanah (28).

Pendekatan untuk mendeteksi layu bakteri telah dilakukan dari berbagai aspek metodologi, yang prinsipnya bertujuan untuk menentukan identitas *P. solanacearum*, di antaranya melalui metode biokimia, profil kromatografi asam lemak, profil metabolit, dan teknik imunologi (2, 3, 9, 19, 20, 27). Berikut ini akan dibahas beberapa hasil penelitian terbaru deteksi isolat *P. solanacearum*.

Pendekatan Fisiologi dan Biokimia

Dahulu, identifikasi antarspesies *Pseudomonas* didasarkan ciri-ciri fisiologi dan biokimia. Umumnya, isolasi secara konvensional isolat *P. solanacearum* dengan cara pengujian biokimia memerlukan pemurnian koloni tunggal bakteri, sehingga perlu waktu 2 sampai 3 minggu, yang kesimpulannya dapat diambil hanya sampai tingkat genus dan spesies, sedangkan untuk mendapatkan ciri yang lebih khas perlu dilakukan serangkaian pengujian lainnya. Perkembangan lebih lanjut menghasilkan kemo-taksonomi yang merujuk pada deskripsi pengelompokan bakteri berdasarkan komposisi kimianya. Sifat yang dianalisis meliputi, antara lain, komposisi/profil metabolit, profil asam lemak, profil protein, dan imunologi (2, 3, 9, 19, 20, 27).

Identifikasi berdasarkan Profil Metabolit

Akhir-akhir ini dikenal dua teknik identifikasi baru berdasarkan reaksi fisiologi/biokimia dan dirakit

dalam bentuk kit, yaitu sistem *Bactid* dan *Biolog*. Sistem *Bactid* digunakan sebagai metode pendahuluan untuk mengidentifikasi bakteri sehingga dapat dengan cepat mengeliminasi kontaminan saprofit atau mikroorganisme bukan sasaran lainnya. Kit *Bactid* terdiri atas delapan pengujian yang diikutsertakan dalam suatu cawan mikrotiter. Hasil pengujian dibaca melalui bantuan program yang ditulis berdasarkan *Expert System* (3).

Teknik *Biolog* dikembangkan oleh *Biolog International System* (Hayward, Inc, USA). Sistem *Biolog* pada mulanya digunakan untuk deteksi *Pseudomonas fluorescens* dan *P. solanacearum* (20). *Biolog* mempunyai data identifikasi untuk 569 taksa bakteri gram negatif dan 223 gram positif. Pola penggunaan substrat (profil metabolit) merupakan sifat-sifat taksa yang mendasarkan pengujian pada cawan mikrotiter yang mengandung 95 substrat (sumber Karbon yang berbeda) dan kontrol (tanpa sumber karbon) (3, 20). Sel bakteri pada fase pertumbuhan aktif dicuci dan diinkubasikan pada cawan dengan suhu inkubasi 27-28°C. Identifikasinya berdasarkan pada aktivitas reaksi respirasi bakteri yang terdapat pada panel dengan periode inkubasi 4 sampai 24 jam. Reaksi dilihat dari perubahan warna karena adanya pewarna Tetrazolium. Selanjutnya, pola hasil reaksi dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak komputer *Microlog*. Hasil pengujian isolat *P. solanacearum* menggunakan kedua sistem tersebut sesuai dengan sistem konvensional yang menggunakan seperangkat uji bakteri (20).

Identifikasi berdasarkan Profil Protein dan Asam Lemak

Profil protein dianalisis dengan teknik elektroforesis. Teknik ini cukup peka untuk membedakan

kesamaan sifat antargalur di dalam spesies, subspecies atau biovar bakteri (15). *Polyacrilamide gel electrophoresis* (PAGE) menghasilkan *elektroforegram* yang khas untuk setiap spesies bakteri yang diteliti. PAGE mempunyai keuntungan dapat memisahkan protein yang besar dan yang kecil. Hasil pengujian dengan PAGE memperlihatkan bahwa *P. solanacearum* mempunyai dua kelompok berdasarkan ciri pita utama yang dapat dibedakan dengan kelompok *Xanthomonas* dan *P. fluorescens* (9).

Analisis asam lemak yang bersifat mudah menguap (*volatile*) merupakan standar yang berguna untuk identifikasi bakteri anaerob (27). Analisis asam lemak yang diuji terhadap *P. solanacearum* menghasilkan empat kelompok infraspesifik, yaitu tiga kelompok yang berkorespondensi dengan ras 1, 2, dan 3 dan satu kelompok yang terdiri atas ras 1 dan biovar 1. Hasil pengujian dengan profil asam lemak dapat membedakan isolat yang avirulen dari ras yang berbeda, meskipun hasilnya tidak berkorelasi dengan biovar (19). Profil asam lemak saat ini dianggap sebagai salah satu alat yang dapat dipakai dalam taksonomi *Pseudomonas* (34).

Deteksi melalui Metode Imunologi/Serologi.

Metode imunologi berpotensi sebagai alat deteksi yang cepat untuk genus, spesies, atau patovar bakteri (28). Uji imunologi, antara lain mencakup teknik presipitasi, fiksasi, dan immuno-fluoresensi. Teknik identifikasi yang baru berkembang di antaranya pengujian serologi yang didasarkan pada antigen-antibodi khas yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya bakteri dalam jaringan tanaman.

Aplikasi serologi berguna untuk deteksi dan pengelompokan suatu

bakteri (taksonomi). Penelitian serologi bertujuan untuk mendapatkan antibodi khas dari ras atau biovar yang dapat digunakan untuk mendeteksi *P. solanacearum* dalam tanah, jaringan, dan bahan tanaman lainnya. Metode yang digunakan antara lain difusi ganda outerkloni dan immuno-elektroforesis (28). Uji serologi yang lebih peka untuk mendeteksi *P. solanacearum* adalah IFAS (*indirect immunofluorescence antibody staining*). Metode tersebut dapat mendeteksi infeksi laten pada umbi kentang (19). Pada perkembangan lebih lanjut DIBA (*dot immunobinding assays*) dan ISEM (*immunosorbent electron microscopy*) merupakan teknik lain untuk mendeteksi patogen. Metode lain yang tidak memerlukan pemurnian atau biakan bakteri terlebih dahulu adalah deteksi dengan menggunakan antibodi monoklonal dan poliklonal. Saat ini beberapa antibodi monoklonal dengan kekhasan yang tinggi sudah diproduksi di beberapa negara (2, 20). Dalam rekayasa genetika, antibodi monoklonal juga berguna untuk identifikasi sel yang mengandung produk gen (protein).

PENDEKATAN BIOLOGI MOLEKULER

Metode yang kini berkembang untuk mengidentifikasi isolat *P. solanacearum* adalah analisis pola asam nukleat. Pada prinsipnya, teknik yang dikembangkan pertama kali oleh Marmor (24) meliputi kegiatan lisis sel, ekstraksi protein, presipitasi, dan pemurnian asam nukleat. Penentuan sifat molekuler melalui analisis asam nukleat (DNA atau RNA) merupakan teknik identifikasi yang dapat mengungkap kemiripan genetik antarkelompok taksa. Keuntungan dari teknik ini adalah dapat digambarkannya informasi evolusi patogen. Teknik identifikasi genus dan spesies bak-

teri berdasarkan pola sidik jari DNA/RNA yang telah dikembangkan di luar negeri ialah analisis plasmid, komposisi basa DNA, analisis genom, *schizotyping*, dan PCR (6, 7, 8, 10, 12, 13, 25). Pencarian pelacak DNA (*probe*) khas dengan analisis menggunakan alat PCR merupakan teknik terbaru untuk mendeteksi *P. solanacearum* yang tidak memerlukan pemurnian dan perbanyakan bakteri terlebih dahulu (28). Berikut ini diuraikan beberapa hasil penelitian penentuan pola sidik jari DNA yang telah dilakukan untuk deteksi isolat *P. solanacearum*.

BRENDA (Bacterial Restriction Endonuclease Analysis)

Penentuan pola sidik jari total DNA genomik bakteri dapat dipelajari berdasarkan potongan untai DNA dengan menggunakan enzim restriksi endonuklease (*restriction enzyme*). Enzim akan mengenal dan memotong DNA pada sekuen nukleotida yang khas dan menghasilkan untai DNA terpisah pada *gel electrophoresis* (13). Berdasarkan analisis enzim restriksi menggunakan *Salmonella* (*Sal* I), Subandiyah dan Hayward (31) yang mengevaluasi isolat asal Australia dan Indonesia melaporkan bahwa semua isolat biovar 3 asal Australia mempunyai pola untai DNA yang sama dengan isolat kacang tanah biovar 3 asal Indonesia.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Adanya seleksi alami menimbulkan keragaman *P. solanacearum*. RFLP digunakan sebagai dasar untuk bagan pengelompokan baru yang merujuk pada keragaman genetik. Analisis genetik bakteri patogen melibatkan aplikasi cara molekuler yang diperlukan untuk

mempelajari gen-gen bakteri yang penting beserta seluruh aspeknya. Keberadaan plasmid dan peranannya dalam sel bakteri telah banyak ditelaah di mana plasmid menentukan sejumlah fungsi penting dalam interaksi inang-bakteri (termasuk faktor patogenisitas dan virulensi). Boucher (4) yang melakukan pendekatan dengan cara meneliti gen virulensi *P. solanacearum* menyimpulkan bahwa gen virulensi tersebut terletak pada megaplasmid.

Dengan teknik RFLP, pola sidik jari DNA diperoleh dari hasil pemotongan dengan enzim restriksi, selanjutnya dipindahkan ke membran dan dianalisis lebih lanjut menggunakan pelacak DNA (*probe*). Pelacak DNA yang diperoleh dari sekuen nukleotida khas setelah ditandai, sinyalnya dapat dibaca melalui teknik hibridisasi Southern (33). Cook (6) menggunakan sembilan pelacak DNA yang mencirikan informasi gen virulensi dan reaksi hipersensitif (gen *hrp*) untuk menguji 62 isolat *P. solanacearum* yang meliputi tiga ras dan lima biovar. Berdasarkan analisis untai DNA, hasil enzim restriksi *Eco* RI dan *Bam* HI didapatkan 28 pola genotipe multilokus yang unik (*RFLP group*). Hasil pengelompokan terhadap RFLP menghasilkan dua kelompok (Tabel 2), yaitu:

- (1) divisi I yang terdiri dari ras 1, biovar 3, biovar 4, dan biovar 5; dan
- (2) divisi II yang terdiri dari ras 2, ras 3, biovar 1, dan biovar 2.

Data RFLP tersebut mencerminkan pengelompokan inang dan fisiologis. Sifat-sifat yang berkorelasi kuat dengan data RFLP adalah daerah penyebaran asal-usul isolat. Namun demikian, pendekatan dengan RFLP ternyata masih mempunyai pola yang terlalu rumit untuk diterapkan.

Pola Restriksi Ribosomal RNA (*Ribotyping*)

Teknik uji ini merupakan jenis lain dari RFLP yang menggunakan penanda gen ribosomal RNA (r-RNA) atau rDNA sebagai pelacak. Pola yang dilihat meliputi jumlah dan distribusi operon rRNA pada genome bakteri (37). Dengan menggunakan teknik ini, Suryadi (32) melakukan uji pemotongan dengan enzim restriksi *Eco*RI terhadap 12 isolat *P. solanacearum* meliputi 4 biovar, dan pelacak DNA yang berasal dari sekuen 16S rDNA. Hasil pengujian menunjukkan bahwa enam ribotipe yang berbeda yang jelas dapat dibedakan menurut biovar (Tabel 3). Keragaman polimorfisme DNA isolat *P. solanacearum* terlihat pada biovar 2, meskipun isolat itu berasal dari geografis yang sama. Isolat tersebut (0732 dan 137S), masing-masing diisolasi dari tanaman tomat asal Australia (*Northern Territory dan Queensland*). Berdasarkan analisis pengelompokan data RFLP dan RAPD, kedua isolat tersebut terpisah jauh dari isolat kelompok biovar 2 lainnya (6, 23).

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Teknik penentuan pola sidik jari DNA ini terdiri dari tiga tahap, yaitu (a) denaturasi ikatan DNA rangkap menjadi ikatan tunggal, (b) *annealing* dua primer yang berlawanan pada DNA yang terdenaturasi, dan (c) pengembangan primer setelah penambahan enzim polimerase, sehingga menghasilkan cetakan DNA baru (12, 26). Berbagai metodologi penggunaan alat PCR telah dikembangkan, di antaranya RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), *tRNA consencus primer*, dan ERIC-PCR (*Enteropetitive Intergenic Consensus*) (23).

Tabel 2. Pengelompokan *P. solanacearum* berdasarkan RFLP dengan menggunakan 9 pelacak DNA (Cook *et al.* 1989)

	Divisi I	Divisi II
Ras/biovar dalam divisi	ras 1 bv 3, 4, 5	ras 2, 3 bv 1, 2
Jumlah FLP	16	12

Tabel 3. Kelompok DNA *P. solanacearum* berdasarkan pelacak 16S rDNA (Suryadi *et al.* 1994).

Kelompok ribotipe	Biovar	Nomor Isolat
1	1	1075
2	2	0732
3	2	018, 1079, CIP310, 016, CIP 296, 0506
4	2	137S
5	3	0333, 1082
6	4	0279
Jumlah = 6	4	12

Dengan DNA primer RAPD yang terdiri dari 10 nukleotida, primer yang khas menghasilkan pola yang dapat membedakan isolat biovar 2, 3, dan 4. Ini dilakukan oleh Tavner dan Timmis (35) yang menguji 30 primer RAPD untuk menggandakan untai DNA antara 100 - 4000 bp melalui PCR, sehingga menghasilkan enam klon DNA. Di lain pihak, Maghirang (23) yang meneliti 70 - 80 primer RAPD untuk mengidentifikasi isolat Australia biovar 2 dan 3 menyimpulkan bahwa primer yang menghasilkan polimorfisme yang jelas/kuat untuk menggandakan produk DNA jumlahnya terbatas. Kelompok isolat biovar 2 sangat beragam, sedangkan dalam kelompok isolat biovar 3 asal Australia, dapat dibagi menjadi dua kelompok yang berbeda, yaitu kelompok isolat asal Queensland dan New South Wales. Pengelompokan menurut RAPD, hasilnya berbeda dengan pendekatan RFLP (6), di mana RAPD gagal menempatkan isolat biovar 2 ke dalam divisi II (23).

DNA Sequencing untuk Pencarian Primer dan Pelacak DNA

Fegan dan Hayward (11) telah meneliti daerah di antara gen 16S dan 23S rRNA. Hasilnya menunjukkan keragamannya tinggi bila dibandingkan gen 16S. Selanjutnya, hasil *sequencing* itu dikembangkan menjadi pelacak DNA untuk membedakan isolat *P. solanacearum*. Pelacak DNA dapat diperoleh dari kromosom, plasmid, atau gen. Biasanya pelacak DNA ditandai dengan radioaktif (misalnya ^{32}P), sehingga membentuk bercak hitam pada film radiosensitif dan memberi sinyal pada posisinya (14, 15). Pelacak DNA khas yang dapat membedakan biovar *P. solanacearum* telah dikembangkan di Universitas Adelaide, Australia. Pelacak DNA tersebut telah diuji di Taiwan dan menunjukkan hasil yang positif untuk membedakan biovar, tetapi pelacak DNA tersebut tidak bereaksi terhadap isolat biovar 4 asal Taiwan (36). Dorner dan Holloway (10) melakukan pendekatan dengan menguji klon kosmid terpilih asal biovar 3 yang mempunyai sekuen DNA yang mampu membedakan isolat biovar 2. Daerah khas yang diperoleh dari hasil enzim restriksi kemudian dijadikan pelacak DNA untuk membedakan ras dan biovar. Selanjutnya, Taghavi mencoba mengidentifikasi dua kelompok primer khas untuk membedakan isolat, sejalan dengan penelitian RFLP Cook (6). *Sequencing* primer gen 16S rRNA dirancang untuk mendeteksi masing-masing *P. solanacearum* divisi I (biovar 3, 4) dan divisi II (biovar 1, 2, dan N2). Primer yang diteliti kemudian ditandai secara non radioaktif, dijadikan pelacak DNA, dan diuji dengan teknik DNA slot blot. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa 80 isolat yang diuji terdistribusi dalam dua kelompok yang sesuai dengan pengelompokan Cook (6) (Taghavi, komunikasi pribadi).

Seal (29) menguji primer khas untuk mendeteksi infeksi laten *P. solanacearum* pada bahan tanaman. Sekuen DNA patogen tersebut diidentifikasi dengan menggunakan *sequencing* 16S rRNA dan teknik *subtractive hybridization*. Setelah penggandaan melalui teknik PCR, primer yang dihasilkan mampu mendeteksi sel tunggal bakteri. Metode ini berguna karena dapat dilakukan tanpa pemurnian bakteri dan asam nukleat terlebih dahulu. Uji PCR dengan primer tersebut saat ini telah dilakukan di berbagai negara tropis, misalnya Malaysia, Burundi, dan Mauritius (29). Tavner dan Timmis (35) juga meneliti klon tunggal 0158-2 asal *P. solanacearum* biovar 2 yang diuji dengan teknik *subtractive hybridization*. Klon yang mempunyai urutan khas terhadap 0158 dibuat primer melalui *sequencing* DNA untuk penggandaan produk PCR pada daerah 309 bp.

PROSPEK APLIKASI BIOLOGI MOLEKULER UNTUK DETEKSI *P. SOLANACEARUM* DI INDONESIA

Teknik baru deteksi dan identifikasi bakteri berkembang sangat cepat dari waktu ke waktu, karena kemajuan di bidang industri diagnostik molekuler, sehingga memerlukan kemampuan dan pengetahuan yang luas.

Secara tradisional, metode identifikasi *P. solanacearum* dengan pengujian biokimia dan fisiologis memerlukan waktu. Metode profil metabolit dan profil asam lemak, meskipun cukup cepat, masih memerlukan koloni tunggal bakteri yang dalam pelaksanaannya dapat saja berasosiasi dengan mikroorganisme lain (29). Penggunaan teknik serologi sangat memerlukan antigen yang khas karena pengujian ini didasarkan pada reaksi aglutinasi yang khas. Manfaat penggunaan

perangkat deteksi molekuler yang cepat dan peka untuk deteksi *P. solanacearum* akan sangat membantu terutama untuk memantau infeksi laten bakteri pada bahan tanaman yang tidak menunjukkan gejala.

Berbagai metode untuk identifikasi *P. solanacearum* saat ini telah diuji di berbagai negara (28). Meskipun hubungan pola sidik jari DNA dengan sistem klasifikasi yang sudah ada belum jelas, pendekatan biologi molekuler menunjukkan keragaman genetik yang cukup besar. Analisis pola sidik jari DNA dengan RFLP oleh Cook (6) yang mengelompokkan isolat *P. solanacearum* ke dalam 28 kelompok RFLP ternyata masih cukup rumit. Gen bakteri yang berada pada DNA kromosomal dan DNA plasmid, terlibat dalam menentukan ciri-ciri fenotipik. Hal tersebut sekarang banyak dipelajari dalam kloning gen khusus dan pemetaan untuk menentukan sekuen gen yang memberikan keterangan fungsi yang *homolog*. Dengan tersedianya keterangan sekuen nukleotida khas untuk membedakan ras dan biovar *P. solanacearum*, prospek aplikasi teknik ini dapat diadopsi yang selanjutnya mungkin dapat pula dimodifikasi dan disesuaikan dengan kondisi di Indonesia.

Kemajuan deteksi molekuler untuk mengidentifikasi isolat *P. solanacearum* saat ini masih memerlukan sistem yang efisien, sehingga diharapkan akan lebih mudah, murah, dan bermanfaat. Idealnya, hal tersebut harus mencakup beberapa aspek penting, antara lain (a) kemudahan untuk dikerjakan oleh peneliti yang kurang pengalaman di bidang genetika molekuler, (b) ketepatan, (c) dapat digunakan di laboratorium dengan fasilitas yang sederhana, dan (d) menggunakan bahan non radioaktif. Deteksi asam nukleat melalui teknik hibridisasi dengan pelacak radioaktif mempunyai beberapa kelemahan,

di antaranya menyangkut faktor risiko kesehatan dan ketidakstabilan ^{32}P (28). Saat ini penandaan pelacak DNA sudah dapat dilakukan secara non radioaktif (enzimatik dan kemik). Hal tersebut telah berkembang dengan hasil yang cukup peka untuk mendeteksi beberapa bakteri patogen tumbuhan (7).

Usaha pencarian pelacak DNA yang dapat mencirikan isolat *P. solanacearum* asal lapangan masih terus dilakukan. Penentuan ciri isolat *P. solanacearum* asal lapangan melalui pola sidik jari DNA sangat berguna baik untuk pemulia tanaman maupun ahli penyakit tanaman. Kekhasan pelacak DNA yang ideal, kemungkinan perlu dicari berdasarkan pendekatan Seal (29) yang menguji *subtractive hybridization* untuk memperoleh pelacak DNA yang khas untuk membedakan ras (pelacak diagnostik). Dengan alat PCR, *arbitrary primer* mungkin juga dapat digunakan untuk melihat pola sidik jari DNA (25, 38). Dalam penggunaan alat PCR, yang perlu dijaga, antara lain pengawasan yang baik dalam hal penanganan bahan yang sangat peka. Ini penting terutama untuk laboratorium di negara berkembang. Hal tersebut menyangkut segi biaya, baik untuk penelitian, perawatan, maupun cara penggunaannya.

Penggunaan PCR sebagai alat masih mempunyai beberapa kelemahan. Pengujian deteksi DNA dari satu sel bakteri kepekaannya dapat berkurang seandainya terdapat senyawa yang dapat menghambat enzim polimerase (28).

Hal penting lainnya yang harus dilakukan ialah menentukan korelasi berbagai sistem pengelompokan pola sidik jari DNA dengan sistem pengelompokan yang ada.

KESIMPULAN DAN SARAN

Deteksi dan identifikasi bakteri patogen secara konvensional pada dasarnya bertujuan untuk diagnosis yang berkaitan dengan aspek penyakit tanaman, sedangkan untuk diagnosis konfirmasi diperlukan serangkaian teknik pengujian dan analisis lainnya.

P. solanacearum merupakan spesies yang kompleks yang memperlihatkan keragaman genetik yang sangat berbeda. Teknik serologi dan molekuler dapat digunakan untuk menganalisis informasi keragaman ciri patogen. Deteksi dan identifikasi patogen yang tepat dan cepat bermanfaat dalam strategi pengendalian. Sementara itu, teknik deteksi dan identifikasi terus berkembang dari waktu ke waktu.

Penggunaan teknik dan cara molekuler terutama dengan PCR diharapkan menghasilkan perangkat deteksi molekuler yang cepat dan bermanfaat untuk mengendalikan penyakit layu bakteri. Pengenalan secara rinci eksploitasi gen inang-patogen sangat penting untuk manipulasi genetik, di antaranya peranan *avrulen* gen, pengaturan ekspresi patogenisitas, dan pelacak DNA khas untuk mendeteksi isolat *P. solanacearum*. Cara molekuler untuk mendeteksi isolat *P. solanacearum* masih perlu dimodifikasi agar aplikasinya lebih bermanfaat terutama untuk menguji isolat yang ada di Indonesia.

KEPUSTAKAAN

1. Abdullah, H. 1980. A disease of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) caused by *P. solanacearum* in Malaysia. Pl. Dis. Rptr. 64: 798-799.
2. Alvarez, A. M., J. Berestecky, J.I. Stiles, S. A. Ferreira, and A. A. Benedict. 1994. Serological and molecular approaches to identification of *P. solanacearum*, p. 62-69. In G. L. Hartman and A. C. Hayward (eds.). Bacterial Wilt. ACIAR Proc. No. 45. Canberra, Australia.
3. Black, R. and K. Y. Lum. 1994. An integrated system for identification and characterization of plant pathogenic bacteria with special reference to *P. solanacearum*, p.15-26. In V. K. Mehan and A. C. Hayward (eds.). Groundnut bacterial wilt in Asia. Proc.3rd Working Group Meeting, Wuhan, China 4-5 Juli, 1994.
4. Boucher, C., A. Martinel, P. Barnberis, G. Alloing, and C. Zischek. 1986. Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *P. solanacearum*. Mol. Gen. Genet. 205: 270-275.
5. Buddenhagen, I. W. and A. Kelman. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *P. solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 2: 203-230.
6. Cook, D., E. Barlow, and L. Sequeira. 1989. Genetic diversity of *P. solanacearum* detection of RF-LP with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Mol. Pl-Microbe Interact. 2(3): 113-121.
7. Cottyn, B., A. T. Bautista, R. J. Nelson, J. E. Leach, J. Swing, and T. W. Mew. 1994. Polymerase chain reaction amplification of DNA from bacterial pathogen of rice using specific oligonucleotide primers. Int. Rice Res. Newsl. 19(1): 31-32.
8. DeParasis, J. and D. A. Roth. 1990. Nucleic acid probes for identification of phyto bacteria, identification of genus specific 16S rRNA sequences. Phytopathol. 80: 618-621.
9. Dianese, J. C. and M. C. G. Dristig. 1994. Strain characterization of *P. solanacearum* based on membrane protein patterns. In A. C. Hayward and G. L. Hartman. (eds.). Bacterial wilt: the disease and its causative agents, *P. solanacearum*. CAB Int. Wallingford, UK.
10. Dorner, C. and B. Holloway. 1993. Detailed analysis of DNA probes obtained from a cosmid library of *P. solanacearum*. Annual

- Report for ACIAR Project No 9015. (Abstract).
11. **Fegan, M. and A. C. Hayward. 1993.** Sequencing of the 16S - 23S spacer region. Annual Report for ACIAR Project No 9015. (Abstract).
 12. **Firrao, E. and R. Locci. 1994.** Identification of *Clavibacter michiganensis* subs. *sepedonicus* using the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 40: 148-151.
 13. **Foong, H. dan V. Khrisnapillai. 1993.** Whole genome analysis. In Annual Report for ACIAR Project No 9015. (Abstract).
 14. **Ganon, F. 1994.** DNA probes for the identification of microorganisms. *J. Indust. Microbiol.* 13: 71-76.
 15. **Gillings, M. 1990.** A manual for the identification of plant pathogenic bacteria using genomic DNA restriction analysis. 8th Australasian Plant Pathol. Conference.
 16. **Hayward, A. C. 1964.** Characteristics of *P. solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27: 265-277.
 17. **Hayward, A. C. 1991.** Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *P. solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65-87.
 18. **He, L. Y., L. Sequeira, and A. Kelman. 1983.** Characteristic of strains of *P. solanacearum* from China. *Plant Dis. Rptr.* 67: 1357-1361.
 19. **Janse, J. D. 1991.** Infra- and intraspecific classification of *P. solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. *System. Appl. Microbiol.* 14: 335-345.
 20. **Li, X, A. C. Hayward. 1994.** The use of the Biolog identification system for the rapid identification of plant pathogenic *Pseudomonads*, p. 45-48. In G. L. Hartman and A. C. Hayward (eds.). ACIAR Proc. No 45. Canberra, Australia.
 21. **Machmud, M. and A. C. Hayward. 1992.** Genetic and cultural control of peanut bacterial wilt, p. 19-25. In G. C. Wright and K. J. Middleton (eds.). Peanut improvement a case study in Indonesia. Proc. ACIAR/AARD/QDPI Collaborative Review Meeting, 19-23 Aug. 1991. Malang, Indonesia. ACIAR Proc. No 40, Canberra, Australia
 22. **Machmud, M. 1993.** Present status of groundnut bacterial wilt research in Indonesia, p. 15-24. In V. K. Mehan and A. C. Hayward (eds.). Groundnut bacterial wilt. Proc. Second Working Group Meeting, 2 Nov. 1992, Tainan Taiwan. ICCRISAT, AP, India.
 23. **Maghirang, R. G. 1993.** Relationships among biovar 1, 2, N2 and 4 of *P. solanacearum* based on random amplified polymorphic DNA (RAPDs). Unpublished report. Annual Report for ACIAR Project No 9015. (Abstract).
 24. **Marmur, J. 1961.** A procedure for the isolation deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.
 25. **Natural, M. and B. Holloway. 1993.** The use of PCR to differentiate isolates of *P. solanacearum*. Annual Report for ACIAR Project No 9015. (Abstract).
 26. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand., S. Stoffel., S. J. Scharf., R. Higuchi., G. T. Horn, and K. B. Mullis. 1988.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491.
 27. **Sasser, M. 1988.** Identification of bacteria through fatty acid analysis, p. 199-204. In Z. Klement et al. *Methods in phyto bacteriology.* Acad. Kiado, Budapest, Hungary.
 28. **Seal, S. dan J. G. Elphinstone. 1994.** Advances in identification and detection of *P. solanacearum*, p. 35-57. In A. C. Hayward and G. L. Hartman (eds.). Bacterial wilt, the disease and its causative agent *P. solanacearum*. CAB Wallingford, UK.
 29. **Seal, S., L. Jackson, dan M. Daniels. 1994.** Development of molecular diagnostic techniques for detection of *P. solanacearum* and identification of subgroups within this species, p. 97-104. In G. L. Hartman and A. C. Hayward (eds.). ACIAR proceedings No. 40. Bacterial wilt. ACIAR Proc. No. 45. Canberra, Australia.
 30. **Smith, A. R. 1994.** Polyclonal and monoclonal antibody based enzyme linked immunosorbent assays for *P. solanacearum*, p. 37-47. In V. K. Mehan and D. McDonald (eds.). Groundnut bacterial wilt in Asia. Proc. 3rd working group meeting, 2 Nov. 1994. Wuhan China.
 31. **Subandiyah, S, and A. C. Hayward. 1991.** The influence of some environmental factors and isolates variability on the development of peanut bacterial wilt caused by *P. solanacearum*. ACIAR meeting August 1991, Malang, Indonesia.
 32. **Suryadi, Y, M. Fegan, and A. C. Hayward. 1994.** The use of 16S rDNA pattern (ribotyping) for differentiation of biovar of *P. solanacearum*. Annual Report for ACIAR Project No 9015. (Unpublished report).
 33. **Stahl, D. A. and R. Amman. 1991.** Development and application of nucleic acid probe, p. 205-248. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.). Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Willey and Sons, New York.
 34. **Stead, D. E. 1992.** Classification and identification of *P. solanacearum* and other Pseudomonads by fatty acid profiling. In G. L. Hartman and A. C. Hayward (eds.). Bacterial wilt. ACIAR Proc. No 45, Canberra, Australia.
 35. **Tavner and J. Timmis. 1993.** Use of RAPD primer extension to detect strain specific genomic sequences. Annual Report for ACIAR Project No. 9015. (Abstract).
 36. **Wang, J. F. 1993.** Biovar identification of *P. solanacearum* and development of molecular detection methods using DNA probes (Unpublished report). AVRDC, Taiwan.
 37. **Weisburg, W.G, S.M. Barns, D.A Peletier, and D.J. Lane. 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
 38. **Williams, J. G. K, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990.** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids* 18: 6531-6535.