

**PENDETEKSIAN BAKTERI *Raistonia solanacearum*, Yabuuchi *et al* 1995  
MENGUNAKAN TEKNIK REAKSI POLIMERASE BERANTAI DAN PEMBEDAAN  
STRAIN MENGGUNAKAN TEKNIK HIBRIDISASI DNA**

[Detection of Bacteria *Raistonia solanacearum*, Yabuuchi *et al.* 1995 Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique and Strain Differentiation by DNA Hybridization Technique]

**Yadi Suryadi, M Machmud dan MA Suhendar**

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Jl. Tentara Pelajar 3a, Bogor 16111

Email: borif@indo.net.id

**ABSTRACT**

*Raistonia solanacearum*, the bacterial wilt pathogen, has a wide host range and genetic variability. Rapid and sensitive molecular techniques need to be developed for early detection and strain differentiation of the pathogen. Molecular techniques such as PCR and DNA hybridization have been successfully used to detect and identify bacterial plant pathogens including *R. solanacearum*. These techniques were adopted under Indonesian condition, using purified and crude DNA from infected plant samples. An *R. solanacearum* specific DNA primer (OH/Y2) was used in the PCR test, and a DNA probe 5a67 were used in the non-radioactive hybridization test. The PCR technique could be used to detect *R. solanacearum* from infected plant samples in less than 5 hours. The DNA hybridization technique was applicable to differentiate strains of *R. solanacearum* into three groups based on their DNA profiles.

Kata kunci/ key words: deteksi dini/ early detection; *Raistonia solanacearum*; reaksi polimerasi berantai/ Polymerase Chain Reaction (PCR); hibridisasi DNA/ DNA hybridization; pembedaan strain/ strain differentiation.

**PENDAHULUAN**

Bakteri *Raistonia solanacearum* (Yabuuchi *et al.* 1995) yang mempunyai sinonim *Pseudomonas solanacearum* (Smith 1896) Smith 1911, merupakan penyebab penyakit layu bakteri pada lebih dari 200 spesies tumbuhan (Gillings *et al.* 1993). Penyakit layu merupakan kendala utama produksi kacang tanah dan sayuran Solanaceae. Penyakit ini sulit dikendalikan, diantaranya karena patogennya mempunyai kemampuan yang cepat untuk merubah virulensinya. Patogennya juga menunjukkan ciri-ciri reaksi biokimia dan fisiologi serta ekologi yang sangat heterogen.

Pendeteksian patogen secara dini dan cepat merupakan salah satu upaya untuk menunjang keberhasilan pengendalian penyakit tumbuhan termasuk penyakit layu bakteri. Teknik untuk mendeteksi bakteri patogen tumbuhan secara konvensional yang dilakukan biasanya

meliputi isolasi dan pemurnian patogen diikuti dengan uji reaksi fisiologi dan biokimia serta uji patogenisitas pada tanaman inang. Hasil pengujian, kemudian dikelompokkan ke dalam kelompok biovar dan ras (Hayward, 1991; Buddenhagen *et al.* 1992). Cara tersebut memerlukan waktu yang lama dan hasilnya kadangkala kurang peka, sehingga pemberian rekomendasi pengendalian dan tindakan pengendalian penyakit terlambat dan tidak efektif.

Akhir-akhir ini banyak dikembangkan teknik baru yang bersifat molekuler seperti teknik Reaksi Polimerase Berantai (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) dan hibridisasi DNA yang lebih cepat dan akurat untuk pendeteksian isolat patogen termasuk bakteri (Firrao dan Locci, 1994). Teknik telah digunakan untuk mendeteksi virus tungro pada padi (Venkitesh *et al.* 1993), bakteri *Agrobacterium* (Dong *et al.* 1988), dan bakteri

*Clrvibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* pada unibi kentang (Firrao dan Locci, 1994). Gillings *et al.* (1993) telah menggunakan sekuen primer DNA tertentu yang bersifat spesifik yaitu untuk menyandi gen *polygalacturonase* (*peh A*) guna mendeteksi dan membedakan isolat dari biovar dan ras *R. solanacearum*. Seal *et al.* (1992) menggunakan teknik PCR untuk mendeteksi *R. solanacearum* dengan primer oligonukleotida yang bersifat spesifik spesies *R. solanacearum* dan dirancang dari sekuen gen 16S rRNA dari bakteri *R. solanacearum* (Seal *et al.* 1992).

Teknik lain yang telah digunakan untuk mendeteksi dan menganalisis asam nukleat ialah teknik hibridisasi DNA seperti *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Martin *et al.* 1990; Cook *et al.* 1989). Cook *et al.* (1991) telah menggunakan teknik RFLP untuk menganalisis DNA isolat-isolat *R. solanacearum* menggunakan 9 pelacak (*probe*) DNA untuk patogen tersebut. Hasilnya menunjukkan bahwa isolat *R. solanacearum* dapat dikelompokkan menjadi 30 kelompok RFLP yang secara genetik dapat dibedakan menjadi 2 kelompok besar strain, yaitu kelompok strain yang berasal dari Australia dan Asia (Australasia) dan kelompok strain yang berasal dari Amerika. Penggunaan teknik molekuler seperti PCR dan hibridisasi DNA selain dapat mendeteksi isolat secara cepat juga dapat menganalisis keragaman genetik isolat bakteri dari suatu populasi di daerah penyebaran yang berbeda. Penelitian ini dilakukan untuk (1) mengadopsi teknik PCR dan RFLP untuk mendeteksi *R. solanacearum* dan (2) membedakan strain *R. solanacearum* yang diisolasi dari tanaman kacang berdasarkan profil DNA-nya. Hal ini dilakukan sebagai upaya untuk mengembangkan teknik molekuler yang peka dan akurat untuk mendeteksi patogen tersebut secara dini di lapangan sekaligus mengetahui strainnya.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Bakteriologi Tumbuhan Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor, dan terdiri atas dua kegiatan penelitian yaitu (1) penggunaan teknik PCR untuk mendeteksi *R. solanacearum*, dan (2) identifikasi strain *R. solanacearum* menggunakan teknik hibridisasi DNA.

### Penggunaan Teknik PCR untuk Mendeteksi *R. solanacearum*

*Bahan-bahan yang diuji.* Pengujian teknik PCR dilakukan dua kali dengan menggunakan bahan uji yang berbeda. Pada pengujian I, bahan yang digunakan adalah unibi kentang dari tanaman sehat (#1), unibi kentang dari tanaman terinfeksi *R. solanacearum* (#2), batang kacang tanah (#3, 4, 5, 6, 7), biji kacang tanah dari tanaman sehat (#8), biji kacang tanah dari tanaman bergejala layu (#9), kulit biji kacang tanah terinfeksi *R. solanacearum* (#10), kulit biji kacang tanah dari biji sehat (#11), DNA *R. solanacearum* asal kacang tanah dari Bogor (isolat Rs 9542, #12), DNA *R. solanacearum* asal kacang tanah dari Subang (Rs 9501, #13), bufer TE sebagai kontrol negatif (#14), DNA *R. solanacearum* sebagai kontrol positif (#15 dan 16), air steril sebagai kontrol negatif (#17 dan 18), dan DNA dengan berat molekul baku dengan ukuran 300 bp (*base pair*, pasangan basa, #19). Contoh tanaman diambil dari Instalasi Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan (Inlitbio) Muara, Bogor, sedangkan umbi kentang diperoleh dari hasil percobaan lapangan di Instalasi Penelitian Tanaman Hias (Inlithi), Cipanas, Cianjur.

Pada pengujian II, bahan uji yang digunakan adalah: batang kacang tanah varietas Pelanduk 1 cm di atas tanah (#1 dan 13), batang kacang tanah var. Gajah 1 cm di atas tanah (#2 dan 14), batang kacang tanah varietas Pelanduk 3

cm di atas tanah (#3 dan 15), batang kacang tanah var. Gajah 3 cm di atas tanah (#4 dan 16), akar kacang tanah varietas Pelanduk (#5 dan 17), daun kacang tanah var. Pelanduk (#6 dan 18), DNAi?. *solanacectrum* sebagai kontrol positif (#9, 10, 21, 22), DNA dengan berat molekul baku IOObp sebagai pembanding (#11 dan 12).

*Penyediaan ekstrak tanaman.* Bagian tanaman yang digunakan terdiri atas akar dan batang kacang tanah. Sebagian contoh tanaman digunakan untuk uji PCR dalam bentuk ekstrak akar atau batang, sedangkan sebagian lainnya digunakan untuk mengisolasi patogennya.

Bagian tanaman kacang tanah (batang, akar atau daun yang akan dideteksi *R. solanacearum* dicuci bersih dengan air kran, dikeringkan dengan kertas tisu dan dipotong-potong dengan ukuran masing-masing 5 mm x 5 mm. Masing-masing potongan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf berukuran 1,5 ml yang berisi 1 ml akuades steril dan dibiarkan selama 10-15 menit agar eksudat bakteri keluar dari jaringan tanaman. Selanjutnya potongan tanaman diambil dari tabung dan suspensi dalam tabung dijadikan bahan yang dideteksi menggunakan teknik ELISA. Pada umbi kentang yang akan dideteksi, lubang berbentuk limas dengan garis tengah 5 mm dan kedalaman 5 mm dibuat pada stolon menggunakan skalpel atau silet. Lubang diberi air steril 200  $\mu$ l dan dibiarkan selama 10-15 menit agar keluar koloni bakteri. Cairan ekstrak umbi digunakan sebagai bahan uji.

*Penyediaan biakan murni dan DNA R. solanacearum.* Biakan murni bakteri diperbanyak dari isolat *R. solanacearum* hasil koleksi dari lapangan cawan petri yang berisi medium *Sucrose Peptone Agar* (SPA) (Fahy dan Hayward, 1983). Cawan biakan diinkubasikan pada suhu ruang selama 48-72 jam. Koloni *R. solanacearum* yang spesifik dimurnikan dengan memindahkan pada

cawan SPA lain dan diinkubasi selama 24 jam. Biakan murni *R. solanacearum* disuspensikan dalam air steril dengan kepekatan sekitar  $10^6$ - $10^8$  sel/ml. Sebagian suspensi disimpan dalam tabung eppendorf 1,5 ml berupa suspensi biakan murni dalam air steril pada suhu ruang, sedangkan sebagian lainnya diisolasi DNA-nya.

Pengisolasian DNA genomik *R. solanacearum* dilakukan menggunakan protokol dari Samadpour *et al.* (1988). Suspensi bakteri *R. solanacearum* (1 ml) yang telah disediakan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Endapan (pelet) bakterinya disuspensikan kembali dalam larutan 1 ml Tris HCl 50 mM, pH 8,0, dan disentrifugasi selama 5 menit. Kemudian peletnya disuspensikan dalam 0,7 ml buffer TE 50 mM dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 30 menit. Penghancuran dinding sel (lysis) bakteri dilakukan dengan menambahkan larutan 10  $\mu$ l SDS 20% dan 50  $\mu$ l enzim Proteinase K 1% dan diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah penambahan 0,7 ml fenol dan diinkubasikan kembali pada suhu 37°C selama 30 menit, tabung disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung eppendorf baru yang berisi larutan kloroform isoamil alkohol (24:1), dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya DNA dipresipitaskan dengan menambahkan 100  $\mu$ l larutan amonium asetat 5 M dan etanol dingin, serta disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet DNA yang diperoleh dicuci dengan etanol 70 % dan setelah kering disuspensikan ke dalam 50  $\mu$ l air steril.

*Pendeteksian R. solanacearum dengan teknik PCR.* Pada pengujian I, teknik PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA *R. solanacearum* adalah menurut protokol baku Seal

*et al.* (1992) yang sedikit dimodifikasi. Suspensi contoh yang diuji (masing-masing 150  $\mu$ l) ditempatkan dalam tabung eppendorf baru dan dipanaskan dalam air mendidih (suhu 100 °C) selama 15 menit. Selanjutnya dari masing-masing tabung diambil 2  $\mu$ l suspensi dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf baru yang berukuran 500  $\mu$ l sebagai *DNA template* yang akan diamplifikasi. Ke dalam tiap tabung eppendorf tersebut kemudian ditambahkan campuran larutan pereaksi PCR yang komposisinya sebagai berikut: 10 x bufer (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001 % gelatin), 0,2 mM dNTPs, 1,25 U/ $\mu$ l *Taq Polymerase* (Biotech. Internat'l., Perth), dan masing-masing 20  $\mu$ M primer oligonukleotida Oli (5'GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC3') dan Y2 (5'CCCACTGCTGCCT-CCGTAGGAGT3'). Setelah penambahan minyak mineral 20  $\mu$ l, tiap tabung dipanaskan dalam mesin PCR (*thermal cycler*, Hybaid) dengan program sebagai berikut: suhu denaturasi awal 96°C selama 2,5 menit dengan putaran (siklus) 30 kali, diikuti dengan suhu denaturasi 94 °C selama 30 detik, suhu *annealing* 67°C selama 30 detik, suhu ekstensi 72°C selama 30 detik, dan suhu ekstensi akhir 72°C selama 5 menit. Tahapan reaksi pada pengujian II sama dengan pada pengujian I, hanya bahan tanaman yang digunakan berbeda.

Setelah proses amplifikasi, produk DNA yang dihasilkan dipisahkan melalui proses elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5 % (Sigma A 6013) dalam larutan bufer 1 x TBE, pH 8,3, dengan pewarnaan menggunakan ethidium bromida (EtBr 0,5  $\mu$ g/ml) selama 30 menit dan diberi arus listrik dengan voltase 20 volt. Fragmen DNA yang dihasilkan dibandingkan dengan berat molekul baku 100 bp (*base pair*, pasangan basa).

Pengelompokan *R solanacearum* menggunakan teknik hibridisasi DNA

*Penyediaan isolat dan pengisolasian DNA genomik R. solanacearum.* Sebanyak 20 isolat *R solanacearum* asal kacang tanah digunakan dalam percobaan ini. Daftar isolat yang diuji disajikan pada Tabel 1. DNA genomik dari masing-masing isolat diisolasi menggunakan teknik menurut Sambrook *et al.* (1989). DNA hasil isolasi digunakan dalam proses hibridisasi.

*Hibridisasi DNA dan pengelompokan isolat R solanacearum.* Hibridisasi DNA dilakukan menurut metode Southern (1975) sebagai berikut. Mula-mula 10  $\mu$ g DNA dari tiap isolat *R. solanacearum* yang direstriksi (dipotong-potong) menggunakan enzim restriksi  *EcoRI*, kemudian dielektroforesis secara horizontal dalam agarose 1,0% dengan voltase 20 volt selama satu malam. Selanjutnya gel agarose diwarnai dengan cara merendam dalam larutan ethidium bromida (EtBr, 1  $\mu$ g/ml) selama 20 menit dan akhirnya dipindahkan secara kapiler ke membran nilon Hybond (Bohringer Mannheim). Hibridisasi DNA pada membran dilakukan menggunakan pelacak DNA (*probe*) 5a67 yang ditandai secara non-radioaktif menggunakan penanda DIG 11-dUTP (Boehringer Mannheim). Pelacak DNA yang sudah ditandai sebelumnya diuji pada membran nilon yang lain dengan metode *dot blot* (Southern, 1988) untuk menentukan konsentrasi pelacak yang akan digunakan. Selanjutnya reaksi *chemiluminescence* pada pendeteksian menggunakan film sinar x (*-array*). Profil DNA hasil hibridisasi diamati dan dibandingkan secara visual berdasarkan adanya polimorfisme fragmen DNA pada tiap isolat *if. solanacearum* yang diuji. Dengan cara ini, isolat yang diuji dapat dikelompokkan berdasarkan ciri-ciri pita DNA hasil hibridisasi.

## HASIL

### Penggunaan teknik PCR untuk mendeteksi *R. solanacearum*

Hasil pengujian, baik pada pengujian I maupun II menunjukkan bahwa reaksi PCR terjadi. Hal ini berarti DNA *R. solanacearum* yang berada dalam tabung PCR diamplifikasi oleh pasangan primer Oli/Y2, terbukti dari diperolehnya pita DNA hasil elektroforesis pada agarose (Gambar 1a dan 1b). Pada pengujian I, reaksi positif terjadi pada ekstrak yang berasal dari batang tanaman kacang tanah (#3,4, 5, 6, dan 7), sediaan murni DNA *R. solanacearum* asal kacang tanah dari Bogor dan Subang (#12 dan 13), serta DNA *R. solanacearum* yang digunakan sebagai kontrol positif (# 15, dan 16). Beberapa contoh yang diuji seperti ekstrak umbi kentang (# 1 dan 2) dan ekstrak kulit biji kacang tanah (contoh # 9 dan 10) tidak menunjukkan reaksi positif, berarti tidak terjadi amplifikasi DNA oleh primer DNA yang digunakan (Gambar 1a). Pada pengujian II hasilnya juga menunjukkan bahwa teknik PCR menggunakan primer Oli/Y2 juga mengamplifikasi DNA *R. solanacearum* langsung dari sel bakteri yang terdapat di dalam ekstrak tanaman kacang tanah (Gambar 1b). Hal ini ditunjukkan pada lubang kontrol positif (# 9, 10, 21, dan 22) dan lubang yang berisi ekstrak akar dan batang terinfeksi bakteri (#1,2,3,14,15, 17). Tetapi pada lubang # 4 dan 16 yang berisi ekstrak batang kacang tanah cv. Gajah dan #5 yang berisi ekstrak akar kacang tanah serta # 6 dan 18 yang berisi ekstrak daun kacang tanah tidak terjadi amplifikasi DNA. Produk DNA hasil amplifikasi pada pengujian I dan pengujian II berukuran 0,3 Kb. Pendeteksian *R. solanacearum* menggunakan teknik PCR menunjukkan bahwa contoh DNA murni dan suspensi yang berasal dari bagian akar, batang, maupun bagian antara akar dan batang menghasilkan adanya amplifikasi DNA (PCR

positif), sedangkan pada kontrol negatif (air steril) dan contoh bagian daun dan biji yang sehat, tidak terinfeksi *R. solanacearum* atau menunjukkan gejala layu bakteri, tidak menghasilkan amplifikasi DNA (reaksi PCR negatif). Pada pengujian II, contoh lapisan kulit biji kacang tanah menunjukkan reaksi PCR negatif, begitu pula contoh yang berasal dari bagian atas batang kacang tanah varietas Gajah (kira-kira 3 cm dari akar) belum dapat terpendeteksian lebih lanjut atau menghasilkan reaksi penghambatan (*inhibitor*). Pada contoh daun pun patogen *R. solanacearum* tidak terdeteksi. Pada bagian tersebut kemungkinan jumlah sel bakterinya tidak banyak atau tidak ada kolonisasi bakteri sama sekali. Ekstrak yang berasal dari umbi kentang menunjukkan terjadinya reaksi penghambatan. Kegagalan PCR untuk mengamplifikasi contoh tersebut mungkin disebabkan kandungan pati pada umbi kentang menghambat reaksi polimerisasi. Pada penelitian ini kepekaan pendeteksian menggunakan pasangan primer DNA Oli/Y2 yang spesifik terhadap *R. solanacearum* hanya sampai pengenceran  $10^2$  atau setaradengan  $10^3$  sel/ml.

### Pengelompokan *R. solanacearum* menggunakan teknik hibridisasi DNA

DNA dari 20 isolat *R. solanacearum* yang dilacak dengan DNA 5a67 umumnya berhibridisasi pada ukuran 7,2 Kb (Gambar 2). Berdasarkan kesamaan profil DNA-nya, 16 dari 20 isolat *R. solanacearum* yang diuji menghasilkan profil DNA yang sama, dengan presentase kesamaan sekitar 80% pada ukuran 7,2 kb dan 5,1 kb (Gambar 2 dan 3). Empat isolat lainnya yaitu Rs 9501, Rs9506, Rs9535 dan Rs9512 mempunyai pola berbeda. Berdasarkan pengelompokan secara *clustering*, yaitu pengelompokan yang didasarkan pada kesamaan profil DNA, maka isolat yang diuji dapat

dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok I termasuk isolat Rs9513, Rs9508, Rs9564, Rs9553, Rs9566, Rs9505, Rs9565, Rs9509, Rs9542, Rs9503, Rs9502, Rs9511, Rs9510, Rs9537, Rs9507, dan Rs9504; kelompok II terdiri atas isolat Rs9501 dan Rs9506, dan kelompok III juga dua isolat, Rs9535 dan Rs9512. Isolat asal *C. hirtus* (Rs9501, Rs9505) dan isolat Rs 9512 asal kacang tanah Cikeumeuh, Bogor, hanya mempunyai sedikit perbedaan dengan isolat kacang tanah lainnya (Rs 9535). Isolat Rs 9501 (*C. hirtus*) mempunyai pola yang sama dengan isolat Rs9506 (cabai). Hal ini menunjukkan bahwa isolat yang berasal dari inang yang sama dapat mempunyai keragaman genetik yang berbeda.

## PEMBAHASAN

### Penggunaan teknik PCR untuk mendeteksi *R. solanacearum*

Reaksi Polimerase Berantai (PCR) merupakan teknik molekuler yang sangat bermanfaat untuk mengamplifikasi fragmen DNA sejumlah kecil contoh DNA. Hasil penggandaan DNA melalui PCR dengan primer yang mempunyai ciri spesifik dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri dari jaringan tanaman secara langsung tanpa harus mengisolasi DNANYa terlebih dahulu. Waktu yang diperlukan untuk satu reaksi juga relatif cepat, hanya sekitar 5 jam, apabila dibandingkan dengan teknik molekuler lain dan teknik yang konvensional. Secara teoritis, teknik sangat peka, dapat digunakan untuk mendeteksi satu sel bakteri dalam 1 ml suspensi (Seal and Elphinstone, 1992), tetapi pada penelitian ini hanya dapat mendeteksi hingga  $10^3$  sel/ml. Dengan demikian teknik ini masih dapat dioptimalisasi kepekaannya.

Salah satu kendala penggunaan teknik PCR langsung dari suspensi tanaman ialah kegagalan reaksi yang diakibatkan oleh adanya

senyawa penghambat reaksi (inhibitor) (Seal, *et al.* 1992). Jenis senyawa penghambat tersebut diantaranya adalah senyawa fenolik. Hal ini pula yang mungkin menjadi salah satu penyebab terjadinya reaksi negatif pada contoh yang berasal dari ekstrak umbi kentang. Pada penelitian ini kemungkinan sebagian contoh tanaman tercemar tanah yang mengandung senyawa penghambat. Senyawa fenolik menghambat terjadinya reaksi polimerisasi DNA (Seal, *et al.* 1992). Dengan demikian, untuk lebih mengoptimalkan hasil pengujian PCR dari ekstrak tanaman harus dihindari keberadaan senyawa fenolik dalam ekstrak tanaman, misalnya dengan cara menghilangkan atau menetralkan senyawa tersebut.

Selain senyawa penghambat, beberapa faktor lain yang juga dapat mempengaruhi kepekaan dan hasil pengujian PCR ialah jenis buffer yang digunakan, merek dan kondisi thermocyclernya, serta program yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA yang meliputi jumlah putaran (siklus), suhu annealing, dan kandungan basa GC dari primer DNA yang digunakan (Seal, 1992). Pada penelitian ini sekuen primer yang digunakan Oli dan Y2 berasal dari pengembangan sekuen gen 16S rRNA yang fungsinya secara evolusi sangat terpelihara urutan nukleotidanya (*highly conserved*) untuk semua mikroorganisme yang tergolong prokariota (Seal *et al.* 1992; Wosse *etal.* 1987).

Berdasarkan hasil pengujian ini, maka teknik PCR dapat di sarankan sebagai suatu teknik yang peka dan cepat untuk mendeteksi bakteri *R. solanacearum* dari biji atau bagian tanaman lainnya, sehingga dapat dimanfaatkan oleh petugas karantina dan petugas sertifikasi benih dalam upaya pengujian kesehatan benih dan mencegah transportasi patogen dari suatu wilayah ke wilayah lain. Di samping itu, pendeteksian PCR juga sangat berguna dalam penelitian epidemiologi

untuk menentukan tingkat infeksi bakteri yang tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman. Pendeteksian *R. solanacearum* dari berbagai jaringan tanaman dengan PCR ini ternyata lebih cepat daripada menggunakan metode konvensional, karena mulai dari tahap persiapan contoh sampai pengujian PCR hanya memerlukan waktu kurang dari 5 jam. Dengan demikian pendeteksian dengan teknik PCR ini cukup efektif untuk menguji sampel tanaman dalam jumlah yang banyak.

### **Pengelompokan *R. solanacearum* menggunakan teknik hibridisasi DNA**

Hasil pengujian hibridisasi DNA *R. solanacearum* tidak menunjukkan polimorfisme yang banyak berbeda di antara isolat yang diuji. Hal ini mungkin disebabkan karena isolat yang diuji mempunyai asal usul tanaman inang (kacang tanah) dan lokasi yang sama serta tergolong ras dan biovar yang sama yaitu ras 1 biovar 3 (Machmud *et al.*, 1996). Pola DNA yang berbeda ditunjukkan oleh isolat *C. hirtus* (Rs 9501, 9505) juga pada isolat kacang tanah Rs 9512 dan Rs9535. Isolat Rs 9501 (*C. hirtus*) mempunyai pola yang sama dengan isolat Rs 9506 (cabai). Hal ini menunjukkan bahwa polimorfisme bukan disebabkan oleh jenis inang, melainkan karena perbedaan lokasi, sebagai contoh kedua isolat Rs 9501 dan Rs 9506 berasal dari lokasi yang sama yaitu Cigadung, Subang, atau kemungkinan karena terjadinya mutasi pada setiap strain pada kondisi *in vitro*. Isolat yang berasal dari inang yang sama dapat mempunyai keragaman genetik yang berbeda. Menurut Cook *et al.* (1989) yang telah mengidentifikasi polimorfisme isolat *R. solanacearum* dari berbagai lokasi di dunia dengan teknik RFLP menggunakan pelacak DNA yang diperoleh dari penanda gen virulensi (*hrp*), sttain bakteri ini mempunyai keragaman genetik antar strain yang tinggi dan umumnya berkorelasi

dengan asal usul isolat. Pada umumnya isolat asal Asia dan Australia (Australasia) termasuk ke dalam kelompok strain yang berbeda dengan kelompok strain *R. solanacearum* asal Amerika (Seal and Elphinstone, 1992).

Pola fragmen DNA yang dihasilkan dari hibridisasi dengan pelacak 5a67 dapat menunjukkan adanya keragaman genetik isolat *R. solanacearum*. Walaupun dua puluh isolat *R. solanacearum* yang diuji tergolong dalam Ras 1 Biovar 3 yang sama serta berasal dari inang yang relatif sama, yaitu kacang tanah atau gulma yang hidup di lahan kacang tanah, tetapi ciri-ciri profil DNA-nya berbeda, sehingga dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok. Hal ini juga didukung oleh hasil pengujian menggunakan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) yang menunjukkan bahwa profil genotipik *R. solanacearum* hanya berkorelasi dengan daerah asal isolat, tetapi tidak terhadap asal inangnya (Hanudin, 1993). Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dominansi isolat-isolat *R. solanacearum* dari lokasi dan inang yang berbeda dengan melibatkan jumlah isolat yang lebih banyak juga masih perlu dilakukan. Berkaitan dengan hal ini, maka saat ini sedang dilakukan penelitian untuk mengelompokkan isolat *R. Solanacearum* berdasarkan ekotipenya. Pendeteksian polimorfisme DNA dengan teknik PCR lain yang telah dilakukan saat ini yaitu menggunakan primer DNA yang berasal dari pengembangan produk RAPD (Suryadi dan Machmud, 1997). Menurut Gillings *et al.* (1993) Ras atau Biovar *R. solanacearum* dapat dideteksi dalam waktu kira-kira 2 jam, dengan menggunakan primer spesifik yang menyandi gen *pehA*. Apabila kedua teknik yang diuji ini dibandingkan, maka teknik PCR dapat menghasilkan pola DNA dalam waktu yang lebih cepat (5 jam) dibanding dengan teknik hibridisasi DNA yang memerlukan waktu 3 - 4 hari.

## KESIMPULAN

Teknik PCR dengan menggunakan pasangan primer DNA (Oli/Y2) yang bersifat spesifik spesies untuk bakteri *R. solanacearum* dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri *R. solanacearum* baik dari sediaan mumi DNA, suspensi biakan murni bakteri, maupun ekstrak jaringan tanaman kacang tanah yang terinfeksi dengan waktu sekitar 5 jam. Kepekaan teknik PCR untuk mendeteksi *R. solanacearum* dari ekstrak tanaman mencapai tingkat terendah  $10^3$  sel/ml.

Teknik hibridisasi DNA menggunakan pelacak DNA 5a67 yang dibuat dari 16S-RNA *R. solanacearum* dapat digunakan untuk mengelompokkan 20 isolat *R. solanacearum* Ras 1 Biovar 3 menjadi tiga kelompok berdasarkan perbedaan profil DNA-nya.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Susan Seal (NRI, UK) yang telah menyediakan pelacak DNA 5a67 untuk hibridisasi DNA dan pasangan primer Oli/Y2 untuk pengujian PCR.

Tabel 1. Isolat *Rahtonia solanacearum* asal kacang tanah yang digunakan untuk pengelompokan strain berdasarkan pengujian menggunakan teknik hibridisasi DNA

No.	Kode Isolat	Asal Isolat		Ras/Biovar
		Tanaman Inang	Lokasi	
1	Rs9501	<i>Croton hirtus</i>	Cigadung, Subang, Jawa Barat	1/3
2	Rs9502	Kacang tanah	Kalijati, Subang, Jawa Barat	1/3
3	Rs9503	Kacang tanah	Kalijati, Subang, Jawa Barat	1/3
4	Rs9504	Kacang tanah	Kalijati, Subang, Jawa Barat	1/3
5	Rs9505	Kacang tanah	Cigadung, Subang, Jawa Barat	1/3
6	Rs9506	Cabai	Cigadung, Subang, Jawa Barat	1/3
7	Rs9507	Kacang tanah	Cigadung, Subang, Jawa Barat	1/3
8	Rs9508	Kacang tanah	Cigadung, Subang, Jawa Barat	1/3
9	Rs9509	Kacang tanah	Lingsar, Lombok, NTB	1/3
10	Rs9510	Kacang tanah	Lingsar, Lombok, NTB	1/3
11	Rs9511	Kacang tanah	Tegalsweta, Lombok, NTB	1/3
12	Rs9512	Kacang tanah	Labuanapi, Lombok, NTB	1/3
13	Rs9513	Kacang tanah	Kalijati, Subang, Jawa Barat	1/3
14	Rs9535	Kacang tanah	Kalijati, Subang, Jawa Barat	1/3
15	Rs9537	Kacang tanah	Bogor, Jawa Barat	1/3
16	Rs9542	Kacang tanah	Cigadung, Subang, Jawa Barat	1/3
17	Rs9553	Kacang tunggak	Cigadung, Subang, Jawa Barat	1/3
18	Rs9564	Kacang tanah	Cigadung, Subang, Jawa Barat	1/3
19	Rs9565	Kacang tanah	Kebumen, Jawa Tengah	1/3
20	Rs9566	Kacang tanah	Petanahan, Kebumen, Jawa Tengah	1/3

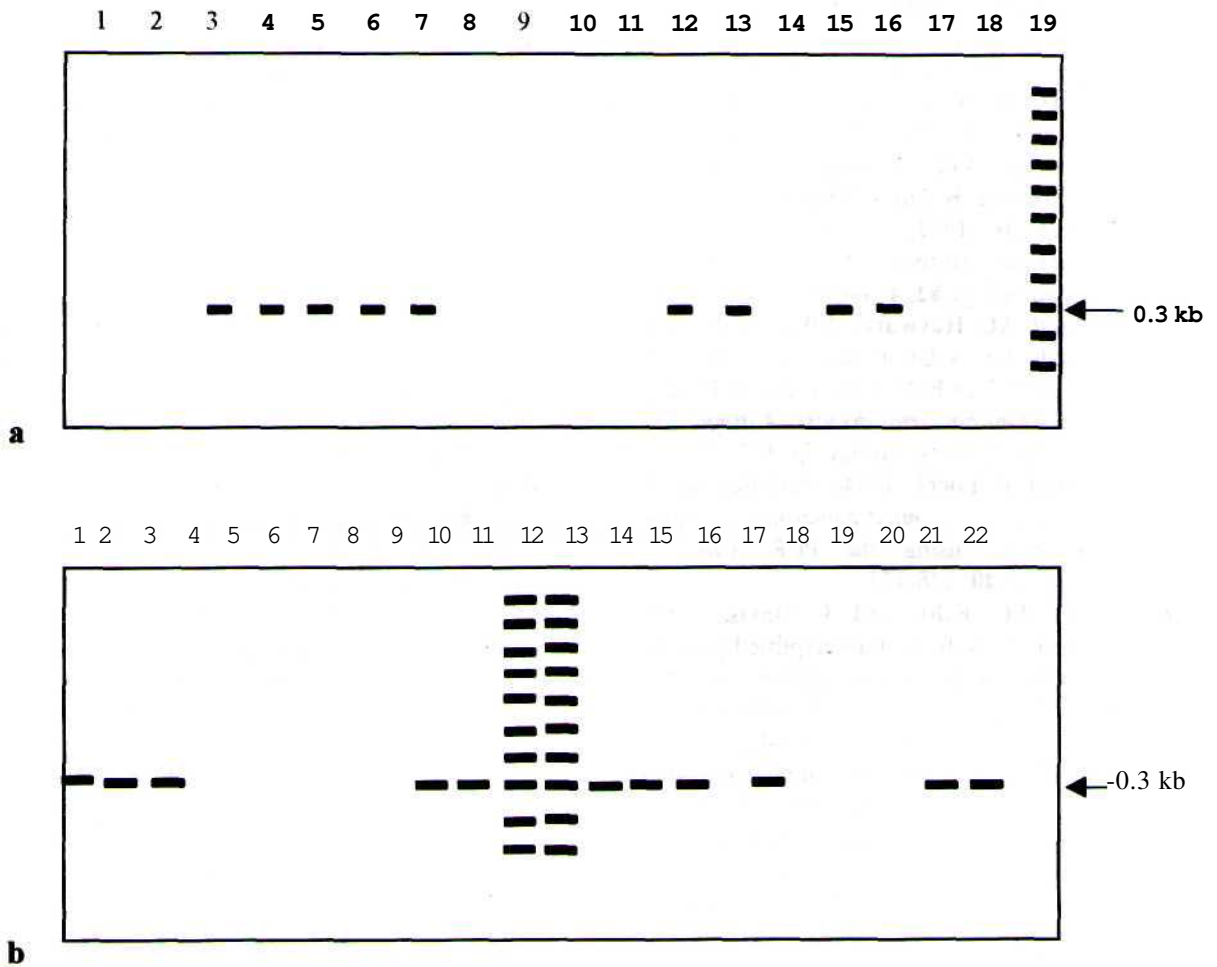
## DAFTAR PUSTAKA

- Buddenhagen TW, L Sequeira and A Kelman. 1962. Designations of races in *P. solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Cook D, EE Barlow and L Sequeira. 1989. Genetic diversity of *P. solanacearum*:

detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2 (3), 113-121.

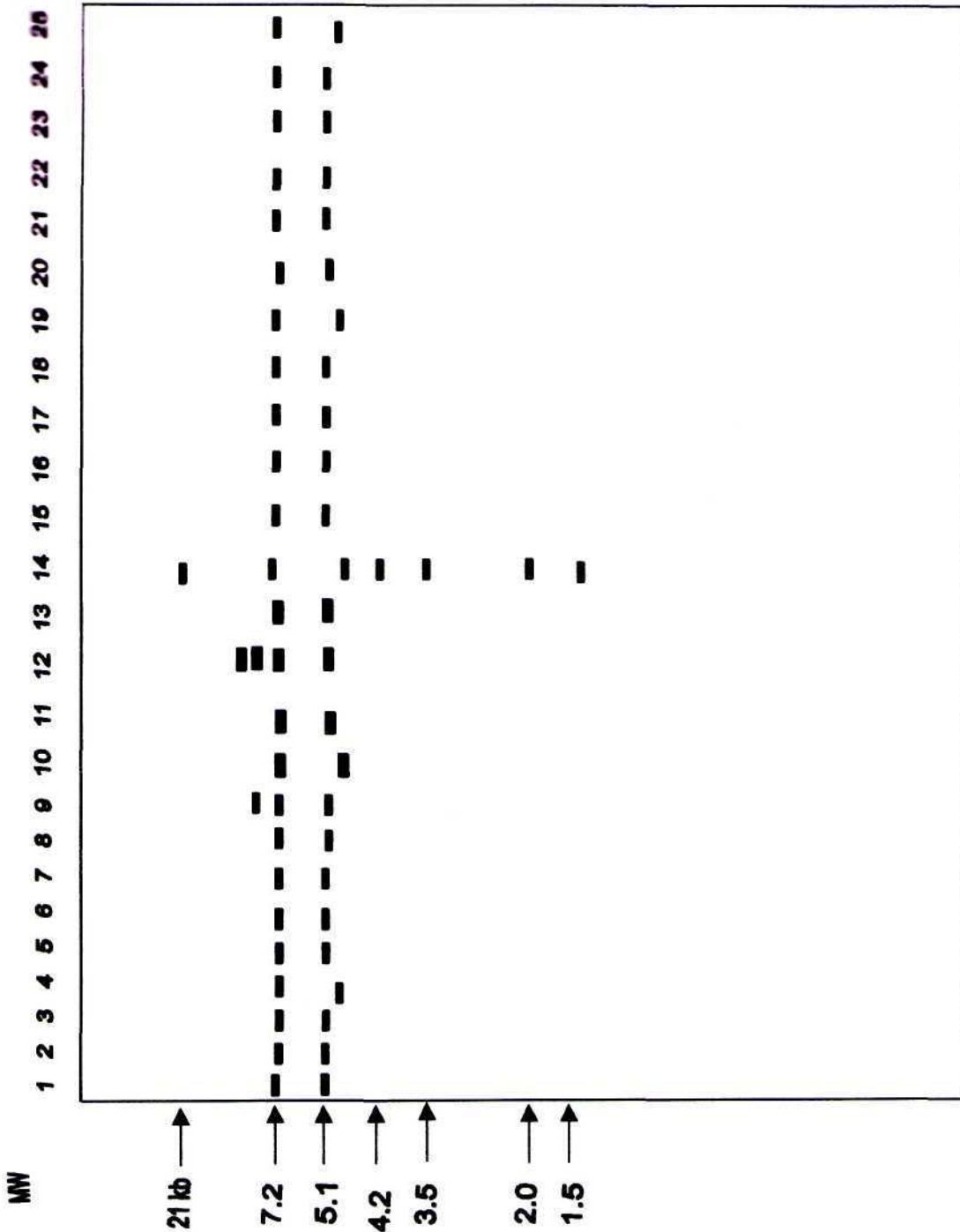


- Cook D, EE Barlow and L Sequeira. 1991.** DNA probes as tools for the study of host-pathogen evolution: the example of *P. solanacearum*, pp. 103-108. In: H. Hanecke and D.P.S. Verma (eds.): *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. Vol 1. Kluwer Acad. Publ.
- Dong LC, CW Sun, K Thies, DS Luthe, and CH Graves, Jr. 1992.** Use of PCR to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathology* 82, 434-439.
- Fahy FC and AC Hayward. 1983.** Media and methods for isolation and diagnostic test, pp. 337-377. In F. C. Fahy and G. J. Persley (eds.) *Plant bacterial disease. A diagnostic guide*. Acad. Press, Sydney, p: 337-377.
- Firrao G and R Locci. 1994.** Identification of *Clavibacter michiganensis* subs. *sepedonicus* using the PCR. *Can. J. Microbiol.* 40, 148-151.
- Gillings M, FC Fahy and C Davis. 1993.** Restriction analysis of an amplified pg gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *P. solanacearum*. *Letters in Appl. Microbiol.* 17, 44-48.
- Hanudin. 1993.** Differentiation among biovar 3 isolates of *P. solanacearum* E.F. Smith using random amplified polymorphic DNA. ACIAR Report 1993, Canberra.
- Hayward AC. 1991.** Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *P. solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 65 - 87.
- Martin R, C Hover, S Grimme, C Grogan, J Holtke and C Kessler. 1990.** A highly sensitive, non-radioactive DNA labelling and detection system. *Biotechniques* 9 (6), 762 - 768.
- Miller SA and RR Martin. 1988.** Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 409 - 432.
- Samadpour M, SL Moseley and S Lory. 1988.** Biotinylated DNA probes for exotoxin A and pilin genes in the differentiation of *P. aeruginosa* strains. *J. Clin. Microbiol.* 26 (1), 2319-2323.
- Sambrook J, FF Fritsch and T Maniatis. 1989.** Molecular cloning, A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. Vol 1.
- Seal SE and JG Elphintone. 1992.** 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 agents, P. solanacearum*. CAB-International, Walingford, UK.
- Seal SE, LA Jackson, and MJ Daniels. 1992.** Isolation of a *P. solanacearum* specific DNA probe by subtractive hybridization and construction of species specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 58,3751-3758
- Skoglund LG, SE Seal, JG Elphinstone and DE Berrios. 1993.** Study of latent infection of potato tubers by *P. solanacearum* in Burundi. ACIAR Proceedings No.45, Canberra, Australia, p: 106-110.
- Southern J. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Suryadi Y dan M Machmud. 1997.** Adopsi teknik PCR untuk pendeteksian *P. solanacearum* dan pengujian spesifisitas primer DNA. *Proc. Kongres XIV dan Seminar Nasional PFI Vol II*, Palembang, 27-29 Oktober 1997. Hal. 74-80
- Venkitesh SR, RW Briddon and PG Markham. 1993.** Detection of rice tungro bacilliform virus (RTBV) in asymptomatic leaves of tungro infected rice by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Int. Rice Res. Newsl.* 18 (3), 13-14.
- Woese CR. 1987.** Detailed analysis of the higher-order structure of the 16S-like ribosomal nucleic acids *Microbiol.Rev.* 547, 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, 1969) comb.nov. *Microbiol. Immunol.* 39 (11), 897-904.

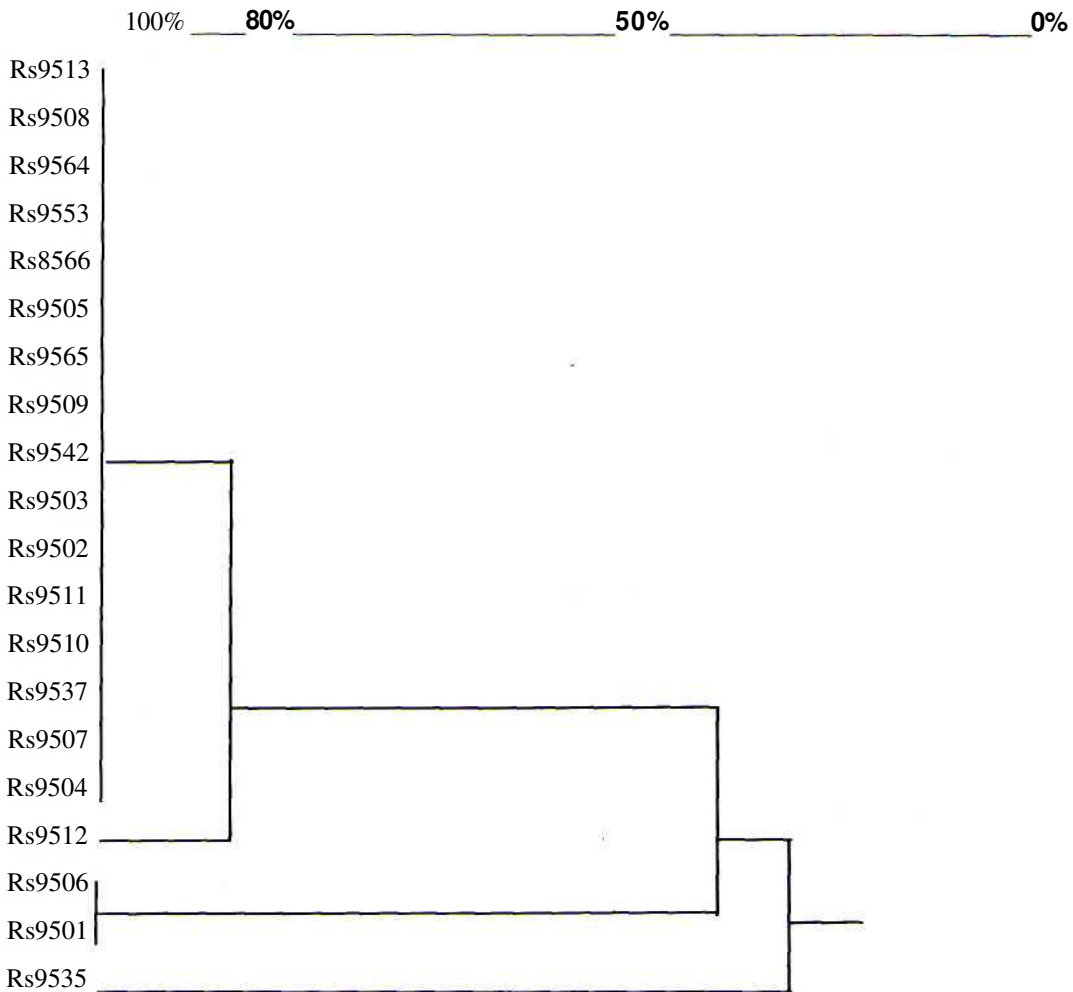


Gambar 1. Skema hasil elektroforesis produk PCR dari DNA *Ralstonia solanacearum* yang berasal dari berbagai sumber.

- a. Dari hasil pengujian I. Nomor kolom menunjukkan asal contoh yang diuji. Kolom: 1 = umbi kentang (-); 2 = umbi kentang (?); 3,4, 5, 6, 7 = batang kacang tanah (+); 8 = biji kacang tanah sehat (-); 9 = kulit biji kacang tanah (?); 10 = kulit biji kacang tanah terinfeksi (?); 11 = kulit biji kacang tanah (-); 12 = DNA *R.solanacearum* asal kacang tanah Bogor (+); 13 = DNA *R. solanacearum* kacang tanah Subang(+); 14 = air steril/kontrol negatif (-); 15 dan 16= DNA *R.solanacearum* (kontrol positif) (+); 17 dan 18 = air steril (kontrol negatif) (-), dan; 19 = berat molekul standar (100 bp). Tanda - = reaksi PCR negatif; (?) = reaksi inhibitor, **dan** (+) = reaksi PCR positif.
- b. Dari Pengujian II. Nomor kolom menunjukkan asal contoh yang diuji. Kolom: 1, 13 = batang kacang tanah (1cm) var. Pelanduk (+, +); 2, 14 = batang kacang tanah (1cm) var. Gajah (+, +); 3, 15 = batang kacang tanah (3 cm) cv. Pelanduk (+, +); 4, 16 = batang kacang tanah (1cm) var. Gajah (?); 5, 17 = akar kacang tanah var. Pelanduk (-/+); 6, 18 = daun kacang tanah var. Pelanduk (?); 7, 8, 19, 20 = air steril (kontrol negatif) (-); 9, 10, 21, 22 = DNA *R.solanacearum* (kontrol positif) (+, +), dan 11,12 = berat molekul standar 100 bp.



Gambar 2. Skema hasil pendeteksian molekuler hibridisasi DNA isolat-isolat *Ralstonia solanacearum* dengan pelacak DNA 5a67. Nomor kolom menunjukkan isolat yang diuji: 1=Rs9513; 2 = Rs 9506; 3 = Rs 9564; 4 = Rs 9506; 5 = Rs 9564; 6 = Rs 9566; 7 = Rs 9505; 8 = Rs 9565; 9 = Rs 9512; 10 = Rs 9501; 11 = Rs 9509; 12 = Rs 9535; 13 = Rs 9509; 14 = Rs DNA marker; 15 = Rs 9542; 16 = Rs9503; 17 = Rs9502; 18 = Rs9511; 19 = Rs 9501; 20 = Rs 9510; 21 = Rs 9537; 22 = Rs 9505; 23 = Rs9507; 24 = Rs 9504; dan 25 = Rs 9506. Kb = kilo base pair fpasangan kilo basa).



Gambar3. Dendrogram kesamaan 20 isolat isolat *R. solanacearum* Ras 1 Biovar 3 berdasarkan hasil hibridisasi DNA-nya menggunakan pelacak DNA 5a67. Asal isolat: Isolat Rs9513 = kacang tanah Kalijati, Subang; Rs9508 = kacang tanah, Manyeti, Subang; Rs9564 = kacang tanah Manyeti, Subang; Rs9553 = kacang tanah Cigadung, Subang; Rs9509 = kacang tanah Kalijati,Subang; Rs9503 = kacang tanah Manyeti, Subang; Rs9502 = kacang tanah Manyeti, Subang; Rs9510 = kacang tanah kalijati, Subang; Rs9507 = kacang tanah Manyeti,Subang; Rs9504 = kacang tanah Manyeti, Subang; Rs9506 = cabai Cigadung, Subang; Rs9565 = kacang tunggak Cigadung, Subang; Rs9566 = kacang tunggak Cigadung, Subang; Rs 9501 *C. hirtus* Cigadung, Subang; Rs 9501 = *C. hirtus* Cigadung, Subang; Rs 9512 = kacang tanah Cikeumeuh, Bogor; Rs 9535 = kacang tanah Muara, Bogor; Rs 9542 = kacang tanah Cikeumeuh Bogor; Rs 9511 = kacang tanah Cikeumeuh, Bogor, dan Rs 9537 = kacang tanah Muara, Bogor.