

**KAJIAN KERAGAMAN GENETIK ISOLAT *RALSTONIA SOLANACEARUM*
BIOVAR 3 MENGGUNAKAN PENANDA REP-PCR**

***STUDY ON GENETIC VARIATION OF RALSTONIA SOLANACEARUM
ISOLATES BIOVAR 3 USING REP-PCR MARKER***

Yadi Suryadi
RPI-Balitbio-Bogor

ABSTRACT

Study on DNA fingerprinting of genomic DNA of Australian Ralstonia solanacearum biovar 3 was characterized by a DNA BOX primer that correspond with repetitive sequence using PCR amplification (rep-PCR). Based on rep-PCR DNA profiles different band mobility were observed among Australian biovar 3. Most of isolates have shown common DNA amplification product at 600 bp. Cluster analysis to the DNA profiles showed two different DNA banding patterns that correlated with geographical origins of the isolates. Subgroup A correspond well with isolates from South Queensland/New South Wales, whilst subgroup B correspond with isolates from North Queensland origin.

Key words: *Ralstonia solanacearum, rep-PCR, marker*

INTISARI

Kajian terhadap sidik jari DNA genomik *Ralstonia solanacearum* asal biovar 3 Australia telah dilakukan dengan DNA penanda BOX yang berasosiasi dengan sekuen berulang (*repetitive*) menggunakan amplifikasi PCR (*rep-PCR*). Berdasarkan profil DNA *rep-PCR*, dapat dilihat adanya pita DNA yang berlainan di antara isolat biovar 3 Australia yang diuji. Kebanyakan isolat mempunyai ciri DNA berukuran 600 bp. Analisis pengelompokan terhadap profil DNA memperlihatkan adanya 2 tipe DNA yang berbeda, yang berhubungan dengan asal isolat. Subkelompok A berhubungan dengan isolat yang diperoleh dari daerah Queensland Selatan/New South Wales, sedangkan subkelompok B berhubungan dengan isolat dari daerah Queensland Utara.

Kata kunci: *Ralstonia solanacearum, rep-PCR, penanda*

PENGANTAR

Bakteri layu (*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi *et al.*, 1995) dikenal mempunyai sebaran geografi dan keragaman strain yang luas, sehingga patogen ini masih sulit dikendalikan. Sejauh ini isolat *R. solanacearum* dibedakan menjadi kelompok biovar (Hayward, 1991) dan kelompok ras (Buddenhagen & Kelman, 1964), yang masing-masing dibedakan berdasarkan ciri-ciri fenotipik dan kisaran inangnya. Oleh karena keragaman strainnya, maka usaha identifikasi yang akurat masih diperlukan untuk membedakan kelompok isolat ke dalam pengelompokan yang ber-

manfaat baik bagi para fitopatolog maupun ahli pemulia tanaman (Machmud, 1998).

Studi tentang karakterisasi isolat *R. solanacearum* telah dilakukan berdasarkan pendekatan asam nukleat seperti analisis *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Cook *et al.*, 1989; Seal *et al.*, 1992). Analisis tersebut memerlukan DNA penanda (*probe*) yang berasal dari variasi sekuen genom bakteri yang homolog. Cook *et al.* (1989) menggunakan analisis RFLP dengan DNA pelacak yang berasal dari sekuen gen yang menyandi respon terhadap hipersensitifitas dan patogenisitas (*hrp*), sedangkan Seal *et al.* (1992) menggunakan sekuen gen 16S

rRNA. Kedua analisis tersebut dipergunakan untuk membedakan isolat *R. solanacearum* masih memerlukan waktu panjang (2-3 hari), di samping menghasilkan beberapa kelompok strain RFLP yang cukup kompleks.

Selain hal tersebut di atas, analisis DNA lainnya yaitu dengan PCR menggunakan penanda DNA primer yang spesifik untuk dapat mengkarakterisasi genom *R. solanacearum* lebih cepat dan peka dibandingkan analisis RFLP (Opina *et al.*, 1997). DNA primer yang digunakan dalam melacak keragaman isolat *R. solanacearum* telah dilaporkan, di antaranya menggunakan sekuen gen ribosomal RNA (16 S dan 23 S) (Seal *et al.*, 1992; Suryadi *et al.*, 1994). Hasil penelitian Seal *et al.* (1992) pada sekuen gen 16S rRNA menunjukkan bahwa strain *R. solanacearum* umumnya mempunyai fragmen DNA berukuran 300-400 bp (*base pasir*, pasang basa). Pencarian sekuen gen lainnya untuk melacak isolat *R. solanacearum* asal lapangan secara cepat saat ini sangat diperlukan, terutama dalam penelitian epidemiologi. Akhir-akhir ini, dilaporkan bahwa DNA primer yang berasal dari sekuen DNA yang lebih terjaga urutan basanya (*conserve*) yaitu sekuen ERIC, BOX dan REP pada DNA berulang (*repetitive*) dapat menghasilkan polimorfisme DNA lebih cepat, sederhana dan relatif lebih mudah untuk ditelaah (Versalovic, 1991). Pada mulanya sekuen genom *repetitive* ditentukan berdasarkan konsensus sekuen bakteri *Salmonella typhimurium* yang masing-masing mempunyai urutan sekuen ERIC (*entero repetitive intergenic concensus*, 124-127 bp), sekuen BOX (154 bp), dan sekuen REP (*repetitive extragenic palindromic*, 35-40 bp). Fungsi dari ketiga sekuen tersebut masih belum jelas akan tetapi selalu ditemukan pada semua genom prokariot, termasuk *R. solanacearum* (Schneider & de Bruijn, 1996; de Bruijn, 1992; Ito *et al.*, 1996).

Kajian keragaman isolat *R. solanacearum* menggunakan rep-PCR dan

penanda ERIC/REP antara lain telah dilaporkan di Jepang (Ito *et al.*, 1996) dan di Hindia Barat Perancis (Frey *et al.*, 1996).

Pada makalah ini dilaporkan penggunaan sekuen BOX sebagai penanda pada rep-PCR untuk mempelajari strain-strain Australia biovar 3 dan mengelompokkannya ke dalam subkelompok strain *R. solanacearum*.

BAHAN DAN METODE

Perbanyak isolat dan ekstraksi DNA *R. solanacearum*. Sebanyak 47 isolat asal biovar 3 dari beberapa lokasi di Australia dan daerah lainnya yang diuji pada penelitian ini dicantumkan pada Tabel 1. *R. solanacearum* Australia yang dianalisis semuanya 23 isolat berasal dari lokasi di North Queensland dan South Queensland/New South Wales. Isolat tersebut merupakan koleksi Dr. A.C. Hayward (Dept. of Microbiology, University of Queensland, Australia). Semua isolat yang berasal dari kultur stok air murni ditumbuhkan pada media SPA selama 72 jam inkubasi, pada suhu 28°C (Hayward, 1964). Koloni bakteri 50 mg dipanen menggunakan *loop* dan diresuspensi dengan bufer TE pH 8. Bakteri diekstraksi menurut protokol Sambrook *et al.* (1989), menggunakan pelarut fenol kloroform dan bufer pelisis sel sodium dodekil sulfat (SDS). Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi 10.000 rpm dipindahkan ke dalam tabung eppendorf baru. Ke dalam tabung tersebut dimasukkan 50 µl larutan enzim RNase yang diinkubasikan pada suhu 37°C selama 45 menit. Reaktan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, dan supernatannya diendapkan dengan larutan sodium asetat 3M dan isopropanol dingin. Presipitat yang mengandung DNA dikait menggunakan pipet Pasteur steril dan dibilas dengan etanol 70% dan dikering anginkan. DNA yang diperoleh kemudian diresuspensi dalam 50 µl air steril.

Tabel 1. Isolat *R. solanacearum* biovar 3 yang diuji rep-PCR dengan penanda BOX

No isolat	Asal inang	Asal lokasi	Biovar
125	tanaman hias	Mauritius	3
BR1, BR4	terung	Malaysia	3
Broc 1	brokoli	Malaysia	3
GN 1, GN 3	kacang tanah	Malaysia	3
R 846	jahe	Indonesia	3
R 849	<i>Portulaca oleraceae</i>	Indonesia	3
110, Ps 3348	kentang	Mauritius	3
TPF	tomat	Mauritius	3
MG 4	Marigold	Malaysia	3
R 205	babadotan	Malaysia	3
R 206	Ipomoea	Malaysia	3
R 222	cengkeh	Indonesia	3
R 290	zaitun	China	3
R 314	kentang	China	3
R 321	murbei	Kamerun	3
R 781	kentang	Indonesia	3
R 791	tomat	Indonesia	3
R 809	jahe merah	Indonesia	3
JEOI	kentang	Inggris	3
ACH 1066	Heliconia	Qld, Australia	3
ACH 506	kentang	Qld, Australia	3
ACH 001, ACH 574	tomat	Brisbane, Qld	3
ACH 002	tomat	Buderim, Qld	3
ACH 006	<i>Xanthium pungens</i>	Perwillowen, Qld	3
ACH0171	terung	Nambour, Qld	3
ACH170A	tembakau	Ingham, Qld	3
ACH 12B	turnip weed	Perwillowen, Qld	3
ACH 131A	kentang	East barron, Qld	3
ACH 190	<i>Xanthium pungens</i>	Nambour, Qld	3
ACH 333	tomat liar	Perwillowen, Qld	3
ACH 671	paprika	Redland bay, Qld	3
ACH 234	<i>Pultenea vilosa</i>	Nambour, Qld	3
ACH 369A	tomat	Banora Pt, Qld	3
ACH 1017	<i>Solanum nigrum</i>	Maroota, NSW	3
ACH 1023, ACH 1024	<i>Strelitzia reginae</i>	Somersby, NSW	3
ACH 1082	kentang	Brisbane, Qld	3
ACH 1063	palma Alexandra	Clifton beach, Qld	3
ACH 1064, ACH 1065	Heliconia	Cairns, Qld	3
ACH 1069	Heliconia	Redlynch, Qld	3
ACH 1067	Heliconia	Babinda, Qld	3

Keterangan: Qld=Queensland; NSW= New South Wales

Kondisi rep-PCR dan agarose elektroforesis. DNA sekuen BOX A1R (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3') disintesis di Pusat Biologi Molekuler dan Bioteknologi University of Queensland. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR *thermal cycler* (PTC 100, MJ Res. Inc.) menggunakan reaksi total volume 25 µl dengan komposisi

sebagai berikut: 10 x bufer PCR, 1,25 mM dNTP, 40 pmole DNA BOX, 25 mM MgCl₂, 0,5 U/µl *Taq polymerase* dan 10 ng DNA. Ke dalam tabung PCR ditambahkan minyak mineral (Sigma). Amplifikasi rep-PCR lainnya dilakukan dengan menggunakan sel bakteri utuh (*whole cells*) sebagai *DNA template*.

Program suhu amplifikasi rep-PCR dilakukan sesuai protokol de Bruijn (1992) yaitu: suhu denaturasi awal 94°C selama 7 menit, diikuti 30 daur putaran denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 52°C selama 1 menit, ekstensi 65°C selama 7 menit dan suhu ekstensi akhir 65°C selama 16 menit. DNA produk PCR yang mencirikan profil rep-PCR dipisahkan menggunakan agarose gel 2% dengan cara elektroforesis horizontal selama 30 menit pada tegangan arus 120 V. Gel dicuci dengan larutan ethidium bromida (0,5 µg/ml) dan dicuci kembali dengan air steril selama 20 menit sebelum dilihat di bawah sinar UV menggunakan alat Transiluminator. Fotografi dilakukan menggunakan kamera Polaroid. Profil DNA diamati berdasarkan data biner (ada tidaknya fragmen DNA pada gel) dan data dianalisis ke dalam sistem pengelompokan menggunakan program NTSYS (Fegan, *tidak dipublikasikan*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat *R. solanacearum* yang dianalisis dengan penanda BOX primer menggunakan amplifikasi rep-PCR menghasilkan pola fragmen DNA yang unik mencirikan polimorfisme DNA antarisolat *R. solanacearum* biovar 3. Reaksi rep-PCR diulang beberapa kali untuk melihat

reproduksibilitasnya kemudian data yang diperoleh dianalisis berdasarkan ada tidaknya fragmen DNA pada masing-masing strain *R. solanacearum* yang diuji.

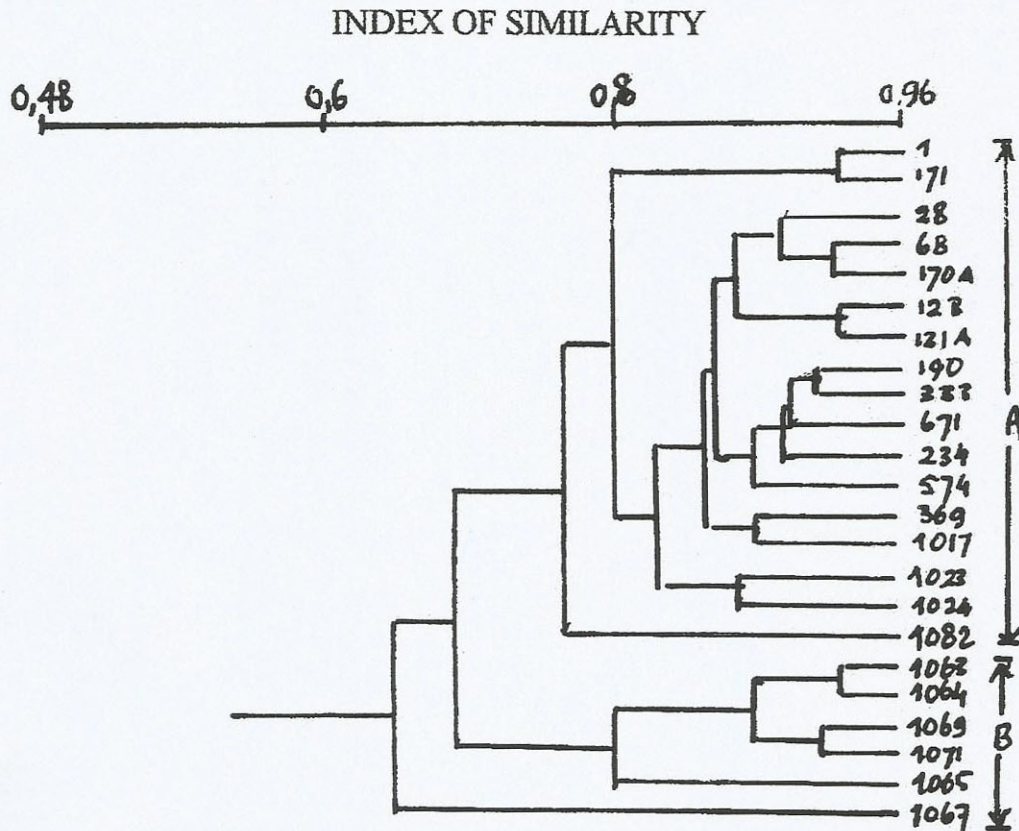
Pada umumnya sidik jari genom *R. solanacearum* biovar 3 menghasilkan fragmen DNA yang kuat pada ukuran sekitar 600 bp. Hal ini mungkin merupakan fragmen umum yang spesifik untuk biovar 3. Pola rep-PCR menghasilkan total fragmen DNA berkisar antara 7-8 fragmen DNA (Gambar 1).

Berdasarkan profil rep-PCR, pada isolat Australia biovar 3 dapat dilihat sedikitnya terdapat dua subkelompok (*subgroup*) strain *R. solanacearum* yaitu subkelompok A mewakili isolat-isolat yang diperoleh dari South Queensland/New South Wales (ACH 001, 0171, 002, 006, 0170, 012, 131, 190, 333, 671, 234, 574, 369, 1017, 1023, 1024, 1082) dan subkelompok B mewakili isolat-isolat yang berasal dari North Queensland (ACH 1063, 1064, 1069, 1071, 1065, 1067) (Gambar 2). Kajian pendahuluan terhadap isolat yang termasuk ke dalam biovar 3 lainnya asal Asia (Malaysia, Filipina dan Taiwan) menunjukkan profil rep-PCR yang mirip satu dengan lainnya, yaitu masing-masing mempunyai fragmen berukuran 600 bp, walaupun polimorfisme DNA sedikit berbeda pada isolat-isolat yang berasal dari Indonesia (Suryadi, *tidak dipublikasikan*).



Gambar 1. Profil DNA rep-PCR menggunakan penanda BOX A1 R terhadap biovar 3, *R. solanacearum*.

Keterangan: No kolom 1=21=30= DNA marker, 2=R 205, 3=R 206, 4=110, 5=125, 6=Br 1, 7=Br 4, 8=Broc 1, 9=GN 1, 10=GN 3, 11=TPF, 12, MG 4, 13= JEO 1, 14= ACH 0171, 15= ACH 781, 16= R 809, 17= R 849, 18= R 314, 19= R 290, 20= R 321, 22= R 809, 23= R 222, 24= R 791, 25= R 846, 26= Ps 3348, 27= ACH 1066, 28= ACH 0506, 29= ACH 0171.



Gambar 2. Analisis dendrogram terhadap pola rep-PCR isolat Australia biovar 3 menggunakan penanda BOX A1R.

Dari profil rep-PCR yang diperoleh, dapat ditunjukkan bahwa analisis menggunakan penanda BOX primer dapat membedakan di antara isolat biovar 3 ke dalam subkelompok yang berbeda seperti ditunjukkan pada Gambar 2. Menurut Van Damme *et al.* (1993) pola sidik jari DNA yang diperoleh dari hasil analisis rep-PCR mempunyai kebaikan yaitu lebih cepat dan hanya dibutuhkan sedikit DNA untuk amplifikasinya, dibandingkan dengan metode *typing* DNA lainnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat Australia biovar 3 yang dianalisis dengan rep-PCR menghasilkan 2 subkelompok strain dan hal ini mendukung hasil penelitian lainnya menggunakan penanda RAPD, yang membuktikan bahwa

isolat *R. solanacearum* Australia biovar 3 dapat pula dibedakan berdasarkan geografinya dan tidak berkorelasi dengan asal tanaman inangnya (Maghirang, *tidak dipublikasikan*). Isolat ACH 0171 asal terung mempunyai profil rep-PCR berbeda dengan isolat ACH 1017 yang juga diisolasi dari terung. Hal ini berarti bahwa terdapat keragaman genetik yang berbeda di antara strain yang berasal dari inang yang sama. Pada penelitian terdahulu Suryadi *et al.*, (*tidak dipublikasikan*) yang menggunakan hibridisasi DNA Southern melaporkan bahwa isolat yang berasal dari kacang tanah kadang-kadang mempunyai profil DNA yang sama dengan isolat asal cabai, sehingga usaha karakterisasi DNA untuk membedakan strain masih memiliki

kendala dalam mengelompokkan strain ke dalam kelompok genotipiknya. Namun hasil pola sidik jari DNA yang diperoleh dengan cara rep-PCR sangat bermanfaat dalam usaha mengkarakterisasi strain lebih cepat dibanding metode lainnya seperti uji serologi, dan patogenisitas. Di samping itu hasil penelitian Louws *et al.* (1995) pada bakteri *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* menyatakan bahwa terdapat korelasi antara hasil genotipik rep-PCR dengan ciri-ciri fenotipik bakteri tersebut.

Dari hasil penelitian ini dapat ditunjukkan bahwa profil rep-PCR lebih efektif, dan hasil amplifikasi juga dapat diperoleh langsung dari *DNA template* yang berasal dari sel utuh bakteri. Hal ini merupakan keuntungan karena dapat mengurangi tahapan pemurnian DNA, sehingga diharapkan teknik tersebut dapat dilakukan secara rutin untuk mengkarakterisasi lebih lanjut pola sidik jari DNA *R. solanacearum*.

KESIMPULAN

Hasil penelitian karakterisasi isolat *R. solanacearum* Australia biovar 3 menggunakan rep-PCR menghasilkan sejumlah fragmen DNA yang spesifik, dan mempunyai ciri fragmen yang kuat pada ukuran 600 bp. Pola rep-PCR yang diperoleh menghasilkan 2 tipe subkelompok strain biovar 3 (subkelompok A dan B) yang berkorelasi dengan daerah asal isolat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh proyek ACIAR PN 9452. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. M. Fegan yang telah membimbing dalam penelitian serta Dr. M. Machmud atas koreksi pada penulisan makalah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Buddenhagen, I.W & A. Kelman. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *P. solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2:203-230.
- Cook, D., E. Barlow, & L. Sequeira. 1989. Genetics diversity of *P. solanacearum* detection of RFLP with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2:203-230.
- deBruijn, F.J. 1992. Use of rep (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the PCR to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(7):2180-2187.
- Frey, P., J. Smith., L. Albar., P. Prior., G.C Saddler., D. T. Demery, & A. Trigalet. 1996. Bacteriocyn typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* race 1 of the French West Indies and correlation with genomic variation of the pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:473-479.
- Hayward A.C. 1964. Characteristics of *P. solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27:265-277.
- Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65-87.
- Ito, S., T. Fujii., Y. Shijima S. Tanaka., M. Kanaya-Iwaki., S. Yoshiwara & F. Kishi . 1996. Genomic diversity of field isolates of *B. solanacearum* in Japan. *J. Phytopathol.* 144:504-505.
- Louws, F.J., D.W Fulbright, C.T Stephens, & F.J. deBruijn. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85(5):528-536.
- Machmud, M. 1998. Menuju kesamaan persepsi terhadap taksonomi bakteri *P. solanacearum* (Smith, 1896) Smith 1914. *Bull. Agrobio.* 2 (1):16-21.

- 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, & J.N Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *B. solanacearum* (formerly *P. solanacearum*). *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5:19-30.
- Sambrook, J., E.F Fritsch, & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York,
- Schneider, M & F.J de Bruijn .1996. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of Rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:163-174.
- Seal, S., L. Jackson, & M.J. Daniels. 1992. Development of molecular diagnostic technique for detection of *P. solanacearum* and identification of sub groups within this species In: *Bacterial wilt* (Hartman, G.L and A.C Hayward (eds). ACIAR Proc. no 45, Canberra, Australia.
- Suryadi, Y., M.Fegan, & A.C Hayward. 1994. Penggunaan pelacak 16S rDNA untuk membedakan biovar *P. solanacearum*. *Risalah Hasil Penel. Tan. Pangan.* 1:42-51.
- Van Damme, P., B.A.J, Gissendorf., A. Van Belkum, D. Pierrad., S Lauwers., K. Kersters., J.P Butzler., H Goosens & W.G.V Quint. 1993. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acrobacter butzleri* by PCR-mediated DNA fingerprinting. *J. Clinic. Microbiol.* 31(12):3317-3319.
- Versalovic, J., T. Koeth., & J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19:6823-6831.
- Yabuuchi, E., Y. Kosako., I. Yano., H. Hotta & N. Nishiuchi. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an alacaligenes 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. *J. Microbiol. Immunol.* 39(11):897-904.