

**IDENTIFIKASI GALUR *Ralstonia solanacearum*  
DENGAN HIBRIDISASI SLOT BLOT DNA  
[Identification of Bacterial Strain of *Ralstonia solanacearum*  
Using DNA Slot Blot Hybridization]**

**Y Suryadi**

Staf Peneliti RPI Balitbio Bogor  
Jl Tentara Pelajar 3A Bogor 16111  
Email: yshid@yahoo.co.uk

**ABSTRACT**

*R. solanacearum* (Rs), the causal agent of bacterial wilt is one of the most destructive pathogen in the tropical and sub tropical areas that affected various economic crops. Since the pathogen is very diverse, it is necessary to identify the variation of Rs isolates. The Polymerase Chain Reaction (PCR) was used in this study to amplify 16S rRNA gene. Two DNA primer pairs namely pr#a and pr#b were used as probe to identify thirtyfour strains of Rs representing different biovars isolated from various host. The DNA probes were labelled using digoxigenin and detected by DNA slot blot hybridization. Result showed that the DNA probes could hybridized specifically with target DNA, hence distinguish variation of Rs isolates. This assay will be of further used in the strain identification of Rs from wide range of host from various geographic distribution.

**Key words:** slot blot, *R. solanacearum* (Rs), hybridization.

**PENDAHULUAN**

Bakteri *R. solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1995; sinonim: *Pseudomonas solanacearum*, Smith) adalah penyebab penyakit layu yang mempunyai kisaran inang luas meliputi 44 suku dan 200 spesies tumbuhan (Hayward, 1991; Khrisnapillai *et al.*, 1993). Usaha untuk mengembangkan cara identifikasi isolat Rs ke dalam suatu pengelompokan yang cepat, peka serta bermanfaat untuk pengendalian penyakit layu masih sangat terbatas. Bakteri Rs mempunyai keragaman virulensi, ciri-ciri fenotipik dan perbedaan genotipik yang cukup tinggi. Berdasarkan hal ini, galur bakteri Rs dikelompokkan menjadi dua kelompok fenotipik yaitu sistim pengelompokan galur menurut ras (Buddenhagen and Kelman *et al.*, 1964), dan pengelompokan menurut biovar (Hayward, 1964). Pengelompokan galur ke dalam sistim ras menghasilkan 3 kelompok ras yaitu ras 1 (patogenik terhadap tanaman kacang tanah, tembakau); ras 2 (patogenik terhadap pisang, *Heliconia*); dan ras 3 (patogenik terhadap kentang). Pengelompokan galur ke dalam sistim ras mempunyai keuntungan dapat menjelaskan hubungan inang-patogen sekaligus, tetapi interaksi berdasarkan uji patogenesis isolat pada tanaman memerlukan waktu yang cukup lama untuk dideteksi. Pengelompokan galur

menurut sistim biovar menghasilkan lima kelompok biovar (biovar 1, 2, 3, 4 dan 5) (Hayward, 1964; He *et al.*, 1983). Pengelompokan galur ke dalam sistim biovar hanya didasarkan pada ciri morfologi dan reaksi pada berbagai substrat gula disakarida dan heksosa alkohol (Hayward, 1964). Pengelompokan dengan sistim biovar relatif lebih cepat, dibanding pengelompokan ras. Menurut Palleroni dan Doudoroff (1971) kedua cara pengelompokan ini tidak mempunyai korelasi yang nyata untuk membedakan antara kelompok ras dan kelompok biovar, tetapi biovar 2 nampaknya mirip dengan kelompok isolat yang tergolong ras 1. Pengelompokan galur ke dalam sistim ras dan biovar juga tidak cukup menjelaskan bagaimana keragaman patogenesis diantara galur bakteri yang berasal dari agroekologi yang berbeda (He *et al.*, 1983). Saat ini identifikasi dan karakterisasi galur bakteri Rs yang banyak digunakan adalah berdasarkan uji biovar, hal ini disebabkan karena teknik tersebut lebih murah dan mudah dilakukan. Namun demikian, teknik ini memiliki kendala antara lain hasil deteksi masih memerlukan waktu sekitar 3 minggu, selain masalah sensitifitas yang rendah. Penggunaan pelacak atau primer DNA yang spesifik untuk membedakan galur Rs mempunyai potensi dapat



memperpendek waktu identifikasi dan lebih akurat dibandingkan metode konvensional. Saat ini usaha pengelompokan galur secara genotipik telah dirintis oleh Cook *et al.*, (1989) dan Li *et al.*, (1992) dengan analisis RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) menggunakan pelacak DNA yang berasal dari gen virulensi. Mereka melaporkan terdapat dua kelompok klonal DNA polimorfik yaitu RFLP divisi 1 (biovar 3,4,5), dan RFLP divisi 2 (biovar 1,2 dan N2). Prosedur identifikasi patogen dengan cara *Southern blot* seperti dikemukakan oleh Cook *et al.*, (1989) masih mempunyai kendala waktu, memerlukan enzim restriksi yang cukup mahal, di samping mempunyai pola yang terlalu rumit untuk diterapkan.

Karena adanya keragaman genetik antar galur Rs, maka untuk identifikasi galur Rs seringkali diperlukan lebih dari satu jenis penanda DNA (pelacak atau primer) (Ito *et al.*, 1996). Beberapa teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*), telah digunakan untuk mengidentifikasi berbagai mikroorganisme (Miller dan Martin, 1988). Dengan analisis PCR, Seal *et al.*, (1992) melaporkan penapisan beberapa penanda DNA (primer). Dilaporkan bahwa primer non spesifik yang mereka kembangkan dapat membedakan spesies bakteri Rs dengan bakteri lainnya seperti *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, dan *Pseudomonas gladiolii*. Selain itu mereka telah mengembangkan pelacak DNA Rs yang diperoleh dari hasil hibridisasi subtraktif (*subtractive hybridization*), tetapi hasilnya belum optimal. Beberapa peneliti lain telah mengembangkan pelacak DNA asal untai DNA hasil produk RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Fani *et al.*, 1993; Opina *et al.*, 1997). Mereka melaporkan hasil penelitian tentang karakterisasi galur bakteri berdasarkan pelacak DNA yang dikembangkan dari fragmen RAPD. Fragmen DNA unik pada satu galur yang tidak dijumpai pada galur lainnya, dipisahkan dari gel agarose dan setelah proses kloning selanjutnya disekuensing untuk dibuat beberapa primer oligonukleotida baru (Opina *et al.*, 1997). Namun demikian, beberapa primer yang disintesa tidak bereaksi dengan isolat-isolat Rs yang berasal dari beberapa agroekologi berbeda.

Pengembangan pelacak DNA untuk deteksi patogen tumbuhan memerlukan prosedur yang efisien

dalam mengidentifikasi spesifik asam nukleat dan salinan DNA yang tinggi (*high copy*) pada sel target. Untai gen 16S ribosomal RNA dilaporkan mempunyai struktur unik yang berguna untuk mengetahui kekerabatan hubungan diantara mikroorganisme oleh karena sifatnya yang terpelihara (*highly conserved*), dan dapat disintesis menjadi pelacak DNA yang berlaku spesifik untuk tingkat spesies (Woese *et al.*, 1983; Weisburg *et al.*, 1991). Penggunaan untai DNA ribosomal (16-23S) dapat dipercepat dengan bantuan primer universal dan teknik penggandaan PCR sehingga dapat diperoleh urutan basa nukleotida spesifik yang selanjutnya dapat diklon dan diseleksi untuk keperluan pelacak DNA (Brooks *et al.*, 1992). Teknik *slot blot* merupakan suatu varian deteksi asam nukleat (DNA/RNA) secara *blotting* pada suatu membran menggunakan prosedur hibridisasi. Keuntungan teknik ini adalah asam nukleat dapat langsung ditetaskan pada membran dan ditransfer secara vacuum. Reaksi hibridisasi dengan pelacak yang homolog selanjutnya dideteksi menggunakan cara kemiluminesens atau kolorimetrik. Analisis deteksi patogen dengan teknik *slot blot* DNA telah dipelajari dan dilaporkan bahwa teknik tersebut cukup cepat dan spesifik untuk mendeteksi contoh asal biakan bakteri *Carnobacterium* sp (Brooks *et al.*, 1992). Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi isolat Rs, dan tulisan ini melaporkan hasil identifikasi galur bakteri Rs berdasarkan metode hibridisasi *slot blot* menggunakan pelacak DNA yang dikembangkan dari untai gen 16S rRNA.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi bakteri Rs

Isolat dari galur bakteri Rs diperoleh dari koleksi biakan Dr. AC. Hayward (Dept. of Microbiol. Univ of Qld, Australia). Bakteri dipelihara pada media SPA (*Sucrose Peptone Agar*) (Hayward, 1964). Koloni murni bakteri Rs selanjutnya diperbanyak pada media tabung erlenmeyer (250 ml) berisi media cair CPG (*Casein Peptone Glucose*) (Suryadi *et al.*, 1994). Biakan bakteri dikocok dengan alat pengaduk berputar dengan kecepatan 250 rpm dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 48 jam (Hayward, 1964).



### **Ekstraksi total genomik DNA, penyiapan primer dan pelacak DNA**

Ekstraksi total genomik DNA *Rs* dilakukan berdasarkan protokol yang dikemukakan oleh Samadpour *et al.*, (1988) dengan sedikit modifikasi tanpa menggunakan pelarut sodium dodecyl sulphate (SDS) dalam melisis sel. Primer universal 1500r (5' AAGGAGGTGATTCCAAGCC 3') dan 27f (5' AGAGTTGATCCTGGCTCAG 3') digunakan untuk menggandakan untai DNA pada sekuen gen 16S rRNA (Taghavi *et al.*, 1994). Reaksi PCR berisi campuran 16 µl buffer PCR 10x, 16 µl larutan nukleotida dNTPs, 5 µl primer, 2.5 µl *Taq polymerase* 2U dan 1 µl (25-50 ng) templat DNA. Volume total larutan campuran dijadikan 100 µl dengan penambahan air steril. Untuk mencegah penguapan, reaktan selanjutnya ditetesi minyak mineral (Sigma). Kondisi PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: denaturasi 94°C selama 3 menit, *annealing* 55°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 1.5 menit sebanyak 30 kali putaran. Produk PCR dipisahkan pada alat elektroforesis menggunakan agarose 1% dan larutan buffer 1x TAE (Tris Acetic EDTA), pH 8 (Maniatis *et al.*, 1982). Hasil elektroforesis dilihat dengan fotografi pada sinar UV menggunakan film Polaroid dan alat Transiluminator T 2201 (Sigma, USA). Fragmen DNA hasil PCR selanjutnya diekstraksi dari gel agarose mengikuti prosedur baku (Sambrook *et al.*, 1987) dengan sedikit modifikasi yaitu gel diekstraksi menggunakan pelarut fenol/kloroform, dan selanjutnya dilakukan pemurnian DNA dengan kit *Magic™ PCR preps* (Promega). DNA produk hasil PCR selanjutnya disekuensing. Kondisi *cycle sequencing* adalah sebagai berikut: DNA (40 fmol), 5 µl DNA *buffer sequencing*, 1 µl ddNTPs, 1.5 µl primer dan 16 µl air steril bebas nuclease. Kondisi PCR yang digunakan adalah: denaturasi awal 95°C selama 2 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* selama 30 detik, dan ekstensi 70°C selama 1 menit sebanyak 30 kali putaran. Dari hasil sekuensing kemudian dikonstruksi primer lain berdasarkan perbedaan posisi basa nukleotida dengan menggunakan perbandingan sistem penomoran *Escherichia coli* pada posisi 455-475 yang komplementer dengan gen 16S rRNA (Woese *et al.*, 1983; Taghavi *et al.*, 1996). Sintetik oligonukleotida dijadikan dua primer yaitu primer yang spesifik untuk membedakan biovar 1, 2, N2 (pr#a CGCACTG GTTAATACCTGGTC) dan

primer untuk menguji biovar 3,4,5 (pr#b GCTTC GGTTAATACCTGGAG) (Taghavi *et al.*, 1996). Selanjutnya pelacak DNA ditandai dengan penanda digoxigenin (*dig-11ddUTP*) mengikuti petunjuk baku menggunakan cara *3'end labeling* (Boehringer Mannheim).

### **Hibridisasi slot blot DNA dan analisis data**

Sebanyak 34 ekstrak genomik DNA dari masing-masing galur *Rs* diuji dengan teknik hibridisasi *slot blot* DNA mengikuti petunjuk baku dari Hoeffer Scientific TR 648. Sebanyak 1 µg contoh DNA didenaturasi dalam larutan 100 µl 0.8 M NaOH dan 20 mM EDTA yang dididihkan 100°C selama lima menit, selanjutnya disimpan sebentar dalam es untuk mencegah reaksi renaturasi. Contoh DNA dipipet ke dalam sumur *slot blot* pada kondisi hampa udara untuk mengisap cairan dari membran nilon (BM). Sebanyak 200 µl larutan 0,4 M NaOH ditambahkan kembali ke dalam sumur untuk reaksi denaturasi. Sumur *slot blot* dicuci dengan larutan 2x SSC pH 7,0. Setelah dikering anginkan, membran dibungkus dengan plastik *glad wrap* dan diekspos dengan sinar UV selama 3 menit. Membran diinkubasikan pada suhu 65°C selama 1 jam dalam larutan prahibridisasi (5x SSC) menggunakan alat hibridisasi oven Mini 10 hyb (Hybaid, Ltd) diikuti dengan hibridisasi pada suhu 65°C dalam larutan yang sama selama satu malam. Sebanyak 2,5 ml larutan hibridisasi ditambahkan 10 µl pelacak DNA yang sudah didenaturasi. Setelah hibridisasi, membran dicuci dengan larutan buffer 1 yang mengandung 0,1 M Tris HCl pH 7,5 dan 0,15 M NaCl selama 1 menit, selanjutnya membran dicuci dengan bufer yang sama ditambah susu skim selama 10 menit. Membran diinkubasi dengan 20 ml larutan anti dig AP (1: 5000) selama 30 menit. Membran dicuci dengan 100 ml larutan buffer 1 selama 10 menit diikuti pencucian dengan buffer yang mengandung 0,1 M Tris HCl pH 9,5; 0,2 M NaCl dan 0,005 M MgCl<sub>2</sub> selama 10 menit. Membran selanjutnya dideteksi dengan larutan lumigen (BM) yang diencerkan 1:100 dan diinkubasikan selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah dikering anginkan membran dibungkus plastik *glad wrap* dan diinkubasikan 15 menit pada suhu 37°C. Proses autoradiografi dilakukan dengan mengekspos membran pada film sinar X (Fuji) selama



12 jam. Pengujian deteksi ulang dilakukan dengan cara mendidihkan membran sebanyak 3 kali dalam larutan pencuci (0.1 % SSC, 5% SDS) selama 5 menit, sebelum dihibridisasi dengan pelacak DNA yang berbeda. Data dianalisis berdasarkan homologi fragmen DNA yang terbentuk pada film yang dideteksi secara kemiluminograf sebagai hasil adanya reaksi hibridisasi DNA.

HASIL

Pengujian terhadap DNA dari isolat Rs yang mewakili biovar 1, 2, 3 dan 4 telah dilakukan menggunakan kedua primer tersebut ( pr#a dan pr #b) yang dijadikan sebagai pelacak DNA. Hasil pengujian terhadap 34 contoh DNA Rs yang masing-masing mewakili biovar yang diuji dengan teknik hibridisasi slot blot DNA ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil hibridisasi slot blot DNAmenggunakan pelacak DNA spesifik pr#a dan pr#b

No.	isolat	asal inang/lokasi	biovar	pr#a (bv 1,2, N2)
1	ACH 1075	<i>L. esculentum</i> , Brazil	1	+
2	ACH 1078	Kentang Brazil	1	+
3	ACH 1077	Kentang Brazil	1	+
4	K60	Tomat, USA	1	+
5	ACH 1076	Kentang Brazil	1	+
6	CIP 430	Kentang, Peru	1	+
7	ACH 0158	Kentang,Australia	2	+
8	ACH 1018A	Kentang,Australia	2	+
9	ACH 021R	Kentang,Australia	2	+
10	ACH 114	Kentang,Australia	2	+
11	CIP 309	Kentang, Columbia	2	+
12	CIP 059	Kentang,Uruguay	2	+
13	ACH 1061	Kentang,Australia	2	+
14	CIP 358	Kentang, Kamerun	2	+
15	CIP 232	Kentang, Chili	2	+
16	CIP 175	Kentang,Peru	N2	+
17	CIP 177	Kentang, Peru	N2	+
18	CIP 223	Kentang, Brazil	N2	+
19	ACH 671	Cabai, Australia	3	-
20	ACH 1082	Kentang ?	3	-
21	ACH 1063	Alexandra palm, Australia	3	-
22	ACH 1023	<i>Strelitzia reginae</i> ,Australia	3	-
23	ACH 171	Terung, Australia	3	-
24	ACH 1067	Heliconia,Australia	3	-
25	ACH 190	<i>Xanthium pungens</i> , Australia	3	-
26	ACH 006	<i>X.pungens</i> , Australia	3	-
27	CIP 390	<i>S.reginae</i> ,Australia	3	-
28	ACH 0279	Jahe, Australia	4	-
29	ACH 214	Tomat, Australia	4	-
30	ACH 007	Jahe, Australia	4	-
31	ACH 092	Jahe, Australia	4	-
32	ACH 1066	Heliconia, Australia	4	-
33	ACH 075	Jahe, Australia	4	-
34	CIP 365	Kentang, Philip ina	5	-

- tidak ada reaksi hibridisasi  
+ ada reaksi hibridisasi

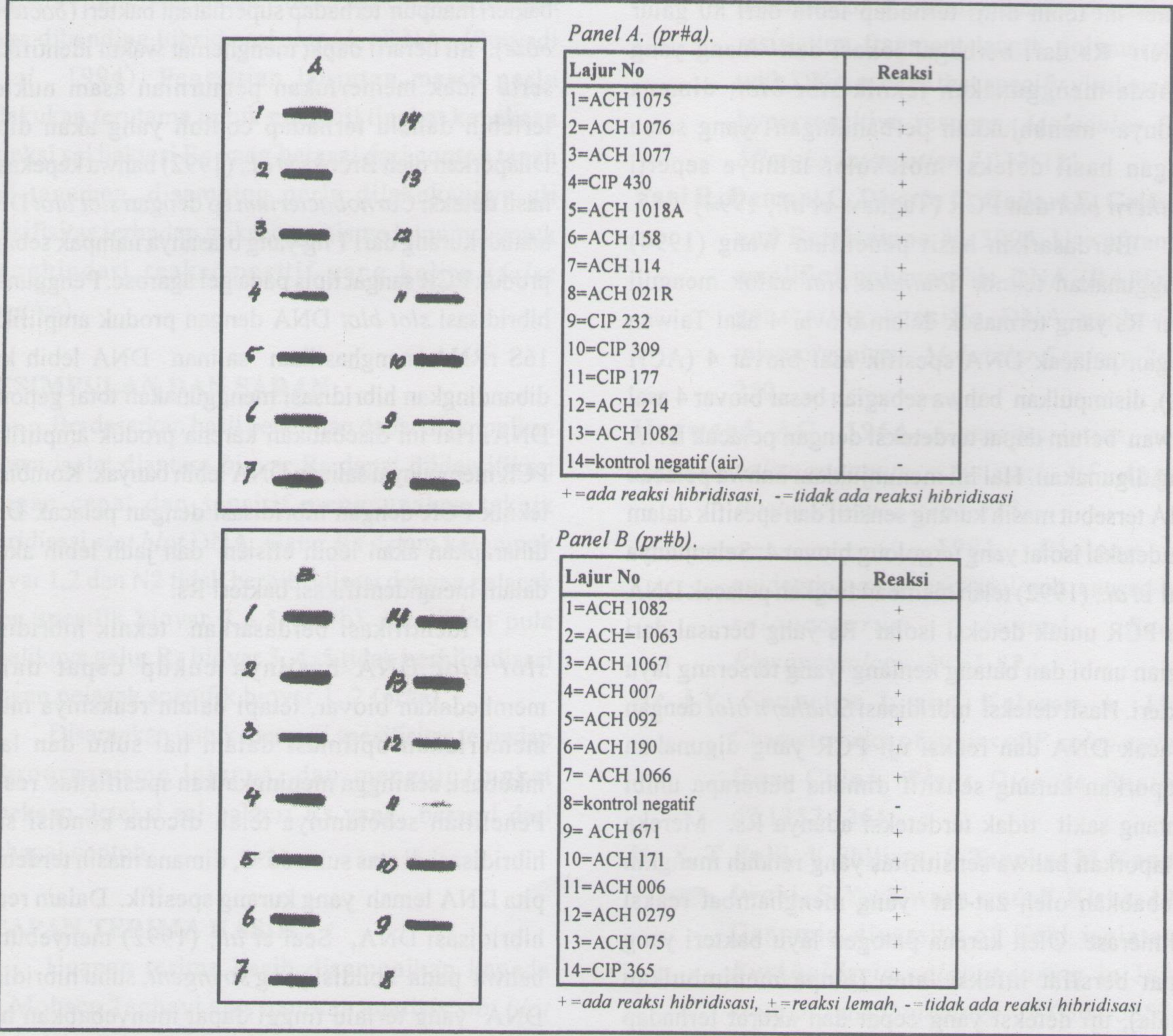


Enam isolat biovar 1, 9 isolat biovar 2, dan 3 isolat biovar N2 yang diuji dengan pr# a menunjukkan hasil reaksi hibridisasi *slot blot* DNA yang positif, tetapi sebaliknya tidak menunjukkan reaksi bila diuji dengan pelacak DNA pr# b. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa deteksi galur bakteri Rs cukup sensitif meskipun sumber isolat berasal dari lokasi berbeda. Dari beragamnya isolat yang diuji sebanyak 10 isolat yang diuji berasal dari tanaman *Solanacea* (kentang) asal Amerika Selatan, kecuali satu isolat K60 yang berasal dari tomat, 4 isolat kentang asal Australia, dan satu isolat kentang asal Kamerun.

Contoh galur bakteri Rs yang termasuk kelompok biovar 1, 2 dan N2 tidak menunjukkan hibridisasi dengan pelacak yang spesifik untuk biovar 3, 4 dan 5 (pr# b), demikian pula sebaliknya isolat-

isolat yang termasuk biovar 3, 4 dan 5 tidak berhibridisasi dengan pelacak DNA spesifik biovar 1, 2 dan N2 (pr# a) seperti ditunjukkan pada gambar 1. Reaksi hibridisasi yang lemah seperti ditunjukkan pada panel B (lajur 11) mungkin disebabkan karena rendahnya homologi DNA yang diuji dengan pelacak DNA yang digunakan, tetapi pada umumnya galur Rs yang diuji menunjukkan homologi yang kuat dengan jenis pelacak yang digunakan.

Dengan demikian galur bakteri (biovar 1,2 N2) yang diuji dengan pelacak DNA pr# a menunjukkan hasil yang cukup sensitif bila diuji spesifisitasnya pada galur-galur bakteri lainnya (biovar 3,4 dan 5). Mayoritas galur bakteri biovar 3 dan 4 asal Australia dari inang yang beragam juga dapat dideteksi secara spesifik oleh pelacak DNA pr# b.



Keterangan: Hasil hibridisasi slot blot beberapa galur Rs yang dideteksi dengan pr#a dan pr#b

Gambar 1. Contoh spesifisitas reaksi hibridisasi *slot blot* DNA menggunakan pelacak DNA pr#a dan pr#b.



## PEMBAHASAN

Molekul 16S rRNA dipilih sebagai dasar untuk pengembangan pelacak DNA karena fungsinya yang terpelihara, mudah untuk memperoleh informasi sekuen parsial, ukuran serta kelimpahannya. Identifikasi urutan basa yang unik dalam gen 16S rRNA bakteri menghasilkan pelacak DNA lebih spesifik untuk membedakan tingkat individu bakteri, galur dan spesies (Li *et al.*, 1990). Metode identifikasi berdasarkan pelacak rRNA secara langsung cukup potensial karena kandungan target yang mempunyai salinan DNA lebih tinggi di dalam selnya. Pelacak DNA/primer yang diperoleh dari hasil pengembangan metode di atas dapat berperan dalam deteksi bakteri berdasarkan reaksi hibridisasi dengan target DNA apabila dideteksi secara *slot blot*. Primer ini telah diuji terhadap lebih dari 80 galur bakteri Rs dari berbagai lokasi dan inang yang berbeda menggunakan teknik *slot blot*, dimana hasilnya menunjukkan perbandingan yang sama dengan hasil deteksi molekuler lainnya seperti *Southern blot* dan PCR (Taghavi *et al.*, 1994).

Berdasarkan hasil penelitian Wang (1994) menggunakan teknik *Southern blot* untuk menguji galur Rs yang termasuk dalam biovar 4 asal Taiwan dengan pelacak DNA spesifik asal biovar 4 (ACH 092), disimpulkan bahwa sebagian besar biovar 4 asal Taiwan belum dapat terdeteksi dengan pelacak DNA yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa pelacak DNA tersebut masih kurang sensitif dan spesifik dalam mendeteksi isolat yang tergolong biovar 4. Selanjutnya Seal *et al.*, (1992) telah membandingkan pelacak DNA dan PCR untuk deteksi isolat Rs yang berasal dari bagian umbi dan batang kentang yang terserang layu bakteri. Hasil deteksi hibridisasi *Southern blot* dengan pelacak DNA dan reaksi uji PCR yang digunakan dilaporkan kurang sensitif dimana beberapa umbi kentang sakit tidak terdeteksi adanya Rs. Mereka melaporkan bahwa sensitifitas yang rendah mungkin disebabkan oleh zat-zat yang menghambat reaksi polimerase. Oleh karena patogen layu bakteri yang dapat bersifat infeksi laten (tanpa menimbulkan gejala), uji deteksi yang cepat dan akurat terhadap patogen ini sangat penting dalam proses sertifikasi untuk tujuan karantina.

Pada penelitian ini reaksi PCR untuk menggandakan untai DNA yang berasal dari gen 16S rRNA ternyata cukup baik untuk memperoleh urutan basa nukleotida berlaku spesifik biovar untuk digunakan sebagai pelacak DNA Rs. DNA Rs yang diuji sebelumnya dengan PCR menggunakan primer universal menghasilkan satu produk DNA tunggal berukuran 400 bp yang dapat pula digunakan sebagai pelacak DNA pada untai ribosomal (16S-23S).

Penelitian pendahuluan identifikasi dengan teknik hibridisasi *slot blot* terhadap contoh bakteri Rs secara langsung dari eksudat umbi kentang (cairan sel tanaman) menunjukkan hasil deteksi yang positif (Taghavi, *pers.comm*). Hal ini mengimplikasikan bahwa identifikasi patogen Rs dengan cara *slot blot* dapat dilakukan baik terhadap contoh murni biakan bakteri maupun terhadap supernatant bakteri (*bacterial ooze*). Ini berarti dapat menghemat waktu identifikasi serta tidak memerlukan pemurnian asam nukleat terlebih dahulu terhadap contoh yang akan diuji. Dilaporkan oleh Brooks *et al.*, (1992) bahwa kepekaan hasil deteksi *Carnobacterium* sp dengan *slot blot* DNA adalah kurang dari 1 ng yang biasanya nampak sebagai produk PCR sangat tipis pada gel agarose. Penggunaan hibridisasi *slot blot* DNA dengan produk amplifikasi 16S rRNA menghasilkan salinan DNA lebih kuat dibandingkan hibridisasi menggunakan total genomik DNA. Hal ini disebabkan karena produk amplifikasi PCR mempunyai salinan DNA lebih banyak. Kombinasi teknik PCR dengan hibridisasi dengan pelacak DNA diharapkan akan lebih efisien dan jauh lebih akurat dalam mengidentifikasi bakteri Rs.

Identifikasi berdasarkan teknik hibridisasi *slot blot* DNA hasilnya cukup cepat dalam membedakan biovar, tetapi dalam reaksinya masih memerlukan optimasi dalam hal suhu dan lama inkubasi, sehingga meningkatkan spesifisitas reaksi. Penelitian sebelumnya telah dicoba kondisi suhu hibridisasi di atas suhu 65°C, dimana masih terdeteksi pita DNA lemah yang kurang spesifik. Dalam reaksi hibridisasi DNA, Seal *et al.*, (1992) menyebutkan bahwa pada kondisi yang *stringent*, suhu hibridisasi DNA yang terlalu tinggi dapat menyebabkan hasil deteksi homologi DNA kurang spesifik. DNA yang terdenaturasi secara sempurna sangat penting untuk



menghasilkan produk DNA yang homolog dengan pelacak DNA. Pada penelitian hibridisasi *slot blot* DNA untuk deteksi galur Rs yang dianalisis secara kemiluminesens menggunakan kit digoxigenin, mempunyai kendala berupa sinyal yang lemah bila digunakan waktu ekspos yang pendek, hal ini dapat diatasi dengan mencuci membran sebanyak dua kali dengan larutan 2 X SSC yang mengandung 0.1% SDS pada suhu 60°C. Tingkat keberhasilan uji ulang menggunakan *slot blot* cukup konsisten dimana galur bakteri Rs yang diuji pada membran dapat terdeteksi adanya rekasi hibridisasi sesuai dengan pengujian sebelumnya. Hasil penelitian deteksi menggunakan kedua pelacak DNA ini hampir mirip dengan hasil penelitian *ribotyping* dimana galur bakteri dapat dikelompokkan sesuai dengan biovarnya, namun analisis *ribotyping* memerlukan waktu relatif lebih lama dibanding hibridisasi *slot blot* DNA. (Suryadi *et al.*, 1994). Penelitian lanjutan masih perlu dilakukan terutama untuk menguji tingkat kepekaan deteksi sel bakteri Rs yang berasal dari contoh tanah dan tanaman, disamping perlu dilakukannya uji spesifisitas terhadap mikroorganisme lainnya untuk menghindari reaksi positif yang keliru (*false positive*).

## KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat diantara biovar Rs dapat diidentifikasi dengan cepat dan sensitif menggunakan teknik hibridisasi *slot blot* DNA. Galur Rs dalam kelompok biovar 1,2 dan N2 tidak berhibridisasi dengan pelacak yang spesifik biovar 3,4,5 (pr#b), Demikian pula sebaliknya galur Rs biovar 3, 4, 5 tidak berhibridisasi dengan pelacak spesifik biovar 1, 2 (pr#a).

Disarankan untuk menguji spesifisitas terhadap mikroorganisme lainnya, dan menguji tingkat kepekaan deteksi sel bakteri Rs yang berasal dari berbagai contoh.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Mohsen Taghavi atas bantuan analisis *slot blot* DNA dan diskusi yang bermanfaat. Penghargaan disampaikan pula kepada Dr. A. C. Hayward atas

penggunaan isolat Rs pada penelitian ini. Sebagian penelitian ini dibiayai oleh proyek ACIAR PN 9452.

## DAFTAR PUSTAKA

- Brooks JL, Andrea S, Patchett RA, Collins MD and Kroll RG. 1992. Use of the PCR and oligonucleotide probes for the rapid detection and identification of *Carnobacterium* species from meat. *Journal Applied Bacteriology*. 72:294-301.
- Buddenhagen IW and Kelman A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt by *P.solanacearum*. *Annual Review Phytopathology*. 2:203-230.
- Cook DE, Barlow and Sequeira L. 1989. Genetic diversity of *P. solanacearum* detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive respons. *Molecular Plant Microbe Interaction* 2:113-121.
- Fani R, Damani G, Diserio C, Gallori E, Grifoni A and Bazzicalupo M. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. *Molecular Ecology*. 2:243-250.
- Hayward AC. 1964. Characteristics of *P. solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*. 27:265-277.
- , 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *P. solanacearum*. *Annual Review Phytopathology*. 29:65-87.
- He LY, Sequeira L and Kelman A. 1983. Characteristics of strains of *P. solanacearum* from China. *Plant Disease Reporter* 67:1357-1361.
- Ito S, T Fujii, Y Shijima, S Tanaka, M Kanaya-Iwaki, S Yoshiwara and F Kishi. 1996. Genomic diversity of field isolates of *Burkholderia solanacearum* in Japan. *Journal Phytopathology*. 144:504-505.
- Khrisnapillai V, Escudra MD and Holloway BW 1993. The genome analysis of *P.*



- solanacearum* and its analysis p:80-85. dalam Kumpulan makalah simposium pendidikan fitopatologi dan pengendalian hayati. Kongres PFI XII,6-8 September 1993. Yogyakarta.
- Li X, Dorsch M, DelDot T, Sly LI, Stackebrandt E and Hayward AC. 1992.** Phylogenetic studies of the rRNA group II Pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. *Journal Applied Bacteriology*. 74:324-329.
- Maniatis T, EF Fritsch and J Sambrook. 1982.** *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Lab. Hlm 545.
- Miller SA and Martin RR. 1988.** Molecular diagnosis of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*. 26:409-432.
- Opina N, Tavner F, Hallway G, Wang JF, Li TH, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC, Khrisnapillai V, Hong WF, Holloway BW and Timmis JN. 1997.** A novel method for developmentt of species and strain specific probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly: *P. solanacearum*). *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 5:19-30.
- Palleroni NJ and Doudoroff M. 1971.** Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *P. solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 107:690-696.
- Samadpour M, Moseley SL and Lory S. 1988.** Biotinylated of DNA probes for exotoxin A and pillin genes in differentiation of *P. aeruginosa* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 26(11):2319-2323.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1987.** *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbour. New York.
- Seal SE, Jackson LA and Daniels MJ. 1992.** Isolation of a *P. solanacearum* specific DNA probes by subtractive hybridization and construction of species specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the PCR. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 58(11):3751-3758.
- \_\_\_\_\_, Young JPW and Daniels MJ. 1992. Differentiation of *P. solanacearum*, *P. syzigii*, *P. pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing:construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by PCR. *Journal of General Microbiology* 139:1587-1594.
- Suryadi Y, Fegan M and Hayward AC. 1994.** Penggunaan pelacak 16S rRNA untuk membedakan biovar *P. solanacearum*. *Risalah Hasil Penelitian Tanaman Pangan* 1:42-51.
- Taghavi M, Fegan M and Hayward AC. 1994.** Phenotypic and molecular approaches to strain differentiation of *P. solanacearum* Dalam *Groundnut bacterial wilt in Asia*. Mehan V.K and D.Mc Donalds (editor). Proc. 3<sup>rd</sup> working group Meeting, ICRISAT.
- Taghavi M, Hayward AC, Sly LI and Fegan M. 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:10-15.
- Wang JF. 1994.** Biovar identification strains of *P. solanacearum* and development of molecular detection methods using DNA probes. *AVRDC progress report*. p:208-213.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ. 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 473:697-703.
- Woese CR, Guttell R, Gupta R and Woller HF. 1983.** Detailed analysis of the higher order structure of 16S like ribosomal nucleic acids. *Microbiology Review*. 47:621-669.
- Yabuuchi, Kosako EY, Yano I, Hotta H and Nishiuchi Y. 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. *Microbiology and Immunology*. 39(11):897-904.