

**KERAGAMAN GENETIKA *XANTHOMONAS AXONOPODIS PV.*
GLYCINES ASAL KEDELAI VARIETAS *EDAMAME* DI INDONESIA**

***GENETIC DIVERSITY OF XANTHOMONAS AXONOPODIS PV.*
*GLYCINES FROM SOYBEAN (EDAMAME VARIETY) IN INDONESIA***

Andi Khaeruni*

Program Studi IHPT Fakultas Pertanian, Universitas Haluoleo Kendari.

Antonius Suwanto

Departemen Biologi Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor

Budi Tjahjono dan Meity S. Sinaga

Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

*Penulis untuk korespondensi, e-mail : akhaeruni@yahoo.com

ABSTRACT

Xanthomonas axonopodis pv. glycines cause bacterial pustule disease caused, a serious disease in Edamame cultivation in Indonesia. We collected a total of 29 *X. axonopodis pv. glycines* isolates from Edamame fields at Jember, Ciawi, Cipanas and Bogor. The genetic diversity analysis of all isolates employing ARDRA and ISR techniques showed six and seven different DNA profile respectively. Therefore there are at least seven strains of *X. axonopodis pv. glycines* infected Edamame in Indonesia. Both CP1 from Cipanas and JA4 from Sukorejo Jember isolates, possess unique DNA profile and are not closely related genetically to other isolates.

Keywords : *Xanthomonas axonopodis pv. glycines*, Edamame, ARDRA and ISR techniques

INTISARI

Xanthomonas axonopodis pv. glycines penyebab penyakit pustul bakteri, merupakan salah satu penyakit penting yang sering ditemui dalam budidaya Edamame di Indonesia. Dari penelitian ini telah dikoleksi sebanyak 29 isolat *X. axonopodis pv. glycines* dari pertanaman Edamame di Jember, Ciawi, Cipanas dan Bogor. Berdasarkan hasil uji keragaman genetik menggunakan teknik ARDRA dan ISR secara berturut-turut diperoleh enam dan tujuh profil DNA yang berbeda, oleh karena itu diperoleh informasi bahwa terdapat minimal tujuh strain *X. axonopodis pv. glycines* yang menginfeksi tanaman Edamame di Indonesia. Isolat CP1 dari Cipanas dan JA4 dari Sukorejo Jember merupakan isolat yang memiliki profil DNA spesifik karena hubungan kekerabatan genetiknya yang cukup jauh dari isolat-isolat lainnya.

Kata kunci: *Xanthomonas axonopodis pv. glycines*, Edamame, teknik ARDRA dan ISR

PENGANTAR

Edamame (*green vegetable soybean*) merupakan salah satu varietas kedelai yang memiliki nilai ekonomi tinggi sebagai komoditas ekspor, sehingga budidaya tanaman ini mulai diminati petani khususnya di daerah Jember, Bogor, Ciawi dan Cipanas. Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa penyakit pustul bakteri yang disebabkan oleh *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* merupakan salah satu penyakit penting yang sering ditemui dan menjadi kendala dalam budidaya tanaman *Edamame* di Indonesia. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa *X. axonopodis* pv. *glycines* yang diisolasi dari *Edamame* di daerah tersebut di atas memiliki tingkat virulensi yang berbeda ketika diuji pada kedelai varietas Orba, Wilis, dan *Edamame* (Khaeruni, 2005), sehingga diduga isolat-isolat *X. axonopodis* pv. *glycines* tersebut memiliki keragaman genetik yang cukup tinggi.

Pengujian secara morfologi dan fisiologi, dirasa kurang cukup untuk mengklasifikasikan isolat-isolat bakteri pada tingkat spesies dan intraspecies secara taksonomi, karena memiliki taraf determinasi yang rendah. Aplikasi teknik molekuler untuk menganalisis keragaman bakteri, seperti analisis gen 16S-rRNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR) mampu menampilkan keragaman genetika bakteri baik yang dapat dikulturkan maupun yang tidak (Yusuf *et al.*, 2002). Analisis keragaman genetika yang cepat dan sederhana, dapat dilakukan dengan teknik *amplified ri-*

bosomal DNA restriction analysis (ARDRA), analisis ini dilakukan dengan cara mengamplifikasi gen 16S-rRNA menggunakan primer yang disesuaikan dengan sampel DNA yang akan diamplifikasi (Boerman *et al.*, 1996). Produk PCR selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi tertentu.

Ribosomal RNA 16S telah digunakan secara umum sebagai parameter sistematika molekuler yang universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetika pada tingkat spesies (Woose *et al.*, 1990). Meskipun demikian, studi molekuler keragaman bakteri pada tingkat intraspecies (subspecies) menggunakan 16S pada umumnya menampilkan derajat diskriminasi yang rendah. Hal ini disebabkan karena sebagian besar hasil runutan DNA 16S-rRNA menunjukkan adanya kesamaan yang tinggi di dalam satu spesies, sehingga amplifikasi pada daerah intergen 16S-rRNA (ISR) menjadi salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik bakteri intraspecies (Boyer *et al.*, 2001).

Penelitian ini bertujuan mempelajari keragaman genetika dan hubungan kekerabatan antara *X. axonopodis* pv. *glycines* yang diisolasi dari *Edamame* dengan menggunakan teknik ARDRA dan ISR. Dengan menggunakan profil elektroforesis hasil PCR dari kedua teknik tersebut di atas diharapkan dapat melihat perbedaan dan hubungan kekerabatan isolat-isolat yang diuji yang secara morfologi dan fisiologi sulit dilakukan.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel dan Isolasi Bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv *glycines*. Pengambilan sampel dilakukan melalui survei ke beberapa lokasi pertanaman *Edamame* di Jawa Timur (Jember) dan di Jawa Barat (Cipanas, Ciawi dan Bogor). Pengambilan sampel dilakukan di setiap hamparan pertanaman pada 10 tanaman secara diagonal dengan mengambil beberapa sampel daun yang didiagnosis bergejala penyakit pustul bakteri. Daun yang terinfeksi penyakit pustul bakteri diambil dengan cara dipetik, kemudian dibungkus dengan tisu basah lalu dimasukkan ke dalam kantong plastik. Isolasi bakteri dilakukan menurut metode Schaad (1988) yang telah dimodifikasi (Rukayadi, 1995). Isolat bakteri yang diperoleh dimurnikan dengan menggunakan media *Yeast-extract Dextrose Calcium Carbonate Agar* (YDCA) untuk diteliti lebih lanjut. Penyimpanan bakteri dilakukan dengan menambahkan gliserol steril 15% pada suspensi sel dari media padat untuk disimpan dalam freezer pada temperatur -20°C .

Uji Patogenisitas. Isolat bakteri yang menampilkan karakteristik koloni *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* diuji patogenisitasnya dengan teknik bioesai kotiledon menurut Hwang *et al.* (1992) yang telah dimodifikasi oleh Mesak *et al.* (1994). Isolat yang patogenik, isolat yang menimbulkan gejala kuning klorotik pada kotiledon yang diuji, yang digunakan dalam penelitian ini.

Amplifikasi Gen 16S-rRNA. Sebagai DNA cetakan untuk proses PCR digunakan ekstrak DNA dari 29 isolat *X. axonopodis* pv. *glycines* menggunakan metode Lazo & Gabriel (1987). Primer yang digunakan adalah primer universal prokaryot (Marchesiet *al.*, 1998 yakni 63f(5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC) & 1387r(5'-GGGCGGWGTGTACAA GGC). Reaksi PCR sejumlah 25 μl mengandung 1.5 unit *Tag DNA Polymerase*, 10mM Tris-HCL (pH 9.0 pada suhu kamar), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM tiap-tiap dNTP dan bahan penstabil termasuk BSA. Protokol PCR digunakan adalah pra denaturasi (94°C , 2 menit), denaturasi (92°C , 30 detik), annealing primer (55°C , 30 detik), pemanjangan primer (75°C , 1 menit) dan *post-PCR* (75°C , 5 menit) dengan jumlah siklus sebanyak 30 kali. Mesin PCR yang digunakan dalam penelitian ini adalah *GeneAmp® PCR system* (Perkim Elmer, USA).

Analisis Pola Sidik Jari Gen 16S-rRNA dengan ARDRA. Hasil amplifikasi gen 16S-rRNA dari masing-masing sampel dipotong dengan menggunakan enzim restriksi HaeIII (5'-GG'CC) (New England, Biolabs Inc.). Setiap reaksi pemotongan terdiri atas 5 μl produk DNA hasil amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR dicampur dengan 5 unit enzim restriksi HaeIII dan buffernya pada konsentrasi 1 x dan ditambahkan akuades steril sampai mencapai volume akhir 20 μl . Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 3 jam, kemudian dicampur dengan blue juice (Sambrook & Russel, 2001). Hasil pemotongan selanjutnya

dilarikan dalam agarose 2% dalam buffer TAE 1X dengan kekuatan arus listrik 70 volt yang setara dengan 45 mA (Minicycle, Pharmacia Biotech). Selanjutnya gel direndam dalam larutan etidium bromida pada konsentrasi 10 µg/ml sampai seluruh gel terendam dengan baik selama 15 menit. Gel selanjutnya diangkat dan dicuci dengan akuades dengan merendamnya selama 20 menit. Pola pita DNA diamati dengan UV transluminator pada panjang gelombang 280 nm dan direkam melalui Gel Doc 1000 (Bio Rad, CA) untuk melihat pola ARDRA. Pola ARDRA ini dijadikan data biner sebagai input untuk konstruksi pohon filogenetika.

Amplifikasi Intergen 16S-23S-rRNA dengan PCR. Amplifikasi intergen 16S-23S-rRNA menggunakan ekstrak DNA yang sama pada percobaan sebelumnya. Primer yang digunakan ialah primer universal untuk *Methylobacterium* berupa *foward primer* 16S/p2(5'CTTgTACACACCg CCCgTC-3') dan *reverse primer* 23/p10 (5'-CCTTTCCCTCA-cggTACTg-3'). Volume dan kondisi reaksi PCR dilakukan seperti yang dijelaskan oleh Riupassa (2004). Setiap tabung reaksi PCR diisi dengan cetakan DNA 1 µL, dNTP 0,5 µL, enzim *Taq polimerase* (NEB) 0,2 µL (1 unit), primer 16S/p2 2,5 µL (0,3 µM), primer 23S/p10 2,5 µL (0,3 µM), buffer enzim 2,5 µL, lalu ditambahkan akuabides steril hingga mencapai volume 25 µL. Kontrol negatif, yaitu reaksi tanpa cetakan DNA selalu digunakan setiap kali proses PCR dilakukan. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus, dengan kondisi pra-

denaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 60°C selama 30 detik, dan *elongation* 72°C selama 1 menit. Hasil amplifikasi gen 16-23S-rRNA dipisahkan menggunakan elektroforesis minigel dengan menggunakan gel agarosa 1,5% dalam buffer 1xTAE dengan tegangan listrik 70 volt. *Staining* gel menggunakan etidium bromida (2 µg/mL) selama 10 menit dan *distaining* menggunakan akuades selama 30 menit. Profil DNA yang diperoleh diamati dengan UV-transluminator pada panjang gelombang 280 nm. Untuk mendokumentasikannya digunakan kamera *Gel Doc* 1000 (BioRad, CA). Pola hasil amplifikasi PCR ini dijadikan data biner sebagai input untuk konstruksi pohon filogenetika.

Konstruksi Pohon Filogenetika. Data biner berdasarkan ukuran pita hasil ARDRA-*Hae*III dan ISR, dianalisis dengan metode UPGMA dengan perangkat lunak NTSYS versi 2.1 untuk konstruksi pohon filogenetika. Fenogram tersebut digunakan untuk menduga hubungan kekerabatan antar isolat *X. axonopodis* pv. *glycines* asal Edamame di Indonesia.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Patogenisitas. Berdasarkan uji patogenisitas diyakini ke-29 isolat yang diuji merupakan *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* yang diberi nama (kode) berdasarkan asal daerah isolat tersebut, yaitu JA sebanyak 10 isolat berasal dari Sukerejo Jember, JB

sebanyak tujuh isolat berasal dari Summersari Jember, CP sebanyak dua isolat berasal dari Cipanas, DM sebanyak empat isolat berasal dari Bogor dan CW enam isolat yang berasal dari Ciawi. Ke-29 isolat tersebut yang digunakan dalam pengujian ini.

Bioesai kotiledon yang telah dikembangkan oleh Hwang *et al.* pada tahun 1992, merupakan salah satu uji patogenisitas *X. axonopodis* pv. *glycines*

yang cepat dan andal dan paling sesuai untuk mengerjakan isolat dalam jumlah yang banyak (Mesak *et al.* 1994). Metode ini menggunakan kotiledon kedelai varietas Wilis yang berumur satu minggu kemudian dilakukan pelukaan dengan menggunakan piranti jarum yang telah disterilkan sehingga memudahkan patogen untuk melakukan proses infeksi. Hasil uji patogenisitas dengan bioesai kotiledon ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji patogenisitas dengan esai kotiledon

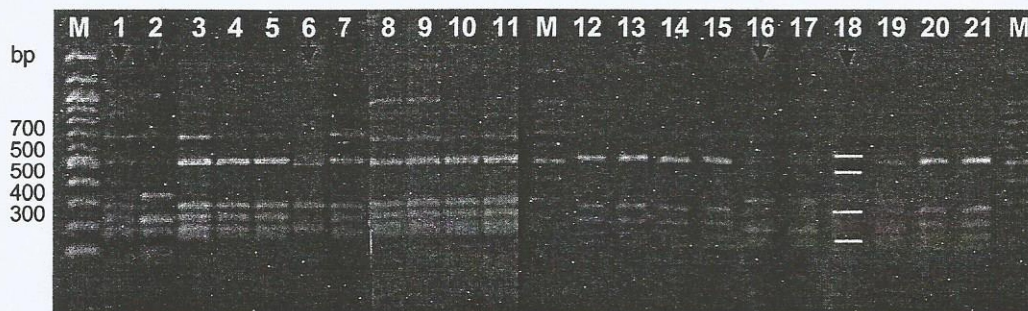
Kode Isolat	Asal Isolat	Patogenisitas pada umur 5 hsi		
		Periode laten (hsi)	n/N	%
JA1	Jember A	3	38/40	95,0
JA2	Jember A	3	38/40	90,0
JA3	Jember A	3	39/40	95,0
JA4	Jember A	3	34/40	85,0
JA5	Jember A	3	34/40	85,0
JA6	Jember A	3	34/40	85,0
JA7	Jember A	3	34/40	85,0
JA8	Jember A	3	37/40	92,5
JA9	Jember A	3	40/40	100,0
JA10	Jember A	3	40/40	100,0
JB1	Jember B	3	39/40	97,5
JB2	Jember B	3	39/40	97,5
JB3	Jember B	3	39/40	97,5
JB4	Jember B	3	38/40	95,0
JB5	Jember B	3	38/40	95,0
JB6	Jember B	3	34/40	85,0
JB7	Jember B	3	34/40	85,0
CP1	Cipanas	3	36/40	90,0
CP2	Cipanas	3	36/40	90,0
DM11	Bogor	3	33/40	82,5
DM12	Bogor	3	38/40	95,0
DM21	Bogor	3	34/40	85,0
DM22	Bogor	3	35/40	87,5
CW12	Ciawi	3	37/40	92,5
CW22	Ciawi	3	35/40	87,5
CW32	Ciawi	3	37/40	100,0
CW41	Ciawi	3	35/40	85,0
CW51	Ciawi	3	40/40	100,0
CW61	Ciawi	3	35/40	87,5
YR32 (kontrol +)	Bogor	3	36/40	90,0
Xam (kontrol)	Bogor	*	0/40	0,0

Keterangan : n, jumlah kotiledon yang menimbulkan gejala klorotik kuning; N = jumlah kotiledon yang diinokulasi, *, tidak menunjukkan gejala klorotik

Profil DNA Berdasarkan Teknik ARDRA. Hasil amplifikasi gen 16S-rRNA yang dipotong dengan enzim restriksi *Hae*III menunjukkan adanya keragaman diantara isolat-isolat *X. axonopodis* pv *glycines* asal *Edamame*. Pemotongan dengan enzim tersebut menghasilkan enam pola fragmen yang dapat dibedakan (Gambar1). Isolat-isolat yang identik dalam satu pola pemotongan ditampilkan pada Tabel 2.

Dari enam profil DNA hasil pemotongan dengan *Hae*III menunjukkan bahwa sebagian besar isolat *X. axonopodis* pv *glycines* asal *Edamame* (24 isolat) tergolong ke dalam pola ARDRA I yang menghasilkan enam pita DNA yang masing-masing berukuran 500, 275, 225, 175 dan dua pita ukuran 175 bp. Isolat-isolat CP1, JA4, CW32, CW41, masing-masing membentuk pola yang berbeda, sehingga memiliki pola ARDRA yang berbeda pula. Isolat CW12 dan CW22 memiliki profil DNA yang sama sehingga tergabung dalam pola yang sama yaitu pola ARDRA IV (Tabel 1).

Perbedaan profil DNA hasil ARDRA gen 16S-rRNA *X. axonopodis* pv *glycines* ini, menunjukkan adanya variasi genetik yang cukup tinggi diantara isolat-isolat *X. axonopodis* pv *glycines* dari tanaman *Edamame*, karena beberapa peneliti sebelumnya melaporkan bahwa penggunaan teknik amplifikasi ARDRA tidak dapat membedakan antar strain yang berada dalam satu spesies (Yuhana, 1999; Giyanto, 1998). Oleh karena itu amplifikasi gen 16S-rRNA dengan pemotongan enzim restriksi *Hae*III tetap berpotensi untuk digunakan sebagai penanda molekular untuk analisis keragaman genetik isolat-isolat (intraspecies) *X. axonopodis* pv *glycines*, namun sebaliknya sudah tidak akurat lagi digunakan sebagai penanda molekular untuk deteksi *X. axonopodis* pv *glycines* sebagaimana yang dikemukakan oleh Giyanto (1998), karena profil DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi tersebut menampilkan beberapa pola pemotongan yang berbeda.



Gambar 1. Hasil elektroforesis profil ARDRA-*Hae*III sejumlah isolat *X. axonopodis* pv *glycines*. Keterangan : M = marker 100 bp (Pomega); 1: YR32; 2: CP1; 3: CP2; 4: JA1; 5: JA3; 6: JA4; 7: JA7; 8: JA8; 9: JA10; 10: JB3; 11: JB; 12: DM11; 13: DM12; 14: DM21; 15: DM22, 16: CW12, 17: CW22, 18: CW32, 19: CW41, 20: CW51, 21: CW61. (↓, adalah contoh keenam pola ARDRA yang berbeda)

Tabel 2. Pola ARDRA-*Hae*III dan ISR beserta isolat-isolat yang identik dari 29 isolat *X. axonopodis* pv. *glycines* asal *Edamame*.

Pola ARDRA	Isolat identik	Ukuran pita (bp)	Pola ISR	Isolat identik bp	Ukuran pita
I	YR32, CP2, JA1, JA2, JA3, JA5, JA6, JA7, JA8, JA9, JA10, JB1, JB2, JB3, JB4, JB5, JB6, JB7, DM11, DM12, DM21, DM22, CW51, CW61	500, 275, 250, 175, 150	I	YR32, CP2, JA1, JA2, JA8, JA9, JA10, CW51, CW61	1100, 1000
II	JA4	500, 275, 175	II	JA3, JA5, JA6, JA7, JB1, JB2, JB3, JB4, JB5, JB6, JB7, CW22	1100
III	CW12, CW22	500, 325, 200, 175, 150	III	DM11, DM12, DM21, DM22, CW41	1100, 1000, 900
IV	CW41	500, 325, 272, 200, 150	IV	JA4	1200, 1100, 1000
V	CW32	525, 400, 275, 150	V	CP1	1200
VI	CP1	500, 325, 225, 175, 175	VI	CW32	1100, 900, 750
			VII	CW32	1200, 1150, 950

Profil DNA Berdasarkan Teknik ISR 16-23S-rRNA. Analisis keragaman genetik bakteri berdasarkan teknik ISR ialah suatu analisis yang berdasarkan pada amplifikasi daerah antara 16S-rRNA dan 23S-rRNA yang disebut daerah *Intergenic Spacer Region* (ISR). Profil DNA sejumlah isolat *X. axonopodis* pv. *glycines* asal *Edamame* hasil amplifikasi pada daerah ISR menunjukkan pola keragaman yang lebih tinggi dari pada daerah 16S-rRNA yang dipotong dengan enzim restriksi *Hae*III, hal ini ditandai dengan diperolehnya tujuh pola profil DNA yang berbeda (Gambar 2) dengan menggunakan isolat-isolat yang sama. Isolat-isolat yang identik dalam satu pola ISR ditampilkan pada Tabel 2. Hasil amplifikasi tersebut tidak dipotong dengan enzim restriksi Keragaman hasil

amplifikasi tersebut menunjukkan adanya variasi pada ribosomal DNA intraspecies *X. axonopodis* pv. *glycines*. Oleh karena itu, dapat diduga bahwa antar strain *X. axonopodis* pv. *glycines* mempunyai jumlah operon *ribosomal* DNA yang berbeda, atau memiliki panjang intergen 16S-23S yang berbeda ukuran. Fragmen hasil amplifikasi ISR yang dihasilkan berjumlah 1 sampai 3, dengan ukuran berkisar dari 750 bp sampai 1200 bp. Amplikon 1100 merupakan hasil amplifikasi yang hampir ditemui pada semua isolat uji, kecuali isolat CP1 dan CW21.

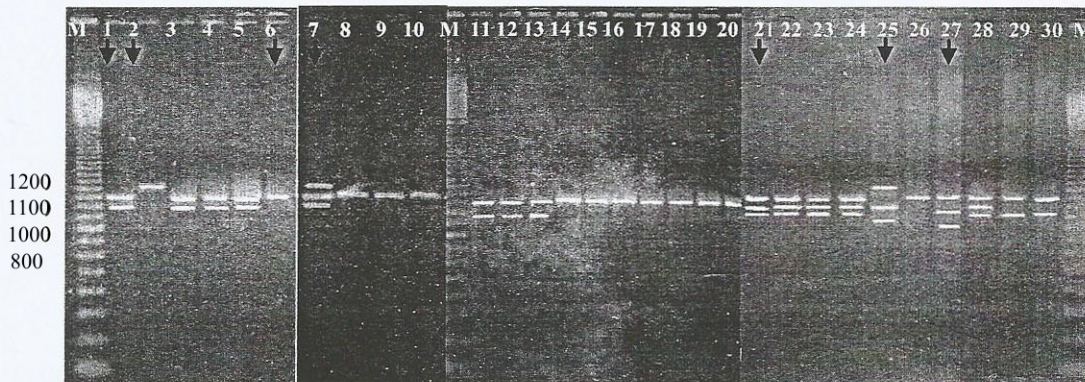
Riupassa (2004) mengemukakan bahwa penggunaan primer 16S/p2 dan 23S/p10 pada beberapa bakteri diprediksikan menghasilkan amplikon ukuran 1100 bp yang mencakup bagian

terminal 16S dan bagian awal 23S rRNA. Oleh karena itu jika terdapat amplicon yang melebihi ukuran 1100 bp, maka kemungkinan di dalam bagian ISR isolat tersebut terdapat beberapa tRNA atau terjadi penambahan basa nukleotida pada bagian awal 23S-rRNA, sehingga membuat amplifikasi lebih panjang. Dengan demikian, amplifikasi intergen 16S-23S rDNA dengan PCR dapat digunakan sebagai suatu cara yang cepat dan mudah untuk membedakan isolat-isolat dalam suatu spesies yang sama termasuk strain-strain dari *X. axonopodis* pv. *glycines*.

Pohon Filogenetika. Fenogram hasil analisis data biner menggunakan metode UPGMA dengan perangkat lunak NTSYS versi 2.1 memperlihatkan

kekerabatan antar isolat *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* asal *Edamame* pada setiap jenis analisis yang digunakan (Gambar 3 dan 4). Dari gambar tersebut menunjukkan bahwa isolat-isolat yang memiliki pola pita hasil amplifikasi PCR atau pola pemisahan DNA yang hampir mirip, mempunyai jarak yang dekat pada fenogramnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat-isolat yang bersangkutan memiliki hubungan kekerabatan yang dekat. Sebaliknya semakin jauh jarak pada fenogram, hubungan kekerabatan antar isolat semakin jauh.

Hasil analisis kekerabatan genetik ke-29 isolat yang diuji dengan teknik ARDRA yang dipotong dengan enzim restriksi *HaeIII* menunjukkan adanya enam kelompok profil genetik yang berbeda, dan pada umumnya (23 isolat)



Gambar 2. Hasil elektroforesis profil ISR 16S-23S rDNA berbagai isolat *X. axonopodis* pv. *glycines* asal *Edamame*. M = marker 100bp. 1:YR32; 2:CP1; 3: CP2; 4: JA1; 5: JA2; 6: JA3; 7: JA4; 8: JA5; 9:JA6; 10: JA7; 11: JA8; 12: JA9; 13: JA10; 14: JB1;15:JB2; 16: JB3; 17: JB4; 18: JB5; 19: JB6; 20: JB7; 21: DM11; 22: DM12; 23: DM21; 24:DM22; 25:CW12; 26: CW22; 27: W32; 28: CW41, 29:CW51 dan 30 :CW61.(↓ , adalah contoh ketujuh pola ISR yang berbeda)

berada pada kelompok I yang memiliki pola yang sama dengan YR32. Isolat-isolat yang membentuk pola tersendiri adalah JA4 (asal Jember), CP1 (asal Cipanas), CW22 dan CW41 (asal Ciawi) (Gambar 3).

Ketika teknik ISR digunakan, maka terjadi perubahan komfirmasi dalam fenogram hubungan kekerabatan ke-29 isolat tersebut dan membentuk tujuh kelompok yang berbeda. Beberapa isolat yang pada teknik ARDRA berada dalam satu kelompok, ternyata dengan

teknik ISR membentuk kelompok yang berbeda. Isolat-isolat dari Jember membentuk dua kelompok yang berbeda walaupun keduanya masih memiliki hubungan kekerabatan genetik yang dekat, isolat asal Bogor (DM11, DM12, DM21 & DM22) bersama isolat CW41 (asal Ciawi) membentuk kelompok sendiri. Sementara isolat asal Ciawi lainnya tersebar di berbagai kelompok dan kelihatannya memiliki variasi genetik yang cukup tinggi dan beberapa isolat seperti CW12, CW32 membentuk kelompok

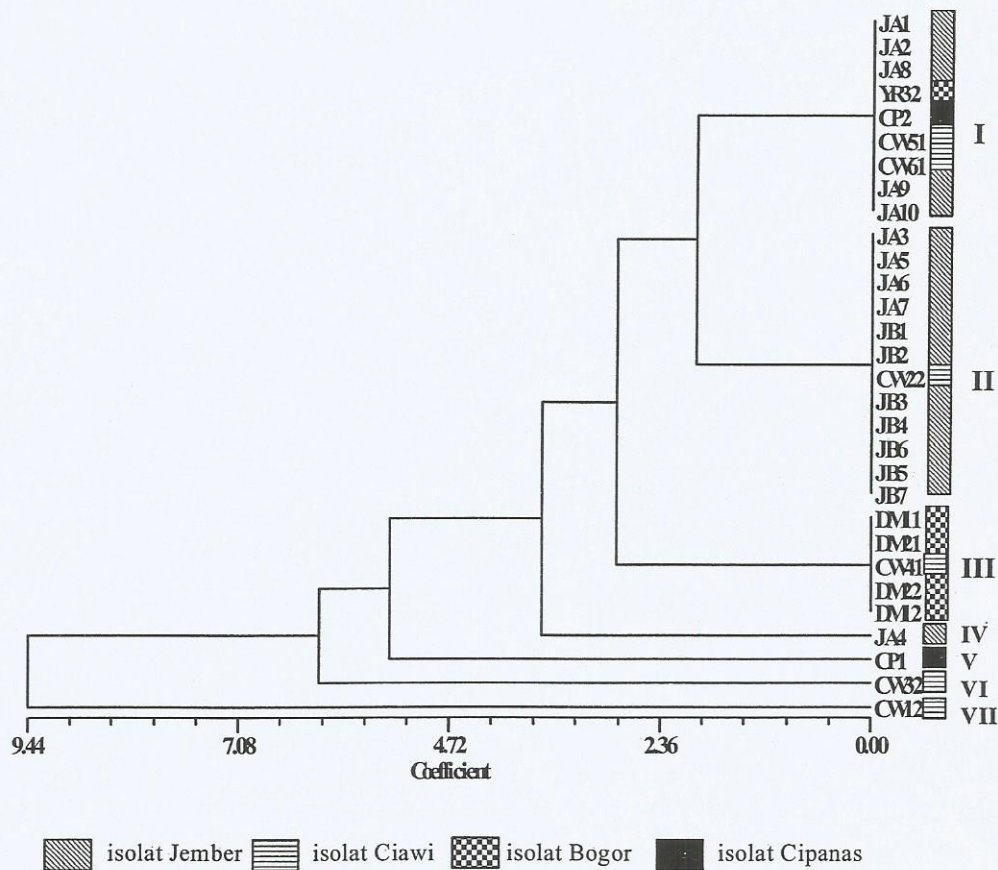


Gambar 3. Filogram sejumlah strain *X. axonopodis* pv. *glycine* asal Edamame berdasarkan data matriks hasil ARDRA-*Hae*III yang dianalisis dengan UPGMA. Angka pada sumbu horizontal menunjukkan persentase perbedaan berdasarkan koefisien Jaccard.

tersendiri. Isolat CP1 dan JA4 dengan teknik ISR pun masih memiliki variasi genetik yang berbeda dengan isolat-isolat lainnya.

Hasil pada Gambar 3 dan 4, memperlihatkan bahwa masih ada korelasi antara asal lokasi isolat dengan tingkat kekerabatan genetiknya, misalnya isolat-isolat dari Jember pada umumnya masih berada pada pola profil genetik yang masih dekat satu sama lain, sedangkan isolat

asal Ciawi dan Bogor juga membentuk suatu kelompok dengan kekerabatan yang masih dekat dibanding pada kelompok Jember. Hasil penelitian ini mendukung penelitian keragaman genetik *X. axonopodis* pv. *glycines* pada kedelai asal Pulau Jawa yang dilakukan oleh Rukayadi (1995), yang mengemukakan adanya korelasi antara hubungan kekerabatan antar galur dengan lokasi geografis asal isolat. Namun demikian



Gambar 4. Filogram sejumlah strain *X. axonopodis* pv. *glycine* asal Edamame berdasarkan data matriks hasil ISR yang dianalisis dengan UPGMA. Angka pada sumbu horizontal menunjukkan persentase perbedaan berdasarkan koefisien Jaccard.

terdapat pula isolat-isolat yang sama sekali tidak menunjukkan adanya korelasi hubungan kekerabatan genetik dengan lokasi geografis asal isolat, sebagai contoh isolat CP1 dan CP2 yang sama-sama berasal dari pertanaman *Edamame* dari Cipanas, memiliki hubungan kekerabatan yang cukup jauh, CP2 cenderung lebih dekat dengan isolat-isolat asal Jember. Hal yang sama didapatkan pada isolat JA4 asal Jember, kekerabatan genetiknya sangat jauh dari isolat-isolat asal Jember lainnya. Isolat CP1 dan JA4 merupakan isolat yang secara sendiri-sendiri selalu membentuk kelompok tersendiri yang terpisah dengan isolat lainnya baik berdasarkan analisis ARDRA-*HaeIII* maupun ISR dan memiliki pola pemotongan DNA yang unik, sehingga tingkat kekerabatan genetiknya dengan isolat lainnya pun juga cukup jauh.

KESIMPULAN

1. Analisis keragaman genetik menggunakan ARDRA-*HaeIII* mampu membedakan ke-29 isolat *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* asal *Edamame* kedalam enam pola profil DNA yang berbeda. Sedangkan teknik ISR mampu membedakan kedalam tujuh pola amplifikasi fragmen DNA yang berbeda, oleh karena itu diperoleh minimal tujuh strain *X. axonopodis* pv. *glycines* yang menginfeksi *Edamame* di Indonesia
2. Teknik ISR memperlihatkan hasil yang lebih diskriminatif, praktis dan ekonomis untuk membedakan intraspecies *X. axonopodis* pv. *glycines* asal *Edamame*

secara molekuler dibandingkan dengan teknik ARDRA-*HaeIII*

3. Hasil analisis hubungan kekerabatan genetik menunjukkan bahwa pada umumnya kekerabatan antar isolat masih dipengaruhi oleh letak geografis asal isolat, kecuali isolat CP1 dan JA4 memperlihatkan pola sidik jari yang unik yang tidak berkorelasi antara kekerabatan dengan asal isolat tersebut.

UNGKAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada *Research Center for Microbial Diversity* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB Bogor yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Borneman J, Skroch PW, O'Sullivan KM, Palus JA, Rumjamek NG, Jansen JL, Nienhuis J, Triplett EW. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 62:1935-1943.
- Boyer SL, Flechtner VR, Johansen JR. 2001. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* 18:1057-1069.
- Giyanto, 1998. Deteksi *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* dengan teknik PCR-RFLP gen 16S- rRNA. [tesis]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

- Hwang PL, Harsono KD, Shaw PD. 1992. Use of detached soybean cotyledons for testing pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Plant Dis.* 76:182-183.
- Khaeruni A. 2005. Keragaman genetik dan pengembangan metode deteksi cepat penyebab pustul bakteri (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) pada kedelai. [Disertasi]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Lazo GR, Gabriel DW. 1987. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* 44:448-453.
- Marchesi MT, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade GR, 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:795-799
- Mesak FM, Suwanto A, Tjahjono B, Guhardja E. 1994. Modifikasi bioesei kotiledon kedelai untuk uji patogenitas *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *J. Il. Pert. Indon.* 4:77-82.
- Riupassa PA, Suwanto A. 2004. Keragaman genetik bakteri metilotrof fakultatif berpigmen merah muda pada beberapa sayuran lalaban. *Hayati J. Biosains.* 11:153-158
- Rukayadi Y. 1995. Analisis profil DNA genom sejumlah isolat *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* dengan menggunakan elektroforesis gen medan berpulsa (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) [Tesis]. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory manual*. Ed ke-3. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York.
- Schaad NW. 1988. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, Ed ke-2. APS Press. St Paul, Minnesota
- Woese CR, Kandke O, Wheelis ML. 1990. Toward a natural system of organism: Proposal for the domain Archaea, Bacteria, and Eukarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:4576-4579.
- Yuhana, M. 1999. Analisis profil DNA Genom sejumlah isolat vibrio berpendar asal perairan laut dan tambak udang di Indonesia (Tesis). Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Yusuf M, Hala Y, Suwanto A. 2002. Keragaman genetika bakteri tanah dari rizosfer kapas transgenik dan non transgenik di Soppeng, Sulawesi Selatan. *J. Mikrobiol. Indonesia* 7:39-43.