Hayati, Juni 1995, hlm. 28-33
ISSN 0854-8587

Vol. 2, No. 1

Profil DNA Genom *Xanthomonas campestris* dengan Menggunakan *Schizotyping*

(*DNA Profile of Xanthomonas campestris' Genome Employing Schizotyping*)

LILI ROSANA[1], ANTONIUS SUWANTO[1*], BUDI TJAHJONO[2], DAN EDI GUHARDJA[1]

[1] *Jurusan Biologi, FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144*
[2] *Jurusan Hama Penyakit Tumbuhan, Faperta IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144*

Diterima 13 Januari 1995/Disetujui 2 Maret 1995

Schizotyping was employed to reveal unique fingerprints of particular strains or pathovars of *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. Digestion of *X. campestris* pv. *campestris* genomic DNA with each of these restriction endonucleases: *Dra*I, *Ase*I, *Spe*I, *Xba*I, or *Sna*BI generated 15-40 resolvable fragments with molecular size ranging from approximately 15 to 589 kilo base pairs (kb). On the other hand, *Swa*I, *Pac*I, *Pme*I, and I-*Ceu*I were found to digest *X. campestris* pv. *campestris* genomic DNA very infrequently (less than 15 fragments) which will be useful for sizing and physical mapping of the genome. DNA-banding patterns, generated by *Ase*I- or *Spe*I- restriction endonuclease digestion of total genomic DNA, were able to distinguish unambiguously strains of *X. campestris* pv. *glycines* (Nakano) Dyefrom that of *X. campestris* pv. *campestris* and among the strains within *X. campestris* pv. *glycines*. This method has promise for identifying various strains or pathovars within the genus *Xanthomonas* which is extremely important in understanding the epidemiology as well as the molecular basis of pathogenicity of bacterial-pustule disease.

PENDAHULUAN

Spesies *Xanthomonas* telah banyak dikenal sebagai patogen tanaman dan juga untuk keperluan industri, antara lain sebagai penghasil *gum xanthan*. Sebagai patogen tanaman bakteri ini merupakan bakteri yang penting karena dari 180 spesies bakteri yang diketahui menyerang tanaman, kurang lebih sepertiganya merupakan spesies *Xanthomonas* (Sastrosuwigyo, 1988). *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson merupakan spesies yang memiliki patovar terbanyak. Pada mulanya patovar-patovar tersebut dibedakan dengan uji terhadap inangnya (*host test*) (Lelliot dan Stead, 1987). Kini identifikasi patovar-patovar pada *X. campestris* telah banyak dilakukan, antara lain dengan menggunakan: (i) uji serologi, (ii) analisis protein membran, (iii) pertumbuhan koloni pada media agar semiselektif, (iv) uji biokimia, dan (v) *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP) (Schaad, 1988). Meskipun demikian, identifikasi patovar yang berhasil diperoleh dengan cara-cara di atas kurang diskriminatif bila dibandingkan dengan penentuan patovar berdasarkan uji terhadap inangnya.

Masalah yang terjadi tidak hanya pada sulitnya membedakan patovar-patovar tersebut tetapi terjadi pula fenomena bahwa bakteri yang mempunyai morfologi sama dan menyebabkan penyakit yang sama ternyata diberi nama berbeda misalnya: bakteri penyebab pustul adalah *Phaseoli* var. *sojensis* Hedges; *Phytomonas glycines* (Nakano) Magrau; *Phytomonas phaseoli* var. *sojensis* (Hedges) Burkholder; *P. phaseoli* var. *sojensis* (Hedges) Starr dan Burkholder; *Pseudomonas glycines* (Nakano) Elliot; *X. campestris* pv. *glycines* (Nakano) Dye; *X. glycines* (Nakano) Magrou dan Prévot; *X. sojensis* (Hedges) Burkholder; *X. sojae* Fang *et al.* Padahal bakteri tersebut mempunyai ciri fisiologi yang sama, yaitu: koloni pada agar nutrien berbentuk bundar, cembung, licin dan berwarna kuning, sel berbentuk batang tunggal (0.5-0.7 x 1.4-2.3 μm) dengan satu flagela polar. Bakteri ini dapat menghidrolisis gelatin, pati dan kasein (Mortensen, 1990).

Masalah yang telah disebutkan di atas diharapkan dapat diatasi dengan menggunakan *schizotyping* (Suwanto dan Kaplan, 1992). *Schizotyping* merupakan analisis profil DNA genom total, berdasarkan pola pita DNA yang dihasilkan setelah DNA genom utuh dipotong dengan enzim restriksi yang memotong jarang (*rare-cutter*) dan dipisahkan dengan menggunakan *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Selain relatif mudah dalam analisisnya, *schizotyping* sangat akurat dan andal karena: (i) pita-pita DNA yang dihasilkan dapat diketahui ukurannya secara pasti dengan standar molekul DNA linear yang telah ada antara lain: kromosom *Saccharomyces cerevisiae*, atau DNA genom *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 yang dipotong dengan enzim restriksi *Ase*I atau *Spe*I; dan (ii) pita-pita DNA yang dihasilkan membentuk pola yang khas dan unik sehingga merupakan *schizotype*, yaitu suatu bentuk sidik jari dari DNA organisme yang bersangkutan.

* Penulis untuk korespondensi

Penelitian-penelitian yang membandingkan antara *schizotyping* dengan metode-metode lain telah banyak dilakukan, antara lain perbandingan dengan *ribotyping* (Poh *et al.*, 1992; Gordillo *et al.*, 1993), *serotyping, plasmid typing, phage typing*, uji biokimia (Howard *et al.*, 1992), dan bahkan dengan teknik *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) (Saulnier *et al.*, 1993). Dari hasil perbandingan tersebut *schizotyping* dinyatakan lebih diskriminatif dalam membedakan galur-galur bakteri yang diuji dibandingkan dengan metode lain yang dipakai untuk perbandingan galur bakteri selama ini.

Dalam tulisan ini dilaporkan: (i) profil DNA genom *X. campestris* pv. *campestris* yang dicerna dengan berbagai enzim restriksi dan (ii) perbandingan *schizotype* antara *X. campestris* pv. *glycines* dan *X. campestris* pv. *campestris*.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Suspensi Bakteri. *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* dan *X. campestris* pv. *campestris* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan dua patovar dari 125 patovar *X. campestris* yang telah didokumentasikan sampai saat ini (Bradbury, 1984).

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *X. campestris* pv. *campestris* NRRL-B-1459, *X. campestris* pv. *glycines* 8ra (Hwang *et al.*, 1992), dan galur fB1 yang merupakan mutan *X. campestris* pv. *glycines* 8ra (Mesak *et al.*, 1994). Selain itu juga digunakan isolat 1FL yang merupakan isolat asal Darmaga, Bogor yang diisolasi menggunakan metode Schaad (1988) serta telah diuji dengan modifikasi bioasai kotiledon kedelai (Mesak *et al.*, 1994). Masing-masing bak- teri diinokulasikan pada media SNA (agar nutrien ditambah dengan pati 1%). Satu koloni terpisah dari setiap isolat ditumbuhkan dalam 10 ml LB (1% tripton, 1% NaCl dan 0.5% ekstrak khamir) pada suhu 30°C selama 24 jam. Suspensi bakteri dipanen pada konsentrasi sekitar 2 X 10^9 sel/µl. Lima belas menit sebelum panen sel, ke dalam kultur bakteri ditambahkan antibiotik kloramfenikol sebanyak 10 µg/µl untuk sinkronisasi replikasi DNA kromosom.

Penyiapan DNA Genom Utuh dan Pemotongan dengan Enzim Restriksi. Suspensi bakteri sebanyak satu mililiter disentrifugasi pada 5000 putaran per menit (rpm) selama 30 detik. Endapan yang diperoleh dicuci dengan larutan PIV (10 ml Tris-HCl, pH 7.5; 1M NaCl), kemudian disentrifugasi dengan kondisi yang sama dan endapannya disuspensikan kembali dengan menambahkkan 0.5 µl larutan PIV. Suspensi bakteri yang diperoleh ditambahi dengan 0.8 ml *low melting point agarose* (LMA) 1.5% dalam larutan TE (10 mM Tris-HCl dan 1 mM EDTA, pH 8.0). Campuran tersebut dicetak dan didinginkan dalam cetakan *agar plug* selama 10 menit pada suhu 4°C. Blok agarose (20 mm x 10 mm x 1 mm) yang diperoleh yang selanjutnya disebut gel sisipan, direndam dalam larutan EC (6 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM EDTA; 1 M NaCl; 0.5% *polyethylene-2-cetyl ether*; 0.2% natrium deoksikolat; 0.5% natrium lauril sarkosin yang ditambahi lisozim 1 µg/µl) sebanyak 4-5 kali volume gel sisipan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan penggoyangan lemah, yaitu dengan kecepatan sekitar 50-60 rpm. Pada inkubator bergoyang (*reciprocal shaking bath precision*). Larutan EC diganti dengan larutan ESP (0.5M EDTA, pH 9.0-9.5; 1% natrium lauril sarkosin dan 200 µg/ml proteinase-K) sebanyak 2-3 kali volume gel sisipan, lalu diinkubasi pada suhu 55°C selama 48 jam dengan penggoyangan lemah. Selanjutnya gel sisipan dicuci dengan mengganti larutan ESP dengan larutan TE sebanyak 5-8 kali volume gel sisipan, lalu digoyang lemah pada suhu 37°C selama 30 menit. Pencucian dilanjutkan dengan larutan TE yang baru dan diinkubasi pada kondisi yang sama selama dua jam. Proses pencucian ini diulang tiga kali. Gel sisipan yang telah mengandung DNA utuh (*insert*) disimpan dalam larutan TE pada 4°C sampai saatnya digunakan (Smith dan Cantor, 1987; Poh *et al.*, 1992).

Pemotongan DNA genom dalam matriks agarose dengan enzim restriksi dilakukan mengikuti metode Suwanto dan Kaplan (1989): ke dalam tabung mikro 1.5 ml dimasukkan 150 µl satu kali larutan penyangga restriksi yang terdiri dari 1335 µl akuades atau akuabides steril ditambah dengan 150 µl sepuluh kali larutan penyangga restriksi dan 15 µl *bovine serum albumin* (BSA), khusus untuk enzim restriksi I-*Ceu*I digunakan 15 µl BSA yang telah diasetilasi (AcBSA). Untuk setiap potong gel sisipan ditambahi enzim restriksi sebanyak 8-15 Unit (U), kecuali *Dra*I menggunakan sebanyak 30-35 U. Larutan penyangga enzim restriksi dan enzim restriksi yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1. *Insert* didiamkan dalam 150 µl satu kali larutan penyangga restriksi selama 15 menit pada suhu 4°C, larutan penyangga tersebut kemudian diganti dengan larutan penyangga restriksi yang baru sebanyak 150 µl, lalu ditambahi enzim restriksi yang sesuai. Campuran ini diinkubasi pada suhu 4°C selama 15 menit hingga ada kesempatan bagi enzim untuk berdifusi ke dalam gel sisipan. Inkubasi dilanjutkan pada suhu yang sesuai (Tabel 1) di dalam penangas air bergoyang selama 8-12 jam. Setelah itu campuran larutan penyangga dan enzim restriksi diganti dengan 150 µl larutan ES (larutan ESP tanpa proteinase-K) selama 10 menit pada suhu 55°C. Larutan ES diganti dengan larutan TE sebanyak 1.5 ml selama 15 menit atau lebih, sisipan dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel pelari (*running gel*).

Tabel 1. Enzim Restriksi, Larutan Penyangga Restriksi, Situs Pemotongan, dan Suhu Optimumnya yang Digunakan dalam Percobaan

Enzim Restriksi	Larutan Penyangga	Situs Pemotongan	Suhu
*Dra*I	NEB 3[a]	5'TTT/AAA3'	37°C
*Ase*I	NEB 3[a]	5'AT/TAAT3'	37°C
*Spe*I	NEB 1[a]	5'A/CTAGT3'	37°C
*Xba*I	NEB 2[a]	5'T/CTAGA3'	37°C
*Ssp*I	React 6[b]	5'AAT/ATT3'	37°C
*Nhe*I	React 4[b]	5'G/CTAGC3'	37°C
*Hind*III	React 2[b]	5'A/AGCTT3'	37°C
*Sna*BI	NEB 4[a]	5'TAC/GTA3'	37°C
*Xho*I	NEB 2[a]	5'C/TCGAG3'	37°C
*Swa*I	Buffer H[c]	5'ATTT/AAAT3'	25°C
*Pac*I	NEB 1[a]	5'TTAAT/TAA3'	37°C
*Pme*I	NEB 4[a]	5'GTTT/AAAC3'	25°C
*I-Ceu*I	I-CeuIbuffer[a]	5''TAACTATAACGG TCCTAA/GGTAG CGA3'	37°C

[a] New England Biolabs, Inc., Beverly, MA
[b] Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD
[c] Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Germany

Pulsed-Field Gel Electrophoresis **(PFGE).** Gel agarose untuk elektroforesis (gel pelari) dibuat dengan melarutkan ***high melting agarose*** (HMA) dalam 0.5 x TBE (50 mM Tris-Borat buffer, 0.1 mM EDTA). Gel sisipan dimasukkan dalam sumur-sumur yang sesuai pada gel pelari, kemudian sumur tersebut ditutup dengan 1.5 % LMA dalam 1 x TE. Elektroforesis dilakukan dalam piranti PFGE, sistem CHEF DRII (Biorad, Richmond, CA) menggunakan 0.5 kali larutan penyangga TBE dengan tegangan listrik 180 volt, sedangkan waktu pulsa (tp), konsentrasi gel agarose, dan lama elektroforesis (rt) bervariasi bergantung pada optimasi pemisahan. Suhu larutan penyangga selama elektroforesis diatur pada suhu 14°C.

Gel hasil elektroforesis diwarnai dengan merendamnya dalam larutan etidium bromida (1 µg/ml) selama 10 menit dan membilasnya dengan akuades selama 20-30 menit. Gel hasil elektroforesis diamati di bawah sinar *ultra violet* (UV) dengan panjang gelombang 280 nm. Dokumentasi hasil dilakukan dengan menggunakan kamera polaroid (Hoefer's Photoman, DS 34 polaroid, San Francisco, CA) dengan filter jingga untuk menyaring sinar UV sehingga diperoleh foto dokumentasi hitam-putih.

HASIL

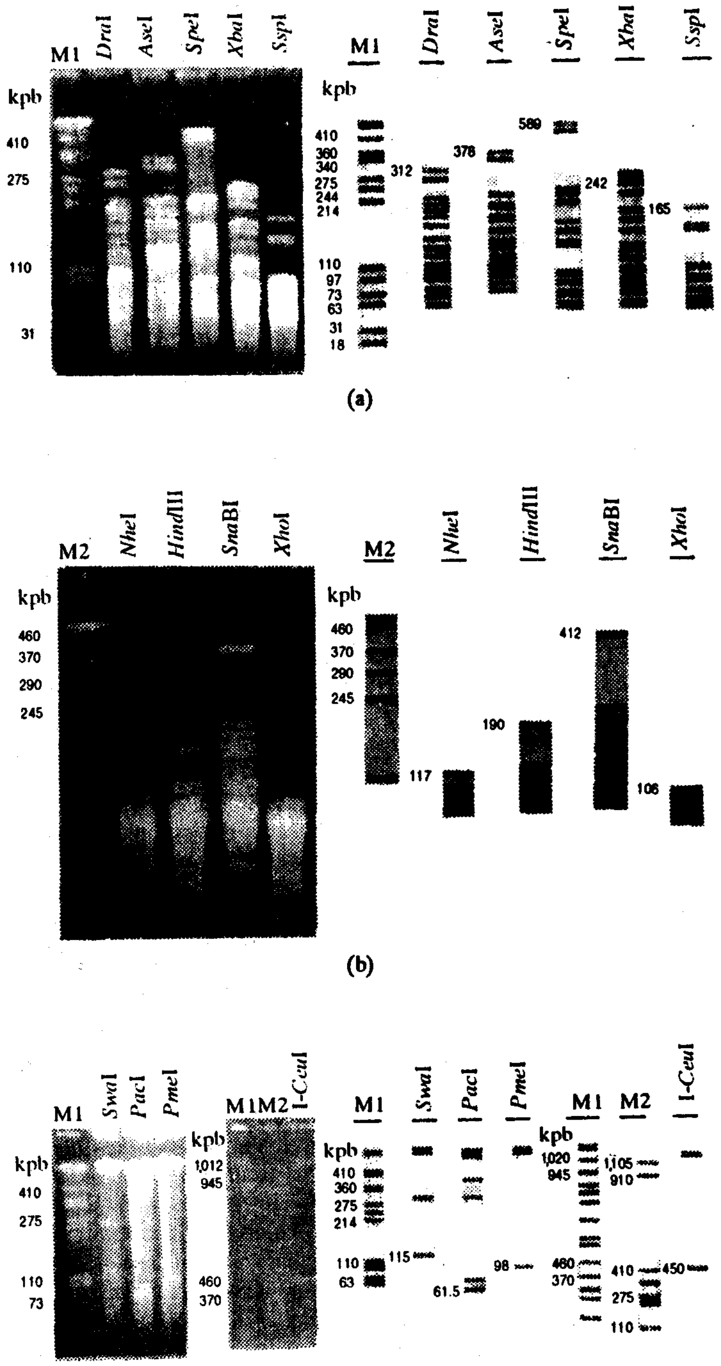
Hasil Elektroforesis DNA Genom *X. campestris* pv. *campestris* dengan Menggunakan Berbagai Macam Enzim Resriksi. Kondisi elektroforesis yang digunakan dalam elektroforesis *X. campestris* pv. *campestris* NRRL-B-1459 (Gambar 1) sebagai berikut: (A) tp 5-30 detik, rt 16 jam, tegangan listrik 180 volt, dan 1% agarose; (B) tp 5-30 detik, rt 15 jam, tegangan listrik 180 volt, dan 1% gel agarose; (C) tp 5-40 detik, rt 16 jam, tegangan listrik 180 volt, dan 1% gel agarose, kecuali I-*Ceu*I pada tp 100-100 detik, rt 24 jam, tegangan listrik 180 volt, dan 0.9% gel agarose.

Dari hasil di atas digolongkan tiga macam enzim restriksi yaitu: enzim restriksi yang memotong sering, sedang, dan sangat jarang (Tabel 2).

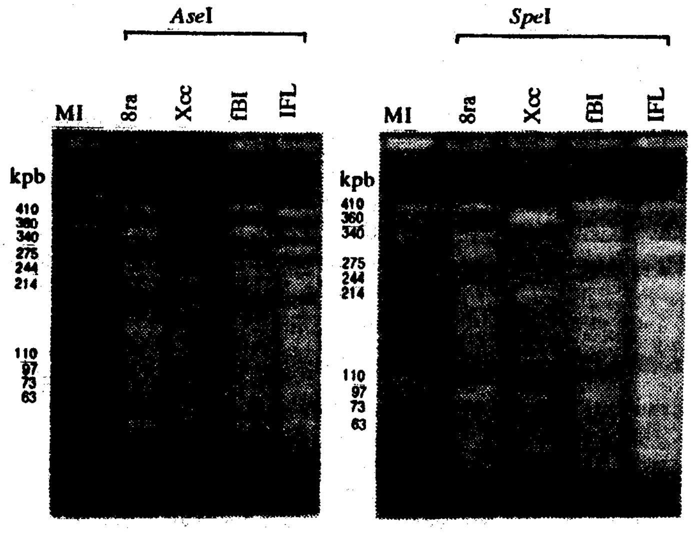
Hasil Elektroforesis Perbandingan Isolat *X. campestris*. Dalam elektroforesis untuk perbandingan isolat *X. campestris* dengan mengunakan enzim restriksi *Ase*I dan *Spe*I (Gambar 2) digunakan kondisi elektroforesis seperti kondisi A pada Gambar 1.

Tabel 2. Penggolongan Enzim Restriksi yang Digunakan Berdasarkan Jumlah dan Ukuran Fragmen DNA yang Dihasilkan dari Genom *X. campestris* pv. campestris NRRL-B-1459

Golongan Enzim Restriksi	Sering (*frequent-cutter*)		Sedang (*medium-cutter*)		Sangat Jarang (*rare-cutter*)	
Perkiraan jumlah fragmen	> 40		15-40		< 15	
	Enzim Restriksi	kpb	Enzim Restriksi	kpb	Enzim Restriksi	kpb
Perkiraan ukuran fragmen	*Ssp*I *Hind*III *Nhe*I *Xho*I	<165 <190 <117 <106	*Dra*I *Ase*I *Spe*I *Xba*I *Sna*BI	<312 <378 <589 <242 <412	*Swa*I *Pac*I *Pme*I *I-Ceu*I	115.0-1000 61.5-1000 98.0-1000 450.0-1000



Gambar 1. Pemotongan DNA Genom *X. campestris* pv. *campestris* NRRL-B-1459 dengan Berbagai Enzim Restriksi dengan Kondisi Elektroforesis: (a) tp 5-30 detik, rt 16 jam, tegangan listrik 180 volt, dan 1% gel agarose, (b) tp 5-40 detik, rt 16 jam, tegangan listrik 180 volt, dan 1% gel agarose, (c) tp 5-30 detik, rt 15 jam, tegangan listrik 180 volt, dan 1% gel agarose. Standar Ukuran Molekul DNA yang Digunakan: DNA Genom *R. sphaeroides* 2.4.1 Dipotong dengan *Ase*I (M1) dan Kromosom *S. cerevisiae* (M2). Gambar Disebelah Kanan Menunjukkan Interpretasi Hasil Elektroforesis



Gambar 2. Perbandingan *X. campestris* pv. glycines 8ra (8ra), *X. campestris* pv. campestris NRRL-B-1459 (Xcc), Isolat fB1, dan Isolat 1FL dengan Enzim Restriksi *Ase*I dan *Spe*I. Standar Ukuran Molekul DNA yang Digunakan ialah DNA Genom *R. sphaeroides* 2.4.1. yang Dipotong dengan *Ase*I (M1)

PEMBAHASAN

Profil DNA Genom *X. campestris* pv. *campestris* dengan Berbagai Enzim Restriksi. Pemotongan DNA genom dengan enzim restriksi yang berbeda akan menghasilkan potongan DNA yang berbeda dari DNA yang sama (Grinsted dan Bennett, 1988). *Schizotyping* dalam percobaan ini dimulai dengan penentuan enzim restriksi yang sesuai (Smith dan Condemine, 1990), yaitu berdasarkan: (i) persentase mol (G+C) DNA genom bakteri; (ii) jumlah basa yang dikenali oleh enzim restriksi; (iii) situs enzim restriksi yang memotong sekuen kodon awal atau kodon akhir. Menurut Bradbury (1984) persentase mol (G+C) DNA genom *X. campestris* dilaporkan antara 63-71%. Oleh karena itu dapat diharapkan situs pemotongan enzim restriksi yang mengenali sekuen kaya dengan A (adenin) dan T (timin) dapat memotong jarang DNA genom *X. campestris*.

Enzim restriksi yang digunakan dalam percobaan ini terdiri dari enzim-enzim yang mempunyai situs pemotongan heksanukleotida atau oktanukleotida. Khusus enzim restriksi I-*Ceu*I mempunyai situs pemotongan 26-pb (pasangan basa). Semakin banyak jumlah basa yang dikenali enzim restriksi maka semakin sedikit situs yang dikenalinya pada DNA genom sehingga semakin sedikit fragmen-fragmen DNA yang dihasilkan. Situs enzim restriksi yang mengandung kodon awal (ATG) dan kodon akhir (TAG, TGA, atau TAA) diharapkan dapat memotong DNA genom dengan jarang. Smith dan Condemine (1990) melaporkan enzim restriksi yang berisi kodon akhir TAG menghasilkan potongan yang jarang pada kromosom *Escherichia coli*. *Spe*I, *Xba*I, dan *Nhe*I merupakan enzim yang mengenali sekuen DNA yang mengandung kodon akhir TAG, sedangkan *Dra*I, *Ase*I, *Swa*I, *Pac*I, dan *Pme*I merupakan enzim yang mengenali sekuen DNA yang mengandung kodon akhir TAA (Tabel 1).

Menurut Weinstock (1994) perbedaan sebaran situs pemotongan enzim restriksi juga dapat disebabkan oleh perbedaan di dalam metilasi DNA. Para peneliti menyetujui pernyataan di atas karena dua hal, yaitu: (i) enzim restriksi dihasilkan oleh bakteri untuk mendegradasi DNA fage sebelum bakteriofage bereplikasi dan membentuk fage baru, sedangkan DNA bakteri itu sendiri tidak terdegradasi karena DNA tersebut mengalami metilasi yang mencegah pemotongan oleh enzim restriksi yang dihasilkannya (Brown, 1987); (ii) adanya hasil pemotongan enzim restriksi terkadang sulit dijelaskan, misalnya enzim restriksi *Sna*BI tidak mengenali sekuen yang kaya dengan A dan T tetapi dapat memotong jarang DNA genom *X. campestris* (hasil percobaan ini) dan *R. sphaeroides* (Suwanto and Kaplan, 1989) yang persentase mol (G+C)nya tinggi.

Enzim restriksi *Dra*I dan *Ase*I mempunyai situs pemotongan yang hanya terdiri atas A dan T serta mengandung kodon akhir TAA. Enzim-enzim ini berturut-turut menghasilkan 10 dan 6 pita DNA yang terpisah dengan baik dengan waktu pulsa *ramping* 5-30 detik selama 16 jam. Potongan DNA terbesar pada *Dra*I sekitar 312 kpb (kilo pasangan basa), sedangkan *Ase*I sekitar 378 kpb. Meskipun demikian, enzim restriksi *Ssp*I yang juga hanya mempunyai situs pemotongan yang terdiri dari A dan T ternyata menghasilkan potongan DNA lebih kecil yaitu kurang dari 165 kpb. Pita-pita DNA hasil pemotongan dengan *Ssp*I terlalu banyak sehingga membentuk olesan (*smear*) dengan kondisi yang sama dengan *Dra*I dan *Ase*I. Ini berarti *Ssp*I memotong sering DNA genom *X. campestris* pv. *campestris* (Gambar 1 dan Tabel 2). Pemotongan DNA genom *R. sphaeroides* dan *Caulobacter crecentus* yang persentase mol (G+C)nya antara 67-70 dengan enzim *Ssp*I juga tergolong sering (Suwanto dan Kaplan, 1989). Hal ini mungkin karena dalam produksinya *Ssp*I banyak terkontaminasi oleh nuklease nonspesifik (Smith dan Condemine, 1990). Untuk *X. campestris* pv. *campestris* pemotongan yang sering dapat pula disebabkan karena sekuen yang dikenali oleh *Ssp*I tidak mengandung kodon akhir TAA, seperti pada *Dra*I dan *Ase*I. Leblond *et al.* (1990) melaporkan bahwa *Ssp*I sering menghasilkan pemotongan DNA yang tidak sempurna (*partial digestion*) sehingga tidak dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut. Walaupun demikian pemilihan enzim restriksi berdasarkan persentase mol (G+C) dari DNA genom akan membantu memperkecil jumlah pilihan enzim restriksi yang akan diuji (Suwanto dan Kaplan, 1989).

Enzim restriksi *Swa*I, *Pme*I, dan *Pac*I tidak hanya mengenali sekuen DNA yang kaya akan A dan T, tetapi jumlah basa yang dikenali juga lebih banyak (oktanukleotida) serta mengenali kodon akhir TAA. Oleh karena itu ukuran fragmen DNA terkecil yang dihasilkan dari pemotongan DNA genom dengan *Swa*I, *Pac*I, dan *Pme*I berturut-turut adalah 115, 61.5, dan 98 kpb. Pada kondisi waktu pulsa *ramping* 5-40 detik dan lama elektroforesis 16 jam, *Swa*I, *Pac*I, dan *Pme*I masing-masing hanya menghasilkan 2, 3, dan 1 pita DNA yang terpisah. Enzim I-*Ceu*I adalah endonuklease turunan intron grup I dari *Chlamydomonas eugametos* yang mempunyai situs pemotongan 26-pb dan merupakan sekuen DNA yang biasanya terdapat di dalam sekuen DNA subunit besar (Liu *et al.*, 1993). Enzim restriksi I-*Ceu*I memotong sangat jarang DNA genom *X. campestris* pv. *campestris*. Potongan DNA terkecil dari pemotongan DNA genom *X. campestris* pv. *campestris* oleh I-*Ceu*I panjangnya sekitar 450 kpb (Gambar 1 dan Tabel 2).

Enzim restriksi *Spe*I, *Xba*I, dan *Nhe*I merupakan enzim-enzim yang mengenali sekuen heksanukleotida yang mengandung kodon akhir (TAG). Dari hasil elektroforesis dengan waktu pulsa *ramping* 5-30 detik selama 16 jam, ternyata *Spe*I dan *Xba*I menghasilkan 10 dan 11 pita DNA yang terpisah. Pita DNA terbesar untuk *Spe*I dan *Xba*I masing-masing berukuran 589 dan 242 kpb. Enzim restriksi *Nhe*I memotong DNA genom dengan sering, walaupun enzim restriksi ini mengenali kodon akhir TAG (Gambar 1 dan Tabel 2). Hal ini mungkin karena basa lain yang dikenali pada situs pemotongan *Nhe*I adalah G dan C (Tabel 1).

Dalam percobaan ini tidak hanya dipilih enzim restriksi yang mempunyai situs pemotongan yang mengenali sekuen yang kaya A dan T saja, tetapi enzim restriksi seperti *Sna*BI, *Hin*dIII, dan *Xho*I juga dilihat kemungkinannya untuk *schizotyping*. Enzim restriksi *Sna*BI menghasilkan 11 pita DNA terpisah dengan fragmen terbesar sekitar 412 kpb pada kondisi waktu pulsa *ramping* 5-30 detik selama 15 jam. Enzim restriksi *Sna*BI juga diketahui memotong sangat jarang pada DNA genom *R. sphaeroides* dibanding enzim restriksi lain yang digunakan, yaitu: *Dra*I, *Ase*I, dan *Spe*I (Suwanto dan Kaplan, 1989). Hal ini diduga karena berhubungan dengan adanya metilasi DNA genom atau dapat juga terjadi karena susunan pasangan basa (5'TAC/GTA3') secara kebetulan jarang terdapat pada DNA genom *X. campestris* pv. *campestris* dan *R. sphaeroides*. Pada kondisi yang sama dengan *Sna*BI, enzim restriksi *Hin*dIII dan *Xho*I ternyata memotong sering DNA genom *X. campestris* pv. *campestris* (Gambar 1 dan Tabel 2).

Dengan diketahuinya *schizotype* dari berbagai enzim restriksi maka akan memudahkan analisis lebih lanjut. Menurut Grinsted dan Bennett (1988) pemilihan enzim restriksi yang digunakan bergantung pada DNA yang dianalisis dan tujuan dari pemotongan DNA.

Enzim restriksi yang baik digunakan untuk identifikasi dan perbandingan patovar-patovar *X. campestris* ialah *Spe*I, *Ase*I, *Dra*I, *Xba*I, dan *Sna*BI karena pita DNA yang dapat dibandingkan cukup banyak (6-11 pita) dan penyebaran ukuran potongan DNAnya merata. Enzim restriksi *Swa*I, *Pme*I, *Pac*I, dan I-*Ceu*I dapat digunakan untuk menentukan ukuran genom *X. campestris* karena enzim-enzim ini memotong DNA genom sangat jarang. Sedangkan *Xho*I dan *Hin*dIII mungkin lebih baik untuk analisis molekular yang diikuti dengan hibridisasi DNA seperti *ribotyping* atau analisis *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Saulnier *et al*, 1993)

Perbandingan *Schizotype X. campestris* pv. *glycines* dengan *X. campestris* pv. *campestris*. Hasil elektroforesis dengan menggunakan enzim restriksi *Ase*I dan *Spe*I menunjukkan perbedaan dengan jelas perbedaan antara *X. campestris* pv. *glycines* 8ra dan *X. campestris* pv. *campestris* NRRL-B-1459. Hal ini ditunjukkan oleh pola pita DNA hasil pemotongan yang sangat spesifik dan unik pada keduanya (Gambar 2). Kedua patovar bakteri tersebut telah diketahui mempunyai penampilan fenotipe dan karakter fisiologi yang sama, perbedaannya hanya pada jenis tanaman inangnya. *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* adalah patovar *X. campestris* yang menyebabkan penyakit bisul bakteri pada kedelai (Sinclair dan Backman, 1989). Sedangkan *X. campestris* pv. *campestris* menyebabkan penyakit busuk hitam pada kubis (Tang *et al.*, 1987). *Schizotyping* menunjukkan struktur genom antara kedua patovar *X. campestris* berbeda. Perbedaan pada genom ini dapat diakibatkan oleh *rearrangement* pada plasmid atau kromosom karena proses delesi, inversi, translokasi atau penyisipan. *Genome rearrangement* merupakan hal yang sering terjadi dan merupakan bagian dari daur hidup normal dari berbagai macam organisme (Suwanto, 1994).

Hasil elektroforesis DNA genom *X. campestris* pv. *glycines* 8ra dan isolat fB1 yang dipotong dengan *Ase*I dan *Spe*I tampak sama (Gambar 2). Isolat fB1 merupakan isolat yang diperoleh dari koloni pada *plate mating* hasil konjugasi *X. campestris* pv. *glycines* 8ra sebagai resipien dengan *E. coli* S17-1 (pJFF350) (Fellay *et al.*, 1989) sebagai donor untuk memperoleh bakteri nonpatogen dari *X. campestris* pv. *glycines*. Koloni rekombinan hasil konjugasi (transkonjugan) yang diharapkan ialah *X. campestris* pv. *glycines* 8ra yang genomnya telah mendapat sisipan turunan IS*1* (Omegon-Km). Penelitian pendahuluan telah menunjukkan bahwa *X. campestris* pv. *glycines* 8ra resisten terhadap antibiotik rifampisin (50 μg/ml) tetapi tidak pada kanamisin (25 μg/ml). Transkonjugan yang diperoleh bersifat resisten baik terhadap rifampisin dan kanamisin. Perubahan yang terjadi diharapkan dapat dilihat dengan *schizotyping*. Akan tetapi, ternyata pola pita yang diperoleh sama pada *X. campestris* pv *glycines* 8ra dan isolat fB1. Pola pita yang sama tersebut dapat disebabkan oleh dua hal yaitu: (i) koloni yang diambil sebagai hasil konjugasi bukan merupakan transkonjugan tetapi merupakan koloni yang tumbuh karena *X. campestris* pv. *glycines* mengalami mutasi spontan sehingga resisten terhadap kanamisin, (ii) Omegon-Km tidak mempunyai situs *Ase*I atau *Spe*I sehingga perubahan fragmen DNA hanya dapat diamati dari bertambah besarnya ukuran fragmen DNA yang disisipi Omegon-Km (sekitar 2 kpb). Perbedaan ini mungkin saja tidak teramati dari hasil elektroforesis dengan PFGE, terutama bila Omegon-Km menyisip pada fragmen yang relatif besar.

Perbandingan DNA genom *X. campestris* pv. *glycines* 8ra dan 1FL dengan enzim restriksi *Spe*I menunjukkan hasil yang serupa, sedangkan dengan *Ase*I memberikan hasil yang lebih berbeda. Meskipun demikian perbedaan ini lebih kecil dibandingkan bila *schizotype* dari *X. campestris* pv. *glycines* 8ra dibandingkan dengan *X. campestris* pv. *campestris* (Gambar 2). Perbedaan kedua isolat *X. campestris* pv. *glycines* dapat terjadi karena asal atau lokasi pengambilan contoh isolat tersebut. Tampaknya perbedaan yang terdapat pada DNA genom *X. campestris* pv. *glycines* tidak berpengaruh pada patogenisitas terhadap tanaman inangnya. Perbedaan pola pita DNA tersebut mungkin disebabkan oleh mutasi titik atau translokasi pada situs enzim restriksi yang digunakan, seperti yang telah terjadi pada DNA genom galur-galur *Lactococcus* (Tanskanen *et al.*, 1990).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari dana Riset Unggulan Terpadu (RUT-I) kepada AS melalui Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia dengan nomor kontrak 60/SK/PRT/93.

DAFTAR PUSTAKA

Bradbury, J.F. 1984. *Xanthomonas*, p. 199-209. *In* N.P. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriologi*, Vol 1. London: Williams and Wil kins.

Brown, T.A. 1987. *Gene Cloning an Introduction*. England: Van Nostrand Reihold.

Fellay, R., H.M. Krisch, P. Prentki, and J. Frey. 1989. Omegon-Km : a Transposable Element Disigned for *in vivo* Insertional Mutagenesis and Cloning of Genes in Gram-Negative Bacteria. *Gene* **76**:215-226.

Grinsted, J. and P.M. Bennett. 1988. Analysis of Plasmid DNA with Restriction Endonucleases. *Method Microbiol.* **21**:143-153.

Gordillo, M.E., K.V. Singh, and B.E. Murray. 1993. Comparison of Ribotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Subspecies Differentiation of Strain of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1430-1434.

Howard, P.L., K.D. Harsono, and J.B. Luchansky. 1992. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, and *Listeris seeligeri* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:709-712.

Hwang, I., S.M. Lim, and P.D. Shaw. 1992. Use of Detached Soybean Cotyledons for Testing Pathogenicity of *Xanthmonas campestris* pv. *glycines*. *Plant Dis.* **76**:182-183.

Leblond, P., F.X. Francou, J-M. Simonet, and B. Decaris. 1990. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of the Genome of *Streptomyces ambofaciens* Strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**:79-88.

Lelliot, R.A. and D.E. Stead. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants.* London: Blackwell Scientific Publications.

Liu, S-L., A. Hessel, and K.E. Sanderson. 1993. The *XbaI-BlnI-CeuI* Genomic Cleavage Map of *Salmonella typhimurium* LT2 Determined by Double Digestion, End Labeling, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Bacteriol.* **175**:4104-4120.

Mesak, F.M., A. Suwanto, B. Tjahjono, dan E. Guhardja. 1994. Bioesei Patogenesis dan Transposisi Elemen Loncat pada *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. J. Il. Pert. Indon. 4(2):77-82.

Mortensen, C.N. 1990. *Selected Bacterial Diseases of Soybean, Mungbean, and Rice and Seed Health Testing Methods*. Copenhagen: Danish Goverment Institute of Seed Pathology for Developing Countries.

Poh, C.L., C.C. Yeo, L. Tay. 1992. Genome Fingerprinting by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Ribotyping to Differentiate *Pseudomonas aeruginosa* Serotype 011 Strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**:817-822.

Sastrosuwigyo, A. 1988. *Diktat Dasar-dasar Perlindungan Tanaman*. Bogor: Jurusan HPT Fakultas Pertanin IPB.

Saulnier, P., C. Bourneix, G. Prévost, and A. Andremont. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA Assay is Less Discriminant than Pulsed-Field Gel Elctrophoresis for Typing Strains of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *J. Clin. Microbiol.* **31**:982-985.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. *2nd ed. St. Paul, Minesota: APS Press.*

Sinclair. J.B. and P.A. Backman. 1989. *Compendium of Soybean Diseases.* 3rd ed. St Paul, Minesota: APS Press.

Smith, C.L. and C.R. Cantor. 1987. Purification, Specific Fragmentation and Separation of Large DNA Molecules. *Methods Enzymol.* **155**:449-467.

Smith, C.L. and G. Condemine. 1990. New Approaches for Physical Mapping of Small Genomes. *J. Bacteriol.* **172**:1167-1172.

Suwanto, A. and S. Kaplan. 1989. Physical and Genetic Mapping of Rhodobacter sphaeroides 2.4.1. Genome: Genome Size, Fragment Identification, and Gene Localization. *J. Bacteriol.* **171**:5840- 5849.

Suwanto, A. and S. Kaplan. 1992. Chromosome Transfer in *Rhodobacter spheroides:* Hfr Formation and Genetic Evidence for Two Unique Circular Chromosome. *J. Bacteriol.* **174**:1135-1145.

Suwanto, A. 1994. Pulsed-Field Gel Electrophoresis: a Revolution in Microbial Genetics. AsPac. *J. Mol. Biol. Biotechnol.* **2**:78-85.

Tang, L., D.L. Gough, C.E. Barber, J.M. Dow, and M.J. Daniel. 1987. Molecular Cloning of Protease Gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris:* Expression in E. coli and Role in Pathogenicity. *Mol. Gen. Genet.* **210**:443-448.

Tanskanen, E.I., D.L. Tulloch, A.J. Hillier, and B.E. Davidson. 1990. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *SmaI* Digest of Lactococcal Genomic DNA, a Novel Method of Strain Identification. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3105-3111.

Weinstock, G.M. 1994. Bacterial Genome: Mapping and Stability. *ASM News* **60**:73-78.