19

Jurnal Bioteknologi Pertanian, Vol. 5, No. 2, 2000, pp. 70-76

Skisotipe bakteri bintil akar kedelai berdasarkan analisis *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

Schizotype of soybean root nodule bacteria based on Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis

Dwi Ningsih Susilowati[1], Rasti Saraswati[1], Antonius Suwanto[2], dan Aris Tjahjoleksono[2]

[1]*Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Jalan Tentara Pelajar No. 3A Bogor 16111, Indonesia*
[2]*Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran Bogor 16144, Indonesia*

ABSTRACT

The application of root nodule bacteria in field faced constraint of inconsistency of its effectivity. The experiment was conducted to characterize 43 superior strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Sinorhizobium fredii* from Indonesia based on schizotyping by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Schizotyping requires a technique to isolate an intact genomic DNA, the rare-cutting restriction endonucleases, appropriate molecular size markers, and electrophoresis unit. Results indicated that this technique could separate DNA fragments of soybean root nodule bacteria efficiently which had a similarity of physiological and morphological characteristics. By using this technique, 23 strains of *B. japonicum* consisted of 19 *Spe*I-schizotype and 20 strains of *S. fredii* comprised of 13 *Spe*I-schizotype.

[*Keywords*: Schizotype, root nodule bacteria, PFGE]

ABSTRAK

Bakteri bintil akar dapat dimanfaatkan sebagai pupuk hayati, tetapi dalam penerapannya di lapang menghadapi masalah adanya inkonsistensi efektivitas bakteri tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi terhadap 43 galur *Bradyrhizobium japonicum* dan *Sinorhizobium fredii* dari beberapa daerah sentra produksi kedelai di Indonesia berdasarkan analisis *schizotyping* menggunakan *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE). *Schizotyping* memerlukan suatu teknik isolasi DNA genom secara utuh, enzim restriksi pemotong jarang, standar ukuran molekul berukuran besar, dan perangkat elektroforesis yang mampu memisahkan fragmen-fragmen DNA berukuran besar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *schizotyping* mampu melakukan pemisahan secara spesifik fragmen-fragmen DNA bakteri bintil akar kedelai yang secara fisiologis dan morfologis sama. Sebanyak 23 galur *B. japonicum* dapat dibedakan menjadi 19 skisotipe-*Spe*I, sedangkan 20 strain *S. fredii* terdiri atas 13 skisotipe-*Spe*I.

[*Kata kunci*: Skisotipe, bakteri bintil akar, PFGE]

PENDAHULUAN

Bakteri bintil akar memiliki andil yang cukup besar dalam meningkatkan produktivitas pertanian, terutama tanaman kacang-kacangan. Pemanfaatan bakteri bintil akar sebagai bahan aktif pupuk hayati dapat meningkatkan efisiensi pemupukan berbasis nitrogen (N). Menurut Somasegaran dan Halliday (1982), bakteri bintil akar yang efektif pada bintil akar tanaman kacang-kacangan mampu memenuhi seluruh atau sebagian kebutuhan nitrogen tanaman. Penambatan nitrogen secara biologis oleh bakteri bintil akar merupakan sumber nitrogen termurah bagi tanaman, sehingga bakteri ini banyak dimanfaatkan sebagai pupuk hayati.

Pemanfaatan inokulan bakteri bintil akar terkadang mengalami kegagalan sebagai akibat lebih tingginya daya saing populasi bakteri bintil akar *indigenous* daripada yang diintroduksikan. Di samping itu, dijumpai adanya permasalahan tidak konsistennya efektivitas bakteri, yaitu bakteri bintil akar yang efektif di suatu lokasi pertanaman kacang-kacangan ternyata belum tentu efektif pada lokasi pertanaman yang lain. Untuk mengatasi hal tersebut, beberapa peneliti mendekati permasalahan ini dengan melakukan karakterisasi populasi bakteri bintil akar *indigenous*.

Metode *schizotyping* sering digunakan untuk karakterisasi sejumlah galur bakteri, di antaranya *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 (Sobral *et al*., 1990), *Chlamidia trachomatis* serovar L2 (Birkelund dan Stephens, 1992), dan *Listeria monocytogenes* serovar 4b (Brosch *et al*., 1991). Definisi *schizotyping* ialah analisis total DNA genom yang dipotong dengan enzim restriksi pemotong jarang (*rare cutting restriction endonucleases*) dan dipisahkan dengan perangkat elektroforesis berupa *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (Suwanto dan Kaplan, 1992). Profil potongan

DNA genom yang diperoleh dari analisis *schizotyping* dinamakan skisotipe.

Tujuan penelitian ini ialah mengelompokkan bakteri bintil akar kedelai yang diisolasi dari beberapa daerah sentra produksi kedelai di Indonesia berdasarkan skisotipenya. Informasi skisotipe dapat digunakan baik untuk mempelajari hubungan kekerabatan antar-galur maupun untuk dasar penelitian perbaikan mutu genetik galur dalam rangka peningkatan kualitas pupuk hayati.

BAHAN DAN METODE

Galur bakteri dan medium pertumbuhan

Galur bakteri bintil akar kedelai yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dan diseleksi dari beberapa daerah sentra produksi kedelai di Indonesia (Tabel 1). Medium pertumbuhan untuk bakteri ini ialah sari khamir manitol (SKM) yang terdiri atas: 0,5 g/l K_2HPO_4; 0,2 g/l $MgSO_4.7H_2O$; 10 g/l manitol; dan 0,5 g/l ekstrak khamir.

Tabel 1. Tanaman inang (kedelai), jenis tanah, dan daerah asal galur-galur *B. japonicum* dan *S. fredii*.
Table 1. Host plant, soil type, and original area of B. japonicum *and* S. fredii *strains.*

Kode Isolat *Isolate code*	Varietas kedelai *Soybean variety*	Jenis tanah *Soil type*	Daerah asal *Original area*
R2	Lokal	Regosol	Wanaraja, Garut, Jawa Barat
R59	Lokal	Andosol	Banyulangu, Cirebon, Jawa Barat
R61	Lokal	Andosol	Banyulangu, Cirebon, Jawa Barat
Pcj-6	Lokal	PMK	Cigudeg, Jasinga, Jawa Barat
IA1	Lokal	PMK dan Latosol	Purbawangi, Banyumas, Jawa Tengah
IA2	Lokal	PMK dan Latosol	Purbawangi, Banyumas, Jawa Tengah
NID	Lokal	PMK dan Latosol	Purbawangi, Banyumas, Jawa Tengah
2A	Wilis	Aluvial	Legok, Pasuruan, Jawa Timur
12Bx	Wilis	Aluvial	Pondan, Mojosari, Jawa Timur
15C	Lokal	Aluvial	Poh Kecik, Mojosari, Jawa Timur
16D	Wilis	Aluvial	Kp. Mojosari, Jawa Timur
N20C	Wilis	Grumusol	Sambirobyong, Ngawi, Jawa Timur
22A	Lokal	Grumusol	Kp. Ngawi, Jawa Timur
L1A	Lokal	PMK (Ultisol)	Sukadana, Lampung
L2D	Lokal	PMK (Ultisol)	Sukadana, Lampung
L3A	Lokal	PMK (Ultisol)	Negari Tua, Sukadana, Lampung
L4B1	Lokal	Latosol	Nabang Sidorejo, Sukadana, Lampung
L61	Lokal	PMK (Ultisol)	Sukadana Baru, Lampung
L7A2	Lokal	PMK (Ultisol)	Negeri Agung, Sukadana, Lampung
L7B	Lokal	PMK (Ultisol)	Negari Agung, Sukadana, Lampung
L7F1	Lokal	PMK (Ultisol)	Negari Agung, Sukadana, Lampung
L9A2	Lokal	PMK dan Latosol	Bojong, Jabung, Lampung
L10A	Lokal	PMK dan Latosol	Gunungsugih Besar, Jabung, Lampung
L12C	Lokal	PMK (Ultisol)	Gunungsugih Besar, Jabung, Lampung
L14A2	Lokal	PMK (Ultisol)	Banjaragung, Gunung Balak, Lampung
L15E1	Lokal	PMK (Ultisol)	Banjaragung, Gunung Balak, Lampung
L17-1	Lokal	PMK (Ultisol)	Banjaragung, Gunung Balak, Lampung
L21A1	Wilis	PMK (Ultisol)	Masgar, Natar, Lampung
L21A2	Wilis	PMK (Ultisol)	Masgar, Natar, Lampung
L24A	Lokal	PMK (Ultisol)	Ganjaran, Pringsewu, Lampung
L24B2	Lokal	PMK (Ultisol)	Ganjaran, Pringsewu, Lampung
TKG4A	Wilis	Tanah Kering Gambut	Karangagung, Lampung
TKG4B	Wilis	Tanah Kering Gambut	Karangagung, Lampung
Pd2A	Lokal	PMK	Padang Sibusuk, Nagari Palangki, Sawah Lunto, Sumatera Barat
Pd2C	Lokal	PMK	Padang Sibusuk, Nagari Palangki, Sawah Lunto, Sumatera Barat
Pd6A	Lokal	PMK	Nagari Piruko, Tanjung Gadong, Padang, Sumatera Barat
Pd10AB	Lokal	PMK	PTP III, G. Malintang, Padang, Sumatera Barat
Pd10AE	Lokal	PMK	PTP III, G. Malintang, Padang, Sumatera Barat
A11-1	Lokal	PMK	Aceh
A13-2	Lokal	PMK	Aceh
A17-2	Lokal	PMK	Aceh
A21	Lokal	PMK	Aceh
NTT161	Wilis	Alkalin	Tetaf, Timor, Nusa Tenggara Timur

Analisis DNA genom menggunakan PFGE

Preparasi DNA genom in situ

Galur bakteri ditumbuhkan pada medium SKM cair pada suhu 28°C hingga populasi sel mencapai 10^9 sel/ml. Sebanyak 1 ml suspensi bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 1 menit. Pelet sel dilarutkan dengan 0,5 ml larutan yang terdiri atas: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 M NaCl dan disentrifugasi kembali. Selanjutnya, dilakukan penggantian dengan larutan yang sama sebanyak 0,45 ml dan ditambah 0,9 ml 1,5 % *low melting point agarose* (LMA) di dalam larutan penyangga Tris EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0). Campuran ini segera dicetak dan dibiarkan memadat. Sisipan gel berisi sel yang diperoleh direndam di dalam larutan EC-lysis (6 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM EDTA, pH 7,5; 1 M NaCl; 0,5% polioksietilen-2-cetil-eter; 0,2% natrium deoksikolat; 0,5% natrium lauril sarkosin; 1 mg/ml lisozim) sambil digoyang dengan kecepatan 50-60 rpm di dalam *shaking water bath* pada suhu 37°C selama 6 jam. Tahapan berikutnya ialah penggantian larutan EC-lysis dengan larutan EDTA sodium lauril sarkosin proteinase-K (ESP) (0,5 M EDTA, pH 9,0-9,5; 1% natrium lauril sarkosin; 200 µg/ml proteinase-K), lalu digoyang pada kecepatan 50-60 rpm dalam suhu 55°C selama 48 jam. Setelah itu, dilakukan pencucian sisipan gel dengan larutan penyangga TE pada suhu 37°C selama 30 menit dan diulangi lima kali masing-masing 2 jam. Sisipan gel dapat disimpan pada suhu 4°C di dalam larutan penyangga TE.

Pemotongan DNA genom

Pemotongan DNA genom dilakukan dengan mengiris sisipan gel selebar 2 mm. Potongan sisipan gel direndam di dalam 150 µl larutan perendam (1,5 µl *bovine serum albumin* 100 x; 15 µl larutan penyangga enzim restriksi 10 x; 133,5 µl ddH_2O) dan diinkubasi selama 15 menit di dalam es. Selanjutnya, larutan diganti dengan 150 µl larutan perendam yang baru, ditambah 1 µl enzim restriksi (10 unit) dan diinkubasi 15 menit di dalam es, lalu diinkubasi lebih lanjut pada suhu 37°C selama 4 jam (Suwanto dan Kaplan, 1989).

Elektroforesis fragmen DNA dengan PFGE

Potongan sisipan gel dimasukkan ke sumur (*well*) pada *high melting point agarose* (HMA) 1% berukuran 14 x 13 cm. Permukaan sumur yang telah diisi sisipan gel ditutup dengan 1,5% LMA dan dibiarkan selama 10 menit di dalam lemari pendingin. Elektroforesis dengan larutan penyangga 0,5 x Tris Borat EDTA (TBE) (45 mM trisma base; 45 mM H_3BO_3; 1,25 mM EDTA pH 8,0) dilakukan dalam kondisi waktu pulsa ramping 5-60 detik; 20 jam; pada arus listrik 5,4 volt (140-150 mA), dan dipertahankan pada suhu 14°C.

Visualisasi DNA

Matriks agarose yang telah diangkat dari alat PFGE direndam dalam larutan etidium bromida (1 µg/ml) selama 10 menit dan dibilas dengan akuades selama 20-30 menit. Pola pita DNA diamati di atas UV-transiluminator pada λ : 280 nm dan didokumentasi dengan kamera polaroid berfilter jingga.

Analisis data

Nomor pita diurut dari jarak pita terdekat dengan batas bawah sumur. Pita DNA yang didapatkan dibandingkan dengan standar ukuran molekul, genom *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 yang dipotong dengan *Ase*I (Suwanto dan Kaplan, 1989). Pola pita DNA dikonversi ke dalam matriks data biner ('1' jika ada potongan DNA dan '0' jika tidak ada potongan DNA), lalu matriks data biner dikonversi menjadi matriks data kesamaan dengan subprogram *Similarity Qualitative* dan dikelompokkan menggunakan metode *Unweighted Pair Grouping Method based on Arithmetic Average* dengan subprogram *Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested* dari program *Numerical Taxonomy and Multivariate System* (NTSYS).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis DNA genom dengan *schizotyping*

Pada penelitian ini dilakukan pencirian galur-galur *B. japonicum* dan *S. fredii* menggunakan teknik *schizotyping*, karena analisis berdasarkan sifat genotipe dinilai lebih cepat dan lebih andal. Untuk pencirian sejumlah galur bakteri bintil akar kedelai, teknik ini sederhana dan sangat diskriminatif terutama untuk bakteri. Meskipun teknik *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP) dinilai lebih *reproducible*, namun pada prakteknya teknik ini agak sulit (terutama *blotting* dan *probe*), dan kurang diskriminatif untuk tujuan membedakan galur bakteri dalam satu spesies. Teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan perangkat elektroforesis biasa kurang diskriminatif, perlu penanda RAPD yang benar-benar cocok, dan hasil kerjanya sangat sensitif, sehingga tingkat keberhasilannya rendah. Kelebihan teknik RAPD dibandingkan dengan teknik lainnya ialah cepat dan sampel yang digunakan sedikit. Di samping teknik-teknik tersebut, dikenal teknik yang relatif sederhana dan cepat, namun tidak dapat diterapkan pada semua jenis bakteri, yaitu *plasmid fingerprinting*.

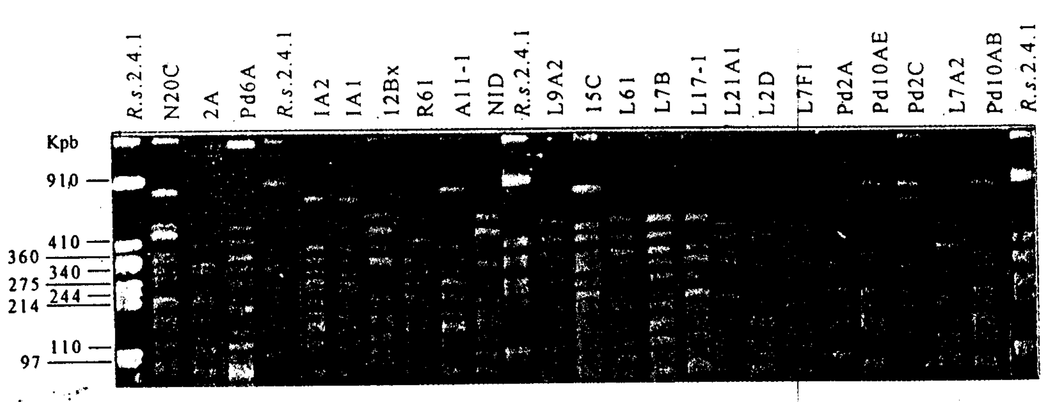
Analisis profil DNA genom total dengan teknik *schizotyping* memerlukan enzim restriksi yang memotong jarang. Sobral *et al.* (1991) mengemukakan bahwa enzim restriksi *Ase*I, *Spe*I, dan *Xba*I menghasilkan sedikit fragmen DNA restriksi dari DNA genom *R. meliloti* 1021, *R. meliloti* AK631, dan *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU 843. Enzim restriksi *Ase*I, *Spe*I, dan *Dra*I memotong sangat jarang DNA genom *B. japonicum, s*edangkan *Spe*I memotong paling jarang DNA genom bakteri yang tergolong ke dalam famili *Rhizobiaceae*.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa DNA genom rhizobia memiliki persentase mol guanin dan sitosin (G+C) di atas 50%, yaitu 59-64% untuk genus *Rhizobium* dan 61-65% untuk genus *Bradyrhizobium* (59,2% pada *B. japonicum*) (Jordan, 1984; Sobral *et al.*, 1991). Oleh karena itu, dipilih enzim restriksi yang memiliki titik potong pada pasangan basa yang kaya adenin atau timin. Di dalam penelitian ini, digunakan enzim restriksi *Spe*I yang memiliki situs pengenalan 5'-A/CTAGT-3'. Menurut McClelland *et al.* (1987), *Spe*I mengandung tetranukleotida CTAG yang akan memotong jarang DNA genom bakteri. Situs enzim restriksi yang mengandung kodon awal (ATG) dan kodon akhir (TAG, TGA, dan TAA) diharapkan dapat memotong DNA genom dengan jarang, karena mengandung kodon stop yang jarang ditemukan pada bakteri.

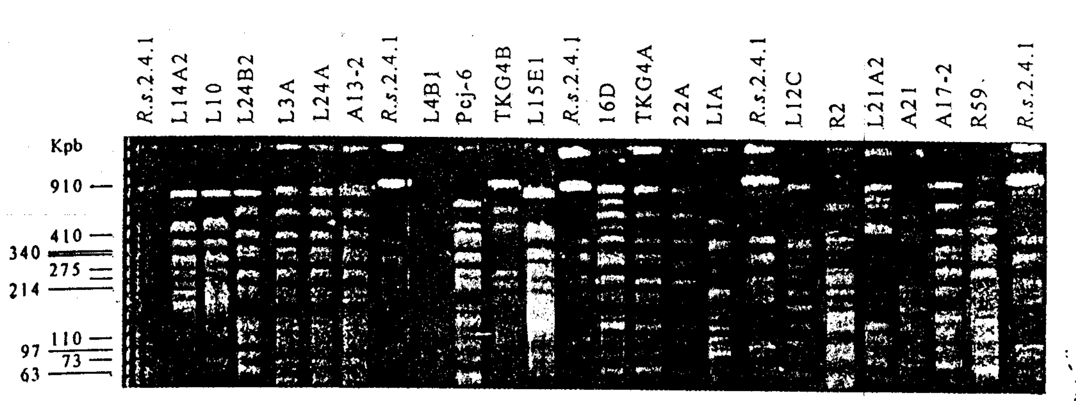
Bradyrhizobium japonicum dan *S. fredii* memiliki ukuran DNA genom yang besar, sehingga diperlukan perangkat yang dapat memisahkan fragmen DNA berukuran besar, yaitu PFGE. Pemisahan fragmen DNA secara diskrit dapat dicapai pada kondisi waktu pulsa yang optimum. Waktu pulsa menunjukkan arah gerakan molekul DNA pada PFGE yang diubah oleh dua medan listrik dengan sudut yang berbeda pada suatu waktu tertentu. Kondisi waktu pulsa 5-60 detik selama 20 jam merupakan waktu pulsa yang optimal untuk pemisahan fragmen DNA genom *B. japonicum* dan *S. fredii* hasil pemotongan dengan *Spe*I.

Profil potongan DNA genom dari 23 galur *B. japonicum* dan 20 galur *S. fredii* yang telah dipotong dengan *Spe*I ditunjukkan pada Gambar 1 dan 2. Pengulangan elektroforesis untuk setiap galur *B. japonicum* dan *S. fredii* dilakukan rata-rata dua kali dengan hasil yang sama. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa hasil *schizotyping* bersifat *reproducible* (dapat diulang). Pola-pola pita DNA pada kedua gambar tersebut menunjukkan tingkat keragaman yang tinggi dari galur *B. japonicum* dan *S. fredii* hasil isolasi dari beberapa propinsi di Indonesia.

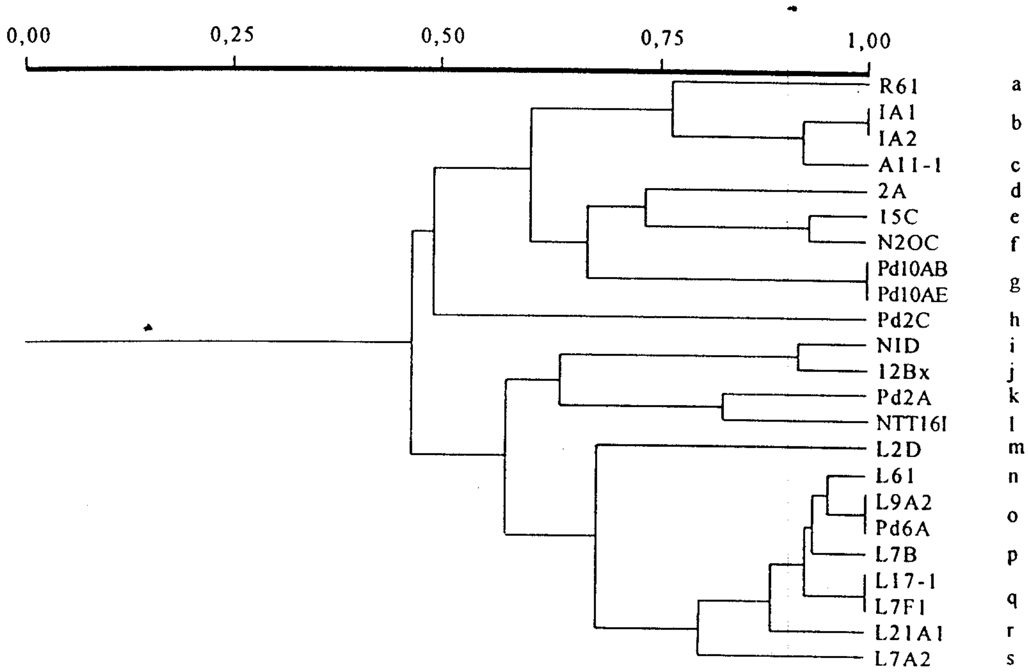
Dendrogram hasil matriks data kesamaan menunjukkan bahwa 23 galur *B. japonicum* dipisahkan ke dalam dua kelompok besar, yaitu kelompok I dan II (Gambar 3). Kelompok I terdiri atas 10 galur yang dibagi menjadi dua subkelompok, yaitu subkelompok A dan B. Subkelompok A dibagi ke dalam gerombol A1 dengan galur-galur dari Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Aceh (R61, IA1, IA2, dan A11-1) serta gerombol A2 dengan galur-galur dari Jawa Timur dan Sumatera Barat (2A, 15C, N20C, Pd10AB, dan Pd10AE). Subkelompok B hanya terdiri atas satu galur yang diisolasi dari Sumatera Barat (Pd2C). Kelompok II terdiri atas 13 galur yang dibagi menjadi dua subkelompok, yaitu subkelompok C dan D. Subkelompok C meliputi



Gambar 1. Skisotipe-*Spe*I dari galur-galur *B. japonicum*.
Fig. 1. Schizotype-SpeI *of* B. japonicum *strains.*



Gambar 2. Skisotipe-*SpeI* dari galur-galur *S. fredii*.
Fig. 2. Schizotype-SpeI *of* S. fredii *strains.*



Gambar 3. Dendrogram yang menunjukkan hubungan skisotipe-*SpeI* dari galur-galur *B. japonicum*.
Fig. 3. Dendrogram showing relationship of schizotype-SpeI *of* B. japonicum *strains.*

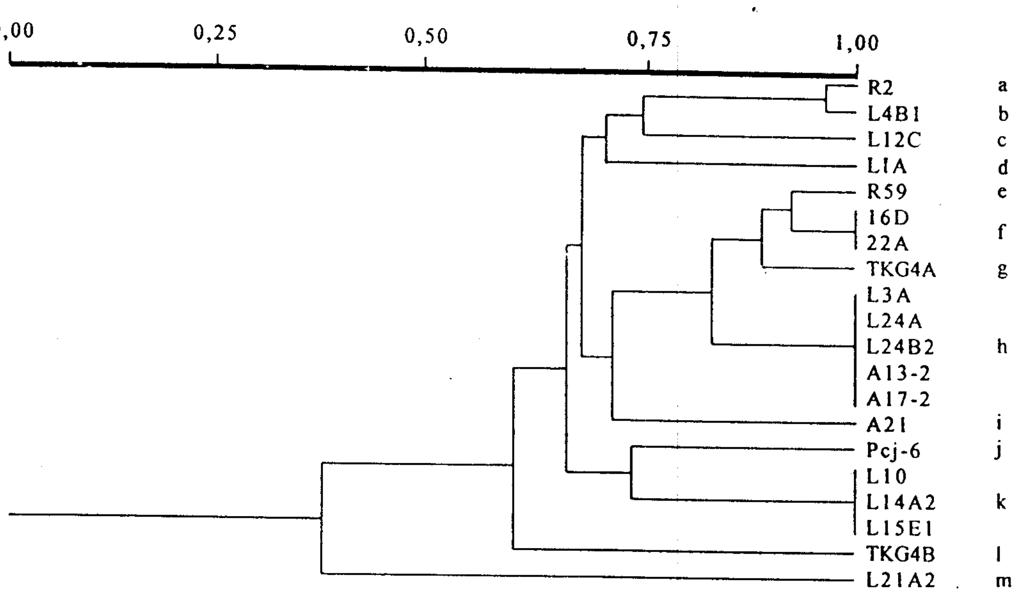
gerombol C1 dengan galur dari Jawa Tengah dan Jawa Timur (N1D dan 12Bx) serta gerombol C2 dengan galur dari Sumatera Barat dan NTT (Pd2A dan NTT16I). Subkelompok D dengan suatu gerombol galur yang sebagian besar berasal dari Lampung, yaitu L61, L9A2, Pd6A, L7B, L17-1, L7F1, L21A1, L7A2, dan galur L2D yang terpisah dari gerombol. Setiap gerombol terbagi lagi atas skisotipe-skisotipe-*SpeI*. Berdasarkan dendrogram hubungan kekerabatan antargalur *B. japonicum*, 23 galur bakteri ini memiliki 19 skisotipe-*SpeI* yang berbeda, yang dikodekan dengan abjad a-s.

Gambar 3 juga menunjukkan bahwa secara garis besar galur-galur dari Pulau Sumatera berada di dalam suatu kelompok yang terpisah dengan kelompok galur dari Pulau Jawa. Hal ini mengandung makna bahwa perbedaan mikroklimat tanah dapat mempengaruhi perbedaan keanekaragaman komunitas mikroba, baik populasi *indigenous*, aktivitas mikroba maupun metabolit-metabolit yang dihasilkan. Pengaruh mikroklimat dapat memperkecil kelimpahan relatif atau keragaman galur mikroba. Galur NTT 16I dari Tetaf, Timor, NTT dapat berkerabat dekat dengan galur Pd2A dari Sawah Lunto, Padang, Sumatera Barat, karena baik NTT maupun Sawah Lunto merupakan daerah kering, berada pada 100-1500 m dpl. Galur bakteri bintil akar dari NTT memiliki sifat tahan terhadap kondisi kering, sehingga cocok diaplikasikan pada lahan kering. Galur tersebut akan memberikan manfaat yang cukup besar bagi pengembangan pertanaman kedelai di daerah kering, seperti NTT dan NTB. Di samping itu, ditemukan fenomena bahwa galur yang efektif dari suatu propinsi dapat berkerabat dekat dengan galur efektif dari propinsi lain, misalnya galur A11-1 dari Aceh berkerabat dekat dengan galur IA1 dan IA2 dari Purbawangi, Banyumas, Jawa Tengah.

Dendrogram pada Gambar 4 menunjukkan bahwa 20 galur *S. fredii* terdiri atas dua kelompok besar, yaitu kelompok I dengan 19 galur dan kelompok II hanya untuk galur L21A2. Kelompok I dibagi menjadi dua subkelompok, yaitu subkelompok A untuk gerombol A1 (R2, L4B1, L12C, LIA, R59, 16D, 22A, TKG4A, L3A, L24A, L24B2, A13-2, A17-2, dan A21) dan gerombol A2 (Pcj-6, L10, L14A2, dan L15E1) dan subkelompok B untuk galur TKG4B. Galur yang terdapat pada gerombol A1 berasal dari berbagai daerah sentra produksi kedelai di Indonesia meliputi Jawa Barat, Jawa Timur, Lampung, dan Aceh; sedangkan galur pada gerombol A2 berasal dari Jawa Barat, Jawa Timur, dan Lampung. Berdasarkan dendrogram pada Gambar 4 dapat dinyatakan bahwa 20 galur *S. fredii* memiliki 13 skisotipe-*Spe*I yang berbeda dan dikodekan dengan abjad a-m.

Gambar 4 juga menunjukkan bahwa galur TKG4A dan TKG4B yang diperoleh dari lokasi yang sama (daerah gambut di Karang Agung, Lampung) ternyata tidak berkerabat dekat. Galur TKG4B bersifat toleran hingga sangat toleran terhadap kondisi masam-Al, sedangkan isolat TKG4A bersifat peka terhadap kondisi masam-Al. Hal ini menunjukkan bahwa galur dari tanah masam tidak selalu toleran terhadap kondisi masam-Al. Untuk itu, pengujian toleransi galur-galur bakteri bintil akar terhadap kondisi masam-Al tidak cukup dilakukan di laboratorium, tetapi perlu dilakukan sampai tahap penelitian rumah kaca dan dilanjutkan ke penelitian lapangan.

Secara umum diperoleh informasi bahwa terdapat kecenderungan galur dari lokasi yang sama berada pada kelompok yang sama. Hal ini dapat dilihat dengan jelas pada galur dari Lampung, Jawa Timur, dan Sumatera Barat. Dengan demikian galur bakteri bintil akar kedelai yang akan diaplikasikan di suatu daerah pengembangan tanaman kedelai sebaiknya dipilih dari daerah yang bersangkutan. Jika galur tersebut sulit diperoleh, dapat dipilih galur bakteri bintil akar yang sekerabat atau berkerabat dekat dengan galur dari daerah tersebut.



Gambar 4. Dendrogram yang menunjukkan hubungan skisotipe-*Spe*I dari galur-galur *S. fredii.*
*Fig. 4. Dendrogram showing relationship of schizotype-*SpeI *of* S. fredii *strains.*

KESIMPULAN

Berdasarkan skisotipe-*Spe*I, 23 galur *B. japonicum* dan 20 galur *S. fredii* yang berasal dari beberapa daerah sentra produksi kedelai di Indonesia, masing-masing terdiri atas 19 dan 13 skisotipe-*Spe*I. Hasil analisis data menunjukkan adanya hubungan kekerabatan genetik isolat bakteri bintil akar kedelai dengan daerah asal isolat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Dr. Yaya Rukayadi atas saran yang berharga dan Elsanti atas bantuan teknis selama berlangsungnya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Birkelund, S. and R.S. Stephens. 1992. Construction of physical and genetic maps of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J. Bacteriol. 174: 2742-2747.

Brosch, R., C. Buchrieser, and J. Rocourt. 1991. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Res. Microbiol. 142: 667-675.

Jordan, D.C. 1984. Famili III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, 321AL, p. 234-256. *In* N.R. Krieg and J.E. Holt (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology 1st ed. The William and Wilkins Co., Baltimore.

McClelland, M., R. Jones, Y. Patel, and M. Nelson. 1987. Restriction nucleases for pulsed-field mapping of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 15: 5985-6005.

Sobral, B.W.S., M.J. Sadowsky, and A.G. Atherly. 1990. Genome analysis of *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 field isolates by using Field Inversion Gel Electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1949-1953.

Sobral, B.W.S., R.J. Honeycut, and A.G. Atherly. 1991. The genomes of family *Rhizobiaceae*: size, stability and rarely cutting restriction endonucleases. J. Bacteriol. 173: 704-709.

Somasegaran, P. and J. Halliday. 1982. The dilution of liquid cultures of *Rhizobium* to increase production capacity of inoculant production plants. Appl. Environ. Microbiol. 44: 330-333.

Suwanto, A. and S. Kaplan. 1989. Physical and genetic mapping of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: genome size, fragmen identification and gene localization. J. Bacteriol. 171: 5840-5849.

Suwanto, A. and S. Kaplan. 1992. Chromosome transfer in *Rhodobacter sphaeroides*: Hfr formation and genetic evidence for two unique circular chromosome. J. Bacteriol. 174: 1135-1145.