

SHORT COMMUNICATION

Deteksi Cepat Penyakit Pustul Bakteri pada Kedelai Menggunakan Teknik PCR dengan Primer Spesifik

Rapid Detection of Bacterial Pustule Disease on Soybean Employing PCR Technique with Specific Primers

ANDI KHAERUNI^{1,3*}, ANTONIUS SUWANTO², BUDI TJAHOJONO¹, MEITY SURADJI SINAGA¹

¹Plant Protection Department, Agriculture Faculty; ²Department of Biology, FMIPA, Bogor Agricultural University, Darmaga Campus, Bogor 16680, Indonesia; ³Plant Protection Department, Agriculture Faculty of Haluoleo University, Kendari 93232, Indonesia

Received October 2, 2006/Accepted March 12, 2007

A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based procedure was developed for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, the causal agent of bacterial pustule disease on soybean. A set of primers was designed from partial sequence of the pathogenicity gene of *X. axonopodis* pv. *glycines* strain YR32. Specific PCR product of 490 base pairs was produced from strains of *X. axonopodis* pv. *glycines* originally from Indonesia as well as from Taiwan. No other pathovars and bacterial species among those tested showed amplification product under optimized PCR conditions. Shaking infected soybean leaves in phosphate buffer saline during six hours was proved to be an essential in order to increase cell number of the bacterial. The procedure was applicable and reliable for detecting of pathogens in infected plant materials. The procedure was proved to be more effective than that of conventional detection and could be of great help for monitoring of pustule bacterial disease in the soybean fields.

Key words: *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, bacterial pustule disease, rapid detection, PCR, specific primer

Penyakit pustul bakteri yang disebabkan oleh *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, merupakan salah satu penyakit utama pada tanaman kedelai di Indonesia. Penyakit tersebut juga menyerang pertanaman kedelai edamame (*green vegetable soybean*) yang mulai banyak dibudidayakan di Indonesia seperti di Jember, Cipanas, dan Ciawi (Khaeruni, data tidak dipublikasikan). *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, disamping menyerang daun kedelai, juga merupakan patogen terbawa benih. Identifikasi dan deteksi secara visual bakteri ini pada benih sulit dilakukan karena benih yang terinfeksi bakteri tidak menunjukkan gejala yang khas. Selain itu, kendala lain yang sering didapatkan dalam identifikasi penyakit pustul bakteri kedelai di lapangan, yaitu sulitnya membedakan antara gejala penyakit ini dan penyakit hawar daun bakteri, serta karat daun cendawan, terutama pada fase awal perkembangan penyakit (Frederick *et al.* 2002). Selama ini, identifikasi dan deteksi *X. axonopodis* pv. *glycines* dilakukan melalui pengamatan gejala penyakit pada daun di lapangan. Untuk konfirmasi, dilakukan beberapa pengujian, antara lain menumbuhkan patogen pada media padat untuk melihat karakter morfologi dan pengujian sifat fisiologinya (Moffet & Dye 1983). Walaupun karakter morfologi dan fisiologi diperlukan sebagai studi awal, namun untuk keperluan mendeteksi patogen di lapangan tidak efektif karena

pengujian tersebut membutuhkan waktu yang lama (Suwanto 1994). Guna mendukung penyediaan benih bebas patogen dan deteksi penyakit secara dini di lapangan diperlukan teknik identifikasi dan deteksi secara cepat dan akurat dengan sensitivitas yang tinggi. Seiring dengan perkembangan teknologi dalam bidang mikrobiologi, berbagai teknik identifikasi dan deteksi telah dikembangkan antara lain melalui teknik *polymerase chain reaction* (PCR).

Berbagai variasi metode PCR telah dikembangkan untuk identifikasi dan deteksi bakteri patogen tumbuhan, misalnya amplifikasi gen *hrp* (Leite *et al.* 1995) dan penggunaan PCR dengan primer spesifik dari gen patogenisitas pada plasmid (Verdier *et al.* 1998). Pratiwi (2004) telah berhasil mensekuen sebagian gen yang menyandikan *patogenisitas* XagYR32. Gen tersebut spesifik terdapat pada galur-galur *X. axonopodis* pv. *glycines*, tetapi tidak terhadap spesies lain dari genus *Xanthomonas*. Oleh karena itu, dapat didesain suatu primer spesifik untuk kepentingan deteksi *X. axonopodis* pv. *glycines* secara cepat dan akurat dengan sensitivitas yang tinggi melalui penggunaan teknik PCR. Tulisan ini memuat tentang desain primer spesifik berdasarkan hasil sekuen DNA parsial dari gen *patogenisitas* XagYR32 yang berukuran 1.8 kb hasil pemotongan *Pst*I (gen *patogenisitas* XagYR32 1.8 *Pst*I) serta optimasi kondisi PCR untuk mendeteksi *X. axonopodis* pv. *glycines* secara cepat, spesifik, dan sensitif pada tanaman kedelai.

*Corresponding author. Phone/Fax: +62-401-322320,
E-mail: akhaeruni@telkomnet.com

Tabel 1. Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini

Strain bakteri	Jumlah	Inang, asal, dan kode isolat	Referensi
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	3	Kedelai, Bogor: YR3, YR10, YR32	Rukayadi <i>et al.</i> (2000)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	2	Kedelai, Taiwan: Xag68, Xag69	Pratiwi (2004)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	2	Edamame, Cipanas: CP1, CP2	Penelitian ini
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	4	Edamame, Bogor: DM11, DM12, DM 21, DM22	Penelitian ini
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	17	Edamame, Jember: JA1, JA2, JA3, JA4, JA5, JA6, JA7, JA8, JA9, JA10, JB1, JB2, JB3, JB4, JB5, JB6, JB7	Penelitian ini
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	6	Edamame, Ciawi: CW12, CW21, CW32, CW41, CW51, CW61	Penelitian ini
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	2	Kedelai, Medan: MD1, MD2	Penelitian ini
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	2	Kedelai, Malang: ML1, ML2	Penelitian ini
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	2	Kedelai, Mataram: MT1, MT2	Penelitian ini
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	2	Kedelai, Makassar: MK1, MK2	Penelitian ini
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	1	Singkong, Bogor: Xam 01	Lab RCMD
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	1	Buncis, Taiwan: Xap75	Pratiwi (2004)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	1	Jeruk, Taiwan: Xac17	Pratiwi (2004)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	1	Strawberry, Taiwan: Xav71	Pratiwi (2004)
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	1	Kubis, Taiwan: Xcc60	Pratiwi (2004)
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	1	Kubis, Bogor: XcAK01	Penelitian ini
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	2	Padi, Kendari: ST08, ST17	Khaeruni <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	2	Kedelai, Bogor: Psg01, Psg30	Lab Bioteknologi Balitbiogen
<i>P. fluorescens</i>	1	Kedelai, Medan: B29	Mariani (1995)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	1	Cabai, Bogor	Lab Bioteknologi HPT IPB
Bakteri saprofit	3	Kedelai, Bogor: UK01, UK02, UK03	Penelitian ini
Plasmid (pEPH11)	-	-	Pratiwi (2004)

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini ditampilkan pada Tabel 1. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* dan patovar-patovar *Xanthomonas* lainnya dibiakkan pada media *yeast extract calcium-carbonate dextrose agar* (YCDA) (10 g ekstrak ragi, 20 g CaCO₃, 5 g D-glukosa, 15 g agar dalam satu liter akuades), pada suhu 27-30 °C. *Pseudomonas* dan bakteri-bakteri lainnya ditumbuhkan pada media Kings B (20 g protease pepton, 1.5 g MgCl₂, 1.5 g K₂HPO₄, 15 g gliserol, 15 g agar dalam satu liter akuades) pada suhu 27-30 °C.

Benih edamame atau kedelai varietas Orba dan Wilis ditanam dalam *polybag*, dipelihara dalam rumah kaca dan diinokulasi dengan sejumlah isolat *X. axonopodis* pv. *glycines* secara terpisah pada umur 14 hari setelah tanam. Isolat-isolat Xag ditumbuhkan dalam media YDCA selama 48 jam. Sel bakteri disuspensikan dengan larutan penyangga hingga konsentrasi sel mencapai 10⁸ cfu/ml (OD₆₆₀ = 0.1). Suspensi biakan murni yang diperoleh terlebih dahulu dicampur dengan serbuk karborundum 600 mesh sebanyak 1 g/l suspensi dan bahan perata Tween 20 sebanyak 0.1% (v/v) suspensi. Inokulasi dilakukan pada seluruh daun dengan menggunakan alat semprot plastik isi 1 l. Jumlah suspensi yang digunakan adalah 10 ml tiap tanaman.

Isolat bakteri yang berasal dari koloni tunggal ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) (10 g *Tryptone*, 5 g NaCl, 5 g *yeast extract*, dalam 1 l akuades, pH 7.1) dan diinkubasi dalam *shaker waterbath* pada suhu 30 °C selama 24 jam dengan goyangan sedang. Bakteri dipanen dengan mengambil 1.5 ml suspensi biakan, disentrifugasi pada 7 000 x g selama tiga menit. Ekstraksi DNA dilakukan menurut metode Lazo dan Gabriel (1987). DNA hasil ekstraksi diamati kualitasnya dengan spektrofotometer, selanjutnya disimpan pada suhu -20 °C.

Desain primer untuk deteksi *X. axonopodis* pv. *glycines* pada tanaman kedelai dilakukan dengan menggunakan hasil sekuen DNA parsial dari gen *patogenisitas* Xag YR32

1.8 kb *PstI* (Pratiwi 2004). Desain dan analisis dilakukan menggunakan *Netprimer Analysis Software* dari PRIMER Biosolf International (www.primerbiosoft.com/netprimer.html). Primer disintesis oleh Research Biolabs (Singapura).

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin *GeneAmp PCR System 2400* (PERKIN ELMER). Campuran Reaksi PCR (25 µl) mengandung 1 x reaksi bufer, 100 µM dNTP, 15 pmol untuk setiap primer, 1.25 U *Taq DNA polymerase* (*New England Biolabs*) dan 1 µl DNA bakteri. PCR dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal pada 94 °C selama lima menit, diikuti dengan 30 siklus PCR yang terdiri atas denaturasi 94 °C selama 30 detik, penempelan primer 59 °C selama 30 detik, sintesis 72 °C selama dua menit. Reaksi diakhiri dengan sintesis akhir pada 72 °C selama tujuh menit, diikuti dengan penurunan suhu ke 4 °C untuk menghentikan reaksi. Hasil PCR dielektroforesis dalam gel agarose 1.5% dalam larutan penyangga 1 X TAE (Tris EDTA pH 8.0) pada 70 volt selama 90 menit. DNA diwarnai dengan etidium bromida dan divisualisasi di bawah UV transluminator, kemudian didokumentasikan dengan film Polaroid type 667.

Spesifisitas primer diuji dengan semua isolat bakteri yang tercantum pada Tabel 1. Preparasi DNA, komposisi reaksi, dan kondisi PCR dilakukan seperti dijelaskan sebelumnya. DNA pEPH11 digunakan sebagai kontrol positif (Pratiwi 2004) dan akuabides sebagai kontrol negatif.

Uji sensitivitas dilakukan sebagai berikut: Suspensi DNA *X. axonopodis* pv. *glycines* YR32 dengan konsentrasi DNA yang telah diketahui dengan spektrofotometer diencerkan secara bertingkat. Contoh sebanyak 1 µl dari setiap tingkat pengenceran diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik XAG-F dan XAG-R sesuai dengan kondisi yang dijelaskan di atas.

Sensitivitas PCR dengan primer XAG-F dan XAG-R, diuji juga terhadap jumlah sel yang mampu dideteksi dengan cara

sebagai berikut: Isolat *X. axonopodis* pv. *glycines* YR32 di kulturkan dalam LB cair yang disuplementasi ampisilin (100 µg/ml) semalam pada suhu 30 °C dalam pengocok dengan goyangan sedang, konsentrasi awal pada kerapatan sel sekitar 10^8 cfu/ml ($A_{660} = 0.1$), kemudian diencerkan secara bertingkat dari stok awal. Setiap tingkat pengenceran tersebut ditentukan jumlah selnya dengan menyebar 25 µl pada media KingsB yang disuplementasi ampisilin (100 µg/ml) lalu diinkubasi pada suhu 27-30 °C, sehingga diperoleh kerapatan tertentu. Setiap 1 ml dari tiap pengenceran tersebut diambil untuk dilakukan ekstraksi DNA dengan menggunakan metode Llop *et al.* (1999) untuk digunakan sebagai DNA cetakan dalam reaksi PCR.

Sebanyak 0.5 g daun kedelai dengan gejala pustul bakteri disterilisasi permukaan dengan 0.25% sodium hiperklorit selama 30 detik. Daun digunting berukuran kecil dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 100 ml yang berisi 10 ml *phosphat buffer saline* (PBS). Contoh digoyang dalam *waterbath* pada suhu 30 °C selama enam jam, supernatan disaring dan disentrifugasi selama sepuluh menit pada 7000 x g. Pelet disuspensikan dalam PBS untuk digunakan pada analisis selanjutnya. Deteksi *in situ* *X. axonopodis* pv. *glycines* dilakukan berdasarkan metode yang dikemukakan oleh Zhao *et al.* (2002) dengan perlakuan pemanasan pada suhu 100 °C selama lima menit sebelum dilakukan reaksi PCR dengan primer spesifik.

Hasil desain menggunakan *Netprimer Analysis Software* dari *PRIMER Biosoft International* dipilih dua primer yang diberi nama Primer XAG-F (*forward primer*) dan Primer XAG-R (*reverse primer*). Primer XAG-F memiliki panjang 19 basa dengan urutan DNA 5'-AGCTATGACTGGCGACGTG-3' dan primer XAG-R memiliki panjang 20 basa dengan urutan DNA '5-GGCCCTGACTGGAAAGTACC-3'. Kedua primer tersebut yang berada pada posisi basa ke 97-115 dan basa ke 566-586 yang mengapit sekitar 490 pb pada parsial gen *patogenesis XagYR3*. Analisis validasi dan kelayakan terhadap primer XAG-F dan XAG-R menunjukkan kedua primer tersebut memiliki suhu pelekatan yang sama, tidak terdapat *loop hairpin* dan struktur *duplex*.

Amplifikasi PCR menggunakan primer XAG-F dan XAG-R yang menghasilkan ampikon berukuran 490 pb hanya diperoleh pada isolat *X. axonopodis* pv. *glycines*, tidak diperoleh pada isolat lainnya, baik dari spesies-spesies lain dalam genus *Xanthomonas* seperti *X. campestris* pv. *campestris* dan *X. oryzae* pv. *oryzae* maupun pada patovar-patovar dari *X. axonopodis* lainnya. Ampikon yang berukuran 490 pb juga tidak dihasilkan pada bakteri-bakteri selain genus *Xanthomonas* seperti *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P. fluorescens* B29, *R. solanacearum* (Gambar 1).

Primer XAG-F dan XAG-R mampu mengamplifikasi semua isolat-isolat *X. axonopodis* pv. *glycines* yang diuji dalam penelitian ini. Hal tersebut termasuk untuk *X. axonopodis* pv. *glycines* yang diisolasi dari edamame dan dari kedelai lokal serta Taiwan (Gambar 2).

Uji sensitivitas metode PCR dengan primer spesifik XAG-F dan XAG-R dalam mendeteksi *X. axonopodis* pv. *glycines*, menunjukkan bahwa pengenceran serial kultur sel murni sampai pada konsentrasi 4.2×10^3 cfu/ml masih mampu

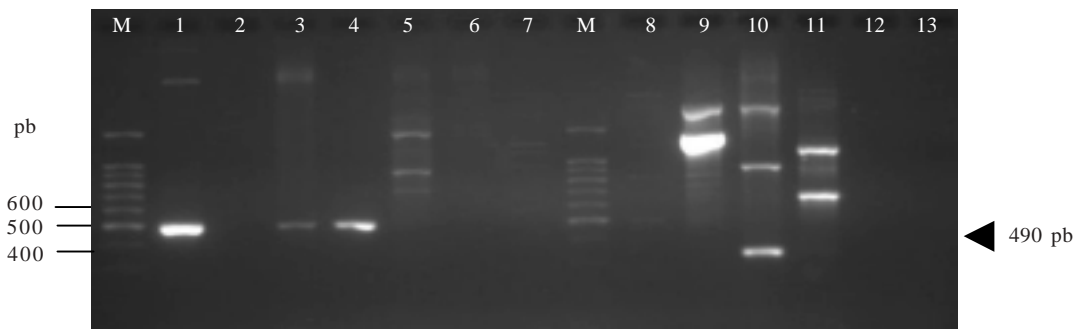
terdeteksi dengan baik. Hal ini ditandai dengan munculnya ampikon 490 pb, demikian juga DNA *X. axonopodis* pv. *glycines* sebagai DNA cetakan pada konsentrasi 0.05 ng/µl masih terdeteksi dengan baik (Gambar 3).

Penggunaan teknik PCR dengan primer XAG-F dan XAG-R mampu mendeteksi *X. axonopodis* pv. *glycines* dari jaringan daun kedelai yang diinokulasi buatan di rumah kaca dan daun terinfeksi secara alami yang diperoleh dari lapangan. Ampikon berukuran 490 pb diperoleh dari ekstraksi potongan-potongan daun bergejala pustul bakteri yang direndam dalam larutan PBS selama enam jam dalam *shaker* bergoyang pada suhu 30 °C. Ampikon yang sama tidak diperoleh pada jaringan tanaman sehat (Gambar 4).

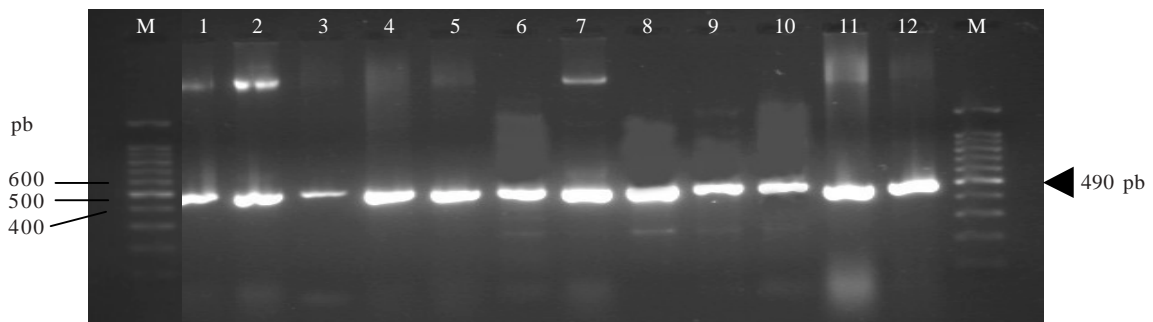
Metode deteksi yang cepat, akurat, serta memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk mendeteksi *X. axonopodis* pv. *glycines* penyebab penyakit pustul pada tanaman kedelai telah dikembangkan dalam penelitian ini. Ampikon 490 pb yang dihasilkan dengan menggunakan primer XAG-F dan XAG-R yang didesain dari urutan parsial gen *patogenesis X. axonopodis* pv. *glycines* YR32 (Pratiwi 2004), merupakan hasil amplifikasi yang spesifik dari DNA target, baik yang berasal dari kultur sel murni *X. axonopodis* pv. *glycines* maupun dari daun kedelai yang bergejala pustul bakteri.

Primer XAG-F dan XAG-R terbukti efektif mendeteksi kultur sel murni 42 isolat *X. axonopodis* pv. *glycines* yang diuji dalam penelitian ini. Isolat-isolat yang diuji berasal dari edamame dan kedelai yang diisolasi dari berbagai wilayah di Indonesia termasuk dua isolat dari Taiwan. Beberapa isolat tersebut merupakan isolat-isolat dengan profil DNA yang berbeda berdasarkan metode *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism* (data tidak ditampilkan). Sebaliknya cetakan DNA yang berasal dari spesies dan patovar selain *X. axonopodis* pv. *glycines* tidak dihasilkan ampikon spesifik yang berukuran 490 pb. Hal yang sama juga tidak terdapat pada isolat-isolat genus lain seperti *Pseudomonas*, *Ralstonia*, dan *Bacillus*, termasuk bakteri filofser kedelai yang belum teridentifikasi (Gambar 1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa penggunaan teknik PCR dengan primer spesifik XAG-F dan XAG-R memiliki spesifisitas yang tinggi untuk mendeteksi *X. axonopodis* pv. *glycines* bila dibandingkan dengan teknik serologi yang telah dikembangkan sebelumnya. Teknik tersebut berupa penggunaan antibodi poliklonal *X. axonopodis* pv. *glycines* yang memperlihatkan adanya reaksi silang dengan *X. campestris* pv. *campestris*, penyebab penyakit busuk hitam pada tanaman kubis (Khaeruni *et al.* 2005).

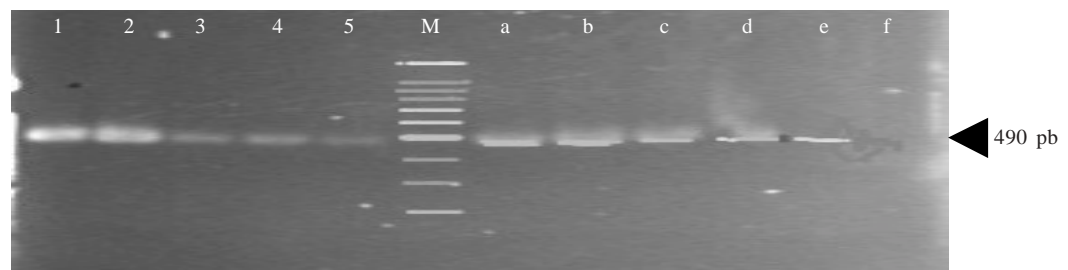
Penggunaan primer XAG-F dan XAG-R juga mampu mendeteksi *X. axonopodis* pv. *glycines* langsung dari jaringan daun yang bergejala penyakit pustul bakteri tanpa dilakukan pengkulturan dan isolasi DNA terlebih dahulu, baik dari hasil inokulasi buatan maupun infeksi alami dari lapangan (Gambar 4). Perendaman daun sakit dalam PSB selama enam jam mampu meningkatkan populasi sel bakteri dari sekitar 10^3 cfu/ml menjadi 10^6 cfu/ml, sehingga sel bakteri cukup sebagai cetakan DNA dalam reaksi PCR. Sementara itu, pemanasan pada suhu 100 °C sebelum reaksi PCR juga penting untuk menghilangkan senyawa-senyawa inhibitor yang dapat



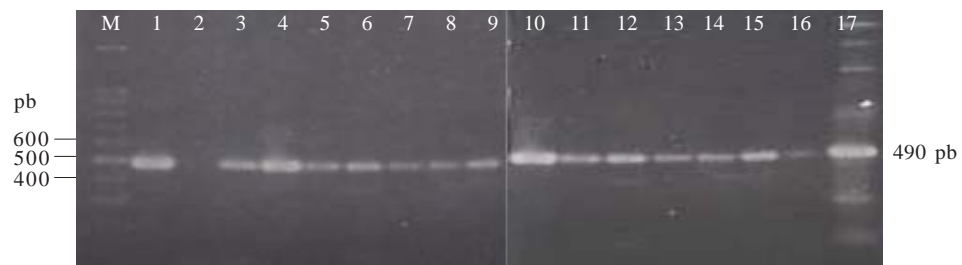
Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR amplifikasi DNA genom sejumlah patovar *Xanthomonas* dan bakteri lainnya dengan menggunakan primer XAGF dan XAGR. M = marker 100 bp (Promega) 1 = pEPH11 (Kontrol +); 2 = air suling (kontrol negatif); 3 = *X. axonopodis* pv. *glycines* YR32 (XagYR32, kedelai); 4 = *X. axonopodis* pv. *glycines* JA1 (XagJA1, edamame); 5 = *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 75 (Xap75, buncis); 6 = *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 71 (Xav71, strawberry); 7 = *X. campestris* pv. *campestris* 60 (Xcc60, kubis); 8 = *X. oryzae* pv. *oryzae* ST17 (XooST17, padi); 9 = *X. axonopodis* pv. *citri* 17 (Xac17, Jeruk); 10 = *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Xam, ubi kayu); 11 = *P. syringae* pv. *glycinea* 01 (Psg01, kedelai); 12 = *P. fluorescens* B29 (Pf B29, kedelai); 13 = *R. solanacearum* (Rs, cabai).



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk PCR amplifikasi DNA genom Xag menggunakan primer XAG-F dan XAG-R. M = marker 100 bp (Promega); 1 = pEPH11 (kontrol positif) 2 = Isolat Xag YR32 (kedelai, Bogor); 3 = Isolat Xag YR3 (kedelai Pasuruan); 4 = Isolat Xag 68 (kedelai, Taiwan); 5 = Isolat Xag 69 (kedelai, Taiwan); 6 = Isolat Xag JA4 (edamame, Jember); 7 = Isolat Xag JA8 (edamame, Jember); 8 = Isolat Xag JB3 (edamame, Jember); 9 = Isolat Xag JB7 (edamame, Jember); 10 = Isolat Xag CP1 (edamame, Cipanas); 11 = Isolat Xag DM11 (edamame, Bogor); 12 = Isolat Xag CW21 (edamame, Ciawi).



Gambar 3. Hasil elektroforesis dari uji sensitivitas PCR dengan primer XAG-F dan XAG-R. M: Marker 100 pb (Promega), lajur 1-5: konsentrasi sel berturut-turut: lajur 1 = 1.4×10^8 sel/ml, lajur 2 = 1.2×10^7 sel/ml, lajur 3 = 4.2×10^6 sel/ml, lajur 4 = 1.2×10^4 sel/ml, lajur 5 = 4.8×10^3 sel/ml. Lajur a-f: konsentrasi DNA sebagai cetakan DNA, berturut-turut: lajur a = 1.05 ng/l, lajur b = 0.53 ng/l, lajur c = 0.26 ng/l, lajur d = 0.13 ng/l, lajur e = 0.05 ng/l, lajur f = 0.03 ng/l.



Gambar 4. Hasil elektroforesis produk PCR dari ekstrak daun kedelai yang bergejala bisul bakteri dengan primer XagF dan Xag R. M: Marker DNA lader 100 bp (Promega), 1: DNA pEPH11 (kontrol +); 2: ekstraksi daun sehat; 3-9: ekstraksi daun bergejala bisul bakteri yang diinokulasi dengan isolat Xag berturut-turut XagYR32, CP1, JA4, JA8, JB3, DM12, CW12; 10-13: ekstraksi daun kedelai bergejala bisul dari Darmaga; 14-16: ekstraksi daun edamame bergejala penyakit bisul bakteri; 17: ekstraksi daun edamame bergejala penyakit bisul, hawar bakteri, dan karat cendawan (*multi diseases*) dari Ciawi.

mengganggu reaksi PCR (Wang *et al.* 1999). Dengan menggunakan prosedur PCR dengan 30 siklus dari tiga tahap PCR, hasil deteksi dapat diperoleh dalam waktu satu hari (± 10 jam). Waktu yang diperlukan tersebut sangat singkat dibandingkan dengan metode konvensional seperti penumbuhan pada media yang membutuhkan waktu sekitar 5-7 hari.

Beberapa peneliti sebelumnya juga telah mengembangkan metode PCR dengan primer spesifik hasil pengurutan dari gen patogenitas untuk mendeteksi bakteri patogen tanaman (Verdier *et al.* 1998; Cubero *et al.* 2001). Namun kedua metode tersebut menggunakan primer spesifik berdasarkan urutan DNA gen patogenitas pada plasmid, bukan pada kromosom bakteri yang bersangkutan. Telah diketahui bahwa keberadaan kromosom dalam sel bakteri lebih stabil dibandingkan dengan plasmid. Metode deteksi penyakit pustul bakteri pada kedelai yang berbasis PCR dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dengan waktu singkat seperti yang dijelaskan di atas, mudah diaplikasikan dalam mendeteksi dan memantau perkembangan penyakit pustul bakteri di lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Pusat Penelitian Keragaman Mikrob Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

- Cubero J, Graham JH, Gottwald TR. 2001. Quantitative method for diagnosis of citrus bacterial cancer. *Appl Environ Microbiol* 67:2849-2852.
- Frederick RD, Snyder CL, Peterson GL, Bonde MR. 2002. Polymerase chain reaction assay for detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomiaae*. *Phytopathology* 92:217-227.
- Khaeruni A, Tjahjono B, Suwanto A, Sinaga MS. 2005. Deteksi *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* pada kedelai dengan teknik ELISA. *J Mikrobiol Indones* 10:59-64.
- Lazo GR, Gabriel DW. 1987. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopatology* 44:448-453.
- Leite RA, Jones JB, Somodi GC, Minsavage GV, Stall RE. 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Dis* 79:917-922.
- Llop P, Caruso P, Cubero J, Morente C, Lopez MM. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods* 37:23-31.
- Mariani. 1995. Isolasi dan seleksi bakteri filofser yang berpotensi untuk biokontrol *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra pada tanaman kedelai dengan esei nukleasi es [BSc. Thesis]. Bogor: Bogor Agricultural Univ.
- Moffet ML, Dye DW. 1983. Valid names of plant pathogenic bacteria. In: Fahy FC, Persley GJ (eds). *Plant Bacterial Disease: A Diagnostic Guide*. Sydney: Acad Pr. p 299-315.
- Pratiwi E. 2004. Analisis sekuen DNA yang terlibat dalam patogenitas dan perancangan primer PCR spesifik untuk *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* [Dissertation]. Bogor: Bogor Agricultural Univ.
- Rukayadi Y, Suwanto A, Tjahjono B, Harling R. 2000. Survival and ephiphytic fitness of a nonpathogenic mutan of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *Appl Environ Microbiol* 66:1183-1189.
- Suwanto A. 1994. Strategies in molecular biology techniques for studying phytopathogenic bacteria. *Biotrop Spec Publ* 54:227-323.
- Verdier V, Mosquera G, Assigbetse K. 1998. Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction. *Plant Dis* 82:79-83.
- Wang ZK, Comstock JC, Hatziloukas E, Schaad NW. 1999. Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA and isolation on semi selective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. *Plant Pathol* 48:245-252.
- Zhao Y, Damicome JP, Bender CL. 2002. Detection, survival, and source of inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. *Plant Dis* 86:883-888.