

**KERAGAMAN GENETIK BAKTERI *XANTHOMONAS ORYZAE*
PV. *ORYZAE* DARI BEBERAPA DAERAH DI INDONESIA
MENGUNAKAN MARKA SPESIFIK**

***GENETIC DIVERSITY OF XANTHOMONAS ORYZAE PV.*
ORYZAE BACTERIA FROM SOME PLACES IN INDONESIA
*USING SPECIFIC MARKER***

Tasliah, Fensi Amalina, Mahrup, dan Joko Prasetyono

1. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Jawa Barat, Indonesia
2. Program Studi Biologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung Jalan Ganesha No. 10 Bandung 40132, Jawa Barat, Indonesia
Email: tasliah1@yahoo.co.id, HP: 081385339478

ABSTRAK

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) merupakan bakteri yang sering menyerang daun padi. Di Indonesia, banyak lahan padi yang terserang bakteri ini sehingga menimbulkan penyakit yang bernama hawar daun bakteri (HDB). Penelitian ini bertujuan untuk mengarakterisasi isolat-isolat *Xoo* dari beberapa wilayah di Indonesia menggunakan marka molekuler. Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) diisolasi dari daun padi hingga didapatkan kultur murni bakteri *Xoo*. Untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri *Xoo* maka dilakukan identifikasi menggunakan marka *Xoo2976*, setelah itu dilakukan isolasi DNA bakteri *Xoo* dan diamplifikasi menggunakan marka Je1 dan Je2 pada mesin PCR. Hasil PCR diseparasi dalam elektroforesis menggunakan gel agarosa 2%. Skoring Pola pita DNA dilakukan dengan membuat bilangan biner dan menggunakan program NTSys untuk membentuk dendrogram. Hasil dari penelitian ini menunjukkan identifikasi bakteri *Xoo* dengan menggunakan marka molekuler sangat efektif dan menyingkat waktu dibanding dengan metode Postulat Koch. Kesamaan genetik bakteri *Xoo* di Indonesia lebih disebabkan oleh inang yang sama, walaupun berada pada daerah yang berbeda dan dipisahkan oleh laut. Isolat *Xoo* yang diperoleh di lapangan menunjukkan variasi ras yang tinggi, berbeda dengan ras V, ras *Xa7*, dan ras VIII.

Kata kunci: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, HDB, Je1 Je2, Ras

ABSTRACT

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) is a bacteria that often infects the leaves of rice. In Indonesia, many field rice is attacked by these bacteria, causing the disease called bacterial leaf blight (BLB). This study aimed to characterize isolates of *Xoo* derived from some places in Indonesia using molecular marker. *Xoos* were isolated from the rice leaves to obtain pure cultures of them. To ensure they were *Xoo*, those *Xoos* then be identified using *Xoo2976* marker. The pure *Xoos* were amplified using *Jel1* and *Jel2* markers in PCR machine, then separated by 2% agarose gel. Scoring pattern of DNA bands was done by creating a binary number and used the NTSYS program to form a dendrogram. This study showed identification of *Xoo* bacterial using molecular marker highly effective and save time compared with the method of Koch's postulates. The genetic similarity of *Xoo* bacterial in Indonesia was caused by the same host, although located in different areas and were separated by the sea. *Xoo* isolates in the field showed a high variation race, different with race V, race Xa7, and race VIII.

Key words: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, BLB, *Jel1* *Jel2*, Ras

PENDAHULUAN

Hawar daun bakteri (HDB) yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (*Xoo*) merupakan penyakit penting pada pertanaman padi sawah. Penyakit HDB dapat mengurangi hasil panen padi dan kerugian yang ditimbulkan oleh penyakit ini lebih tinggi pada daerah tropis dibandingkan dengan daerah subtropis. Di Indonesia, penyakit ini menyebabkan kerugian hasil panen rata-rata sebesar 21–36% pada musim hujan dan sebesar 18–28% pada musim kemarau (Wahyudi *et al.*, 2011).

Deteksi dini untuk menentukan apakah bakteri yang diperoleh adalah *Xoo* atau bukan dapat dilakukan dengan metode PCR menggunakan marka-marka spesifik (Lang *et al.*, 2010; Osananya *et al.*, 2010). Metode konvensional untuk menentukan bakteri *Xoo* biasanya dilakukan dengan “Postulat Koch” yang memerlukan beberapa waktu yang lama (Kadir 2009). Untuk menentukan keragaman genetik bakteri *Xoo* juga telah didesain marka molekuler yang berbasis pada sekuen berulang (*repetitive sequence*) yang dimiliki oleh bakteri *Xoo*. Sebelum ditemukan primer-primer yang bisa digunakan di dalam teknik PCR untuk melihat keragaman genetik antar isolat *Xoo* digunakan teknik *shouthern blot* (RFLP) dengan menggunakan probe sebagai pelacak. Misalnya Leach *et al.* (1990, 1992) yang menggunakan probe pJEL101 untuk mendeteksi isolat HDB dari berbagai negara.

Analisis keragaman genetik isolat *Xoo* di Indonesia pernah dilakukan oleh Bustamam *et al.* (1997) dengan menggunakan metoda RFLP dengan probe pelacak

IS1113 terhadap 551 isolat HDB yang dikoleksi dari 23 kabupaten di Pulau Jawa dan 7 kabupaten di Pulau Bali. Dari 551 isolat tersebut dihasilkan 15 macam tipe profil DNA. Probe/marka IS1113 merupakan elemen repetitif/berulang di dalam genom *Xoo* dan juga merupakan elemen loncat/*transposable element*.

Selain IS1113, ada juga pelacak IS1112 yang telah dibuat primer untuk PCR, yang dikenal dengan marka Jel1 dan Jel2, sehingga pengerjaannya lebih cepat, efisien, dan ekonomis dibanding dengan RFLP (George *et al.*, 1996; Jalaluddin *et al.*, 2005). Pada penelitian yang dilakukan di Vietnam selatan (Furuya *et al.*, 2012) dilaporkan bahwa elemen berulang IS1112 ini dapat digunakan untuk menganalisis ras dari bakteri *Xoo* tersebut. Identifikasi ras ini dilakukan dengan menggunakan isolat bakteri yang telah diketahui rasnya sebagai standar/acuan. Identifikasi ras ini penting untuk menjadi rekomendasi padi apa saja yang dapat ditanam di daerah tersebut agar tidak terserang penyakit HDB. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengarakterisasi isolat-isolat *Xoo* dari beberapa wilayah di Indonesia menggunakan marka molekuler.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor, pada bulan Juni s.d. Desember 2014.

Bahan

Bakteri yang digunakan adalah koleksi bakteri *Xoo* yang disimpan dalam agar miring yang sebelumnya telah dilakukan isolasi dari daun padi yang terserang *Xoo*. Adapun koleksi dengan kode Xoo14 diambil dari daun padi di lapangan dan merupakan koleksi terbaru (Tabel 1), kemudian diidentifikasi menggunakan marka spesifik *Xoo2976* (Lang *et al.*, 2010).

Tabel 1. Daftar koleksi bakteri *Xoo* yang digunakan pada penelitian ini

No	Kode isolat	Inang	Lokasi
1	Xoo12-183	<i>Unknown</i>	Ds. Kalimanggis, Kec.Subah, Kab. Batang-Jateng
2	Xoo12-011	Asetona	Ds. Bolang-Bolang, Kec. Bonto Morano, Kab.Gowa-Sulsel
3	Xoo12-198	<i>Unknown</i>	Ds. Kalimanggis, Kec.Subah, Kab. Batang-Jateng
4	Xoo12-207	<i>Unknown</i>	Ds. Kalimanggis, Kec, Subah, Kab, Batang-Jateng

No	Kode isolat	Inang	Lokasi
5	Xoo12-286	Ciherang	Ds. Warung Nangka, Kec. Ciasem, Kab. Subang-Jabar
6	Xoo12-177	<i>Unknown</i>	Ds. Kauman, Kec. Batang, Kab. Batang-Jateng
7	Xoo12-001	Asetona	Ds. Bolang-Bolang, Kec. Bonto Morano, Kab.Gowa-Sulsel
8	Xoo14-114	Ciherang	Ds. Cigadung, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
9	Xoo12-208	<i>Unknown</i>	Ds. Kalimanggis, Kec.Subah, Kab. Batang-Jateng
10	Xoo14-136	Ciherang	Ds. Bayuning, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
11	Xoo14-122	Ciherang	Ds. Karang Tawang, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
12	Xoo14-156	Ciherang	Ds. Cimeong, Kec. Banjara, Kab. Majalengka-Jabar
13	Xoo14-146	Ciherang	Ds. Kadugede, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
14	Xoo14-080	Ciherang	Ds. Jatipamon, Kec. Talaga, Kab. Majalengka-Jabar
15	Xoo14-116	Ciherang	Ds. Cigadung, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
16	Xoo14-152	Ciherang	Ds. Cimeong, Kec. Banjara, Kab. Majalengka-Jabar
17	Xoo12-195	<i>Unknown</i>	Ds. Kalimanggis, Kec.Subah, Kab. Batang-Jateng
18	Xoo14-119	Ciherang	Ds. Cigadung, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
19	Xoo14-138	Ciherang	Ds. Bayuning, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
20	Xoo12-303	Inpari-13	Balai Besar Pelatihan Pertanian Batang Kaluku Gowa-Sulsel
21	Xoo12-200	<i>Unknown</i>	Ds. Kalimanggis, Kec.Subah, Kab. Batang-Jateng
22	Xoo14-148	Ciherang	Ds. Kadugede, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jateng

No	Kode isolat	Inang	Lokasi
23	Xoo14-135	Ciherang	Ds. Bayuning, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
24	Xoo14-130	Ciherang	Ds. Karang Tawang, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
25	Xoo14-200	Ciherang	Ds. Cigadung, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
26	Xoo14-132	Ciherang	Ds. Bayuning, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
27	Xoo14-024	Ciherang	Ds. Bayuning, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
28	Xoo14-189	Ciherang	Ds. Cigadung, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
29	Xoo14-131	Ciherang	Ds. Bayuning, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
30	Xoo14-126	Ciherang	Ds. Karang Tawang, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
31	Xoo12-086	<i>Unknown</i>	Ds. Sudiang, Kec. Bringkanaya, Makassar-Sulsel
32	Xoo12-012	Asetona	Ds. Bolang-Bolang, Kec. Bonto Morano, Kab. Gowa-Sulsel
33	Xoo12-302	Inpari-13	Balai Besar Pelatihan Pertanian Batang Kaluku Gowa-Sulsel
34	Xoo12-225	<i>Unknown</i>	Ds. Duwet, Kec. Pekalongan Selatan, Kab. Pekalongan-Jateng
35	Xoo12-031	<i>Unknown</i>	Ds. Sudiang, Kec. Bringkanaya, Makassar-Sulsel
36	Xoo12-285	Ciherang	Ds. Warung Nangka, Kec. Ciasem, Kab. Subang-Jabar
37	Xoo12-229	IR-64	Ds. Sawahan, Kec. Tulis, Kab. Batang-Jateng
38	Xoo14-125	Ciherang	Ds. Karang Tawang, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
39	Xoo14-006	Ciherang	Ds. Karang Tawang, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
40	Xoo14-079	Ciherang	Ds. Jatipamon, Kec. Talaga, Kab. Majalengka-Jabar
41	Xoo12-231	IR-64	Ds. Sawahan, Kec. Tulis, Kab. Batang-Jateng

No	Kode isolat	Inang	Lokasi
42	Xoo12-003	Asetona	Ds. Bolang-Bolang, Kec. Bonto Morano, Kab.Gowa-Sulsel
43	Xoo12-207	<i>Unknown</i>	Ds. Kalimanggis, Kec.Subah, Kab. Batang-Jateng
44	Xoo12-038	<i>Unknown</i>	Ds. Sudiang, Kec. Bringkanaya, Makassar-Sulsel
45	Xoo12-249	IR-64	Ds. Sawahan, Kec. Tulis, Kab. Batang-Jateng
46	Xoo11-003	Ciherang	Kab Cianjur-Jabar
47	Xoo12-190	<i>Unknown</i>	Ds. Kalimanggis, Kec.Subah, Kab. Batang-Jateng
48	Xoo12-086	<i>Unknown</i>	Ds. Sudiang, Kec. Bringkanaya, Kab. Makasar-Sulsel
49	Xoo14-163	Sidenok lokal	Ds. Cimeong, Kec. Banjaran, Kab. Majalengka-Jabar
50	Xoo11-021	Kuriak Putih	Maninjau-Sumbar
51	Xoo11-030	Kuriak Putih	Maninjau-Sumbar
52	Xoo12-021	<i>Unknown</i>	Ds. Sudiang, Kec. Bringkanaya, Makassar-Sulsel
53	Xoo12-230	IR-64	Ds. Sawahan, Kec. Tulis, Kab. Batang-Jateng
54	Xoo14-167	Sidenok lokal	Ds. Cimeong, Kec. Banjaran, Kab. Majalengka-Jabar
55	Xoo14-150	Ciherang	Ds. Kadugede, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
56	Xoo14-001	Ciherang	Ds. Karang Tawang, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
57	Xoo14-145	Ciherang	Ds. Kadugede, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
58	Xoo14-087	Ciherang	Ds. Banjaransari, Kec. Cikijing, Kab. Majalengka-Jabar
59	Xoo14-140	Ciherang	Ds. Bayuning, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
60	Xoo14-164	Sidenok lokal	Ds. Cimeong, Kec. Banjaran, Kab. Majalengka-Jabar
61	Xoo14-113	Ciherang	Ds. Cigadung, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar

No	Kode isolat	Inang	Lokasi
62	Xoo14-147	Ciherang	Ds. Kadugede, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
63	Xoo14-139	Ciherang	Ds. Bayuning, Kec. Kadugede, Kab. Kuningan-Jabar
64	Xoo14-113	Ciherang	Ds. Cigadung, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
65	Xoo14-007	Ciherang	Ds. Karang Tawang, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
66	Xoo14-121	Ciherang	Ds. Karang Tawang, Kec. Kuningan, Kab. Kuningan-Jabar
67	Xoo07-608		RAS V
68	Xoo93-229		RAS <i>Xa7</i>
69	Xoo08-024		RAS VIII

Metode

Identifikasi bakteri dari lapang (kode Xoo14, Tabel 1)

Sampel daun dari lapang diisolasi bakterinya menggunakan media tumbuh Wakimoto Agar (WA) (Bustamam *et al.*, 1997). Setelah diperoleh koloni tunggal kemudian dipindahkan ke media WA miring untuk proses pemurnian. Koloni tunggal yang berwarna kuning selanjutnya dipindahkan ke agar miring untuk selanjutnya digunakan untuk molekuler. Identifikasi bakteri dilakukan dengan menggunakan sel bakteri sebagai cetakan PCR. Marka yang digunakan untuk deteksi dini ini adalah: *Xoo2976F* (5'-GCCGTTTTTCTTCCTCAGC-3') dan *Xoo2976R* (3'-AGGAAAGGGTTTGTGG-AAGC-5') (Lang *et al.*, 2010).

Sekitar 100 µl suspensi bakteri dipanaskan sampai suhu 98°C selama 8 menit dan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 3 menit. Supernatan inilah yang dipakai untuk cetakan DNA (Furuya *et al.*, 2012). Kondisi PCR dilakukan untuk deteksi dini ini adalah 20 µl, yang berisi 2 µl 10 × bufer PCR, 0,4 µl 10 µM dNTP *mix*, 1 µl 5 µM primer *mix* (F+R), 1 µl GC rich dan 1 unit enzim Taq DNA polimerase. Profil PCR yang digunakan mengikuti prosedur Lang *et al.* (2010), yaitu denaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit, pengulangan siklus selama 31 kali, yakni denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik, dan perpanjangan primer pada suhu 68°C selama 2 menit. Perpanjangan akhir dilakukan pada suhu 68°C selama 10 menit.

Hasil PCR diwarnai bersama-sama dengan 1 kb *ladder* DNA dipisahkan dalam elektroforesis gel agarosa 2% dalam bufer 1× TAE. Koloni yang

menghasilkan pita berukuran 337 bp berarti positif bakteri *Xoo* (Lang *et al.*, 2010). Koloni bakteri ini selanjutnya dimurnikan lagi pada agar miring dan diperbanyak untuk kemudian diisolasi DNANYa untuk digunakan bersama koloni bakteri *Xoo* yang lain (kode selain Xoo14).

Isolasi DNA bakteri Xoo (untuk marka Jel1Jel2)

Isolasi DNA dilakukan mengikuti metode George *et al.* (1996) dan IRR1 (1995). Bakteri *Xoo* ditumbuhkan pada 10 ml *Nutrient Broth* (NB) selama semalam. Sel bakteri kemudian dipanen dengan menggunakan alat sentrifugasi. Sel yang sudah dikoleksi kemudian dilisis menggunakan 650 µl bufer ekstrak (100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1% SDS, 1% Polyvinilpyrrolidone) pada suhu 65°C selama 30 menit. Kemudian ditambahkan 100 µl 5M Potasium asetat lalu divortek agar tercampur rata. Setelah itu, dilakukan sentrifugasi 12.000 g selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifugasi ditransfer ke dalam tabung mikro baru sebanyak 700 µl dan dipresipitasi dengan isopropanol dingin. Endapan/pelet yang terbentuk kemudian dilarutkan dengan 1× bufer TE dan RNase 100 µl kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Larutan DNA selanjutnya ditambahkan Proteinase K 100 µl dengan konsentrasi 50 µg/ml kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C. Larutan DNA disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit, kemudian larutan dipindahkan ke tabung mikro baru.

Proses PCR

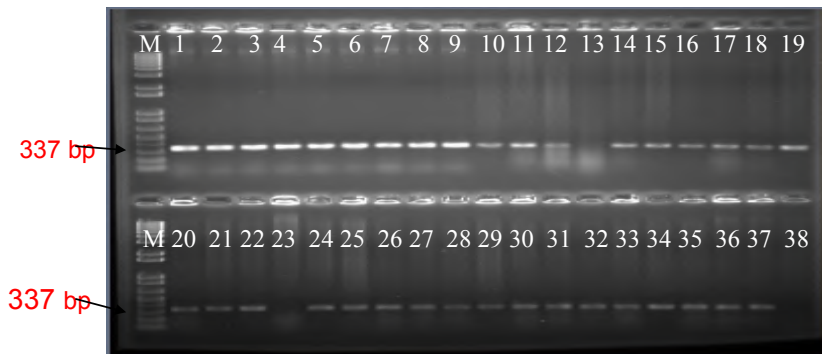
Amplifikasi PCR dilakukan dengan komposisi sbb: 5 µl (±50 ng) DNA sampel, 10× bufer PCR 2 µl, 10 mM dNTP *mix* 0,24 µl, 5 µM primer Jel1 1 µl, 5 µM primer Jel2 1 µl, GC Rich 1 µl, Kapa Taq 2 µl, dan $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ 9,56 µl. Profil PCR yang digunakan adalah suhu awal 94°C selama 3 menit, kemudian 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 10 detik, penempelan primer pada suhu 62°C selama 1 menit, perpanjangan primer pada suhu 65°C selama 8 menit, dan perpanjangan akhir pada suhu 65°C selama 8 menit (George *et al.*, 1996; Arif *et al.*, 2008). Hasil PCR diwarnai dengan *loading dye* dan selanjutnya bersama-sama dengan 1 kb *ladder* DNA kemudian dipisahkan pada gel agarosa 2% berukuran panjang. Gel diwarnai dengan Ethidium bromida dan divisualisasikan di bawah sinar UV pada alat Chemidoc Bio- Rad™.

Analisis menggunakan NTSys (Rohlf, 2005)

Keragaman genetik dianalisis menggunakan *software* NTSys versi 2.2. Hasil elektroforesis diskor berupa nilai 1 untuk keberadaan pita DNA yang muncul, dan 0 untuk ketiadaan pita DNA. Setelah itu data diolah menggunakan *software* NTSys.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi bakteri *Xoo* dengan menggunakan marka molekuler sudah mulai dipraktekkan oleh karena apabila menggunakan prosedur “Postulat Koch” akan memerlukan waktu yang lama. Berdasarkan penelitian Tasliah *et al.* (2013), penggunaan tiga marka spesifik (*Xoo2967*, *Xoo80*, dan *Xoo*) untuk mengidentifikasi bakteri HDB dari beberapa wilayah di Indonesia ternyata memberikan hasil yang sama persis, sehingga dapat disimpulkan menggunakan salah satu marka spesifik tersebut cukup untuk mengidentifikasi isolat *Xoo* yang diperoleh. Pada umumnya bakteri hawar daun setelah ditumbuhkan di media buatan akan berwarna kuning, namun koloni yang berwarna kuning belum tentu bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*), *Pseudomonas fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Burkholderia andropogonis*, dan *Erwinia herbicola* juga membentuk koloni kuning ketika dimurnikan (Lang *et al.*, 2010; Onasanya *et al.*, 2010). Untuk mengetahui apakah koloni kuning tersebut benar-benar *Xoo* perlu diujikan ke tanaman diferensial dari IIRI dan Indonesia (Kadir, 2009).



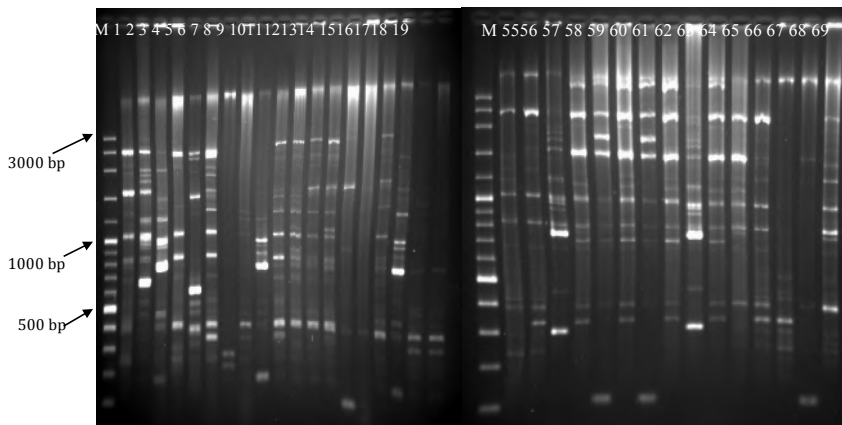
Gambar 1. Identifikasi dini isolat *Xoo* kode *Xoo14* dengan primer spesifik *Xoo2976*.

M = ladder DNA 1 kb, 1 = *Xoo14-114*, 2 = *Xoo14-136*, 3 = *Xoo14-122*, 4 = *Xoo14-156*, 5 = *Xoo14-146*, 6 = *Xoo14-080*, 7 = *Xoo14-116*, 8 = *Xoo14-152*, 9 = *Xoo14-189*, 10 = *Xoo14-119*, 11 = *Xoo14-138*, 12 = *Xoo14-148*, 13 = *Xoo14-021*, 14 = *Xoo14-130*, 15 = *Xoo14-200*, 16 = *Xoo14-132*, 17 = *Xoo14-024*, 18 = *Xoo14-018*, 19 = *Xoo14-131*, 20 = *Xoo14-126*, 21 = *Xoo14-125*, 22 = *Xoo14-006*, 23 = *Xoo14-114*, 24 = *Xoo14-163*, 25 = *Xoo14-135*, 26 = *Xoo14-167*, 27 = *Xoo14-150*, 28 = *Xoo14-001*, 29 = *Xoo14-145*, 30 = *Xoo14-087*, 31 = *Xoo14-140*, 32 = *Xoo14-164*, 33 = *Xoo14-113*, 34 = *Xoo14-147*, 35 = *Xoo14-139*, 36 = *Xoo14-079*, 37 = *Xoo14-007*, 38 = *Xoo14-121*.

Dari sekitar 200-an daun yang terkena infeksi HDB, hanya diperoleh sekitar 36 isolat HDB yang positif sebagai *Xoo*. Hasil identifikasi isolat *Xoo* berdasarkan

marka spesifik *Xoo2976* disajikan dalam Gambar 1. Kesulitan dalam pelaksanaan metode ini adalah menjaga kemurnian isolat *Xoo* yang dihasilkan. Pola serangan yang terjadi pada tanaman diferensial akan menunjukkan bakteri yang diperoleh benar-benar *Xoo* atau bukan. Berdasarkan Gambar 1 dari 38 isolat yang dimurnikan ternyata hanya dua isolat yang bukan *Xoo* (*Xoo14-021* [13] dan *Xoo14-114* [23]). Ketiga puluh enam isolat yang diamplifikasi menggunakan marka spesifik *Xoo2967* dinyatakan positif isolat *Xoo* karena menghasilkan pita dengan ukuran 337 bp, sesuai dengan Lang *et al.* (2010). Pita selain ukuran tersebut atau tidak muncul menunjukkan isolat yang digunakan bukan *Xoo*. Kedua isolat yang bukan *Xoo* tersebut tidak diikuti di dalam PCR menggunakan marka Jel1 dan Jel2.

Hasil PCR menggunakan marka Jel1 dan Jel2 yang mengamplifikasi elemen berulang IS1112 pada isolat *Xoo* menunjukkan bahwa terdapat 23 posisi pita (Gambar 2). Jumlah pita hasil dari PCR dan elektroforesis pada agarosa 2% adalah 557 pita. Terdapat sedikitnya 2 hingga 13 posisi pita yang berbasis elemen berulang pada suatu isolat *Xoo*. Posisi pita tersebar dari ukuran 100 bp hingga 5.000 bp. Hasil pengelompokan isolat-isolat *Xoo* dari berbagai wilayah di Indonesia (Gambar 3) dihasilkan dari program NTSys menggunakan koefisien kesamaan “Dice”, dan metode pengelompokan UPGMA. Oleh karena terdapat kelompok-kelompok kecil di dalam dendrogram maka dilakukan tabulasi pada tingkat kesamaan 25%, 50%, dan 75% .



Gambar 2. Elektroforesis isolat-isolat *Xoo* dengan marka Jel1 dan Jel2
M = ladder DNA 1 kb (1 kb DNA ladder),
 1 – 19 dan 55 – 69 = isolat *Xoo* yang merujuk pada Tabel 1

Pita DNA yang dihasilkan tiap isolat *Xoo* setelah diamplifikasi menggunakan marka Jel1 dan Jel2 berjumlah banyak, lebih dari satu pita (Gambar 2), mirip yang dihasilkan oleh marka RAPD atau AFLP. Genom *Xoo* yang hanya 4–5 juta bp (Lee *et al.*, 2005; Ochiai *et al.*, 2005), dibanding dengan genom padi yang 430

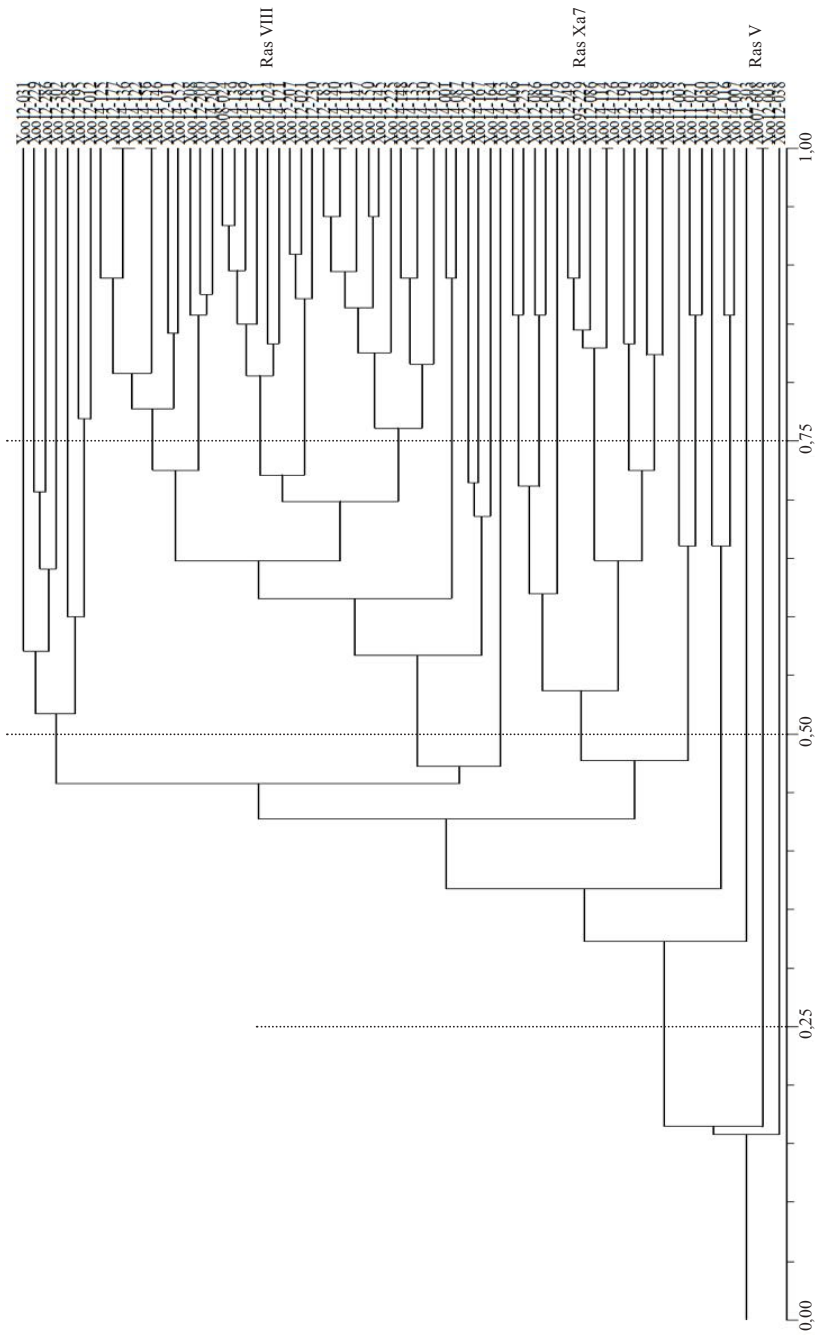
juta bp. Salzbreg *et al.* (2008) sudah berhasil mensekuen genom bakteri *Xoo* asal Filipina menyebutkan elemen berulang IS1112 (dasar penyusunan sekuen marka Jel1 dan Jel2) berjumlah sangat banyak. Oleh karena itulah hasil amplifikasi pada bakteri *Xoo* pada penelitian ini menghasilkan pita yang sangat banyak.

Hasil analisis kekerabatan menggunakan koefisien kesamaan “Dice” dan metode UPGMA pada program NTSys versi 2.2 menghasilkan banyak kelompok (Gambar 3). Pada tingkat kesamaan 25% isolat *Xoo* terbagi ke dalam 3 kelompok, pada tingkat 50% terbagi ke dalam 9 kelompok, dan pada tingkat 75% terbagi ke dalam 29 kelompok. Apabila dilihat berdasarkan daerah *Xoo* yang diambil ternyata ketiga tingkat kesamaan tersebut tidak ada yang terdistribusi spesifik lokasi. Misal, tidak ada satu kelompok berisi *Xoo* dari Makasar saja, atau berisi dari Jawa Barat saja. Ternyata *Xoo* yang diperoleh dari Makasar bisa terkelompok bersama *Xoo* dari Jawa Barat. Hal ini memberikan gambaran sebaran genetik *Xoo* di wilayah Indonesia adalah sama, walaupun masing-masing pulau di Indonesia dipisahkan oleh lautan yang luas. Penyebaran *Xoo* dengan tingkat kesamaan genetik yang sama barangkali disebabkan oleh penyebaran benih yang berlaku secara nasional dan iklim antarpulau yang tidak jauh berbeda. Indonesia hanya mengenal dua musim, yakni musim kemarau dan penghujan. Antara ujung barat dan ujung timur, utara dan selatan juga tidak memiliki perbedaan iklim yang ekstrim. Di samping itu, pertanaman padi di seluruh wilayah Indonesia tidak mengacu pada varietas lokal, tetapi varietas dengan skala nasional, misal Ciherang. Benih sumber yang dihasilkan oleh BB Padi dan dikembangkan di seluruh wilayah Indonesia apabila terkontaminasi oleh bakteri *Xoo*, walaupun hanya satu sel akan membantu penyebarluasan *Xoo* dari satu tempat ke seluruh wilayah Indonesia. Pada penelitian *Xoo* antarnegara dengan iklim yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan *Xoo* secara ekstrim. Hal ini dibuktikan oleh Jalaluddin *et al.* (2005) dalam penelitiannya yang berhasil memisahkan antara isolat-isolat *Xoo* dari Bangladesh dan dari Jepang dengan menggunakan marker Jel1 dan Jel2. Terdapat dua kelompok besar yang berisi isolat *Xoo* dari masing-masing negara.

Beberapa *Xoo* yang diambil dari padi lokal menunjukkan perbedaan dengan *Xoo* dari Ciherang. Misal, *Xoo* dari padi lokal Kuriak Putih (Maninjau, Sumbar) mengelompok tersendiri terpisah dengan *Xoo* dari padi Ciherang pada tingkat kesamaan 75%, demikian pula *Xoo* dari padi lokal Sidenok (Majalengka, Jabar) terkelompok tersendiri. Hal ini menunjukkan tipe *Xoo* dari padi lokal berbeda dengan *Xoo* dari varietas nasional. Namun, pada padi lokal Asetona isolat yang diambil ternyata tidak terkelompok ke dalam satu kelompok, tapi menyebar ke beberapa kelompok.

Apabila dilihat berdasarkan Ras terdapat tiga kelompok, yakni (i) kelompok ras V yang terdiri dari satu dan identik 100%, yakni Xoo12-003 dari padi Asetona (Kab. Gowa, Sulsel), (ii) kelompok ras *Xa7* yang terdiri dari Xoo12-086 yang tidak diketahui nama padinya (Makasar, Sulsel), Xoo14-114 dan Xoo14-126

(identik 100%) yang berasal dari satu kabupaten (Kuningan, Jabar), dan (iii) kelompok ras VIII terdiri dari lima Xoo 14-139, Xoo14-189, Xoo14-131, Xoo14-024, dan Xoo14-121) yang berasal dari Kuningan, Jabar. Isolat-isolat tersebut dapat digunakan sebagai sumber inokulum untuk masing-masing ras.



Menurut Gupta *et al.* (2001) metode DNA *fingerprinting* menggunakan marka Jel1 dan Jel2 tersebut memang sangat efektif untuk pengelompokan berdasarkan ras sehingga saat terdapat isolat yang belum teridentifikasi ras, akan memudahkan bakteri *Xoo* tersebut dalam pengklasifikasian ras pada penelitian selanjutnya. Hasil penelitiannya menunjukkan pada tingkat kesamaan 57% dihasilkan 5 kelompok dengan masing-masing kelompok berisi isolat yang sudah diketahui ras nya dengan uji terhadap padi diferensial sebelumnya. Dalam kelompok tersebut masing-masing berisi isolat dengan ras yang sama. Pada penelitian ini, sebagian besar isolat *Xoo* belum diketahui ras-nya, sehingga diharapkan dengan pengelompokan ini dapat menjadi acuan untuk diuji terhadap satu set padi diferensial dan dibuktikan apakah pengelompokan berdasarkan elemen berulang IS1112 ini bisa menjadi acuan identifikasi ras dengan *fingerprint* elemen berulang IS1112 seperti yang telah dilakukan di Negara, India, Filipina, Korea, dan Jepang.

KESIMPULAN

1. Identifikasi bakteri *Xoo* dengan menggunakan marka molekuler sangat efektif dan menyingkat waktu dibanding dengan metode Postulat Koch.
2. Kesamaan genetik bakteri *Xoo* di Indonesia lebih disebabkan oleh inang yang sama, walaupun berada pada daerah yang berbeda dan dipisahkan oleh laut.
3. Isolat *Xoo* yang diperoleh di lapangan menunjukkan variasi ras yang tinggi, berbeda dengan ras V, ras *Xa7*, dan ras VIII.

DAFTAR PUSTAKA

- Arif, M., M. Jaffar, M. Babar, M.A. Sheikh, S. Kousar, A. Arif and Y. Zafar. 2008. Identification of bacterial blight resistance genes *Xa4* in Pakistani rice germplasm using PCR. *African Journal of Biotechnology* 7(5):541-545.
- Bustamam, M., M. Yunus, A. Warsun, Suwarno, H.R. Hifni dan T.S. Kadir. 1997. Penggunaan marka molekuler dalam perbaikan ketahanan varietas padi terhadap penyakit hawar daun bakteri di Indonesia. *Dalam*: S. Moeljopawiro, M. Herman, S. Saono, B. Purwantara, dan H. Kasim (Editor). Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia, Surabaya, 12-14 Maret 1997. Halaman:174-184.
- Furuya, N., S. Taura, T. Goto, B.T. Thuy, P.H. Ton, K. Tsuchiya and A. Yoshimura. 2012. Diversity in virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from Northern Vietnam. *Japan Agricultural Research Quarterly* 46(4):329-338.
- George, M.L.C., M. Bustamam, W.T. Cruz, J.E. Leach and R.J. Nelson. 1997. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Southeast Asia detected using PCR-based DNA fingerprinting. *Phytopathology* 87(3):302-309.

- Gupta, V.S., M.D. Rajebhosale, M. Sodhi, S. Singh, S.S. Gnanamanickam, H.S. Dhaliwal and P.K. Ranjekar. 2001. Assessment of genetic variability and strain identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* using RAPD-PCR and IS1112-based PCR. *Current Science* 80(8):1043-1049.
- International Rice Research Institute. 18 Agustus 2014. The Importance of Rice. http://www.knowledge-bank.irri.org/ericeproduction/Importance_of_Rice.htm.
- Jalaluddin, M., T. Yamamoto, H. Nakai and S. Tsuyumu. 2005. Pathogenic variability and DNA fingerprinting of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from Bangladesh. *Sabrao Journal of Breeding and Genetics* 37(1):1-10.
- Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS). 23 Juni 2014. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* genetic database. <http://microbe.dna-affrc.go.jp/Xanthomonas/xantho/>.
- Lang, J.M., J.P. Hamilton, M.G.Q. Diaz, M.A.V. Sluys, M.R.G. Burgos, C.M.V. Cruz, C.B. Buell, N.A. Tiserat and J.E. Leach. 2010. Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X.oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant Disease* 94:311-319.
- Leach, J.E., F.F. White, M.L. Rhoads and H. Leung. 1990. A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovar of *X. campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 3(4):238-246.
- Leach, J.E., M.L. Rhoads, C.M. Vera Cruz, F.F. White, T.W. Mew and H. Leung. 1992. Assesment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with repetitive DNA element. *Applied and Environmental Microbiology* 58(7):2188-2195.
- Lee, B.M., Y.J. Park, D.S. Park, H.W. Kang, J.G. Kim, E.S. Song, I.C. Park, U.H. Yoon, J.H. Hahn, B.S. Koo, G.B. Lee, H. Kim, H.S. Park, K.O. Yoon, J.H. Kim, C.H. Jung, N.H. Koh, J.S. Seo and S.J. Go. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research* 33(2):577-586.
- Kadir, T.S. 2009. Menangkal HDB dengan menggilir varietas. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 31(5):1-3.
- Ochiai, H., V. Inoue, M. Takeya, A. Sasaki and H. Kaku. 2005. Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. *Japan Agricultural Research Quarterly* 39:275-287.
- Onasanya, A., A. Basso, E. Somado, E.R. Gasore, F.E. Nwilene, I. Ingelbrecht, J. Lamo, K. Wydr, M.M. Ekperigin, M. Langa, O. Oyelakin, Y. Sete, S. Winter and R.O. Onasanya. 2010. Development of combined molecular diagnostic and DNA fingerprinting technique for rice bacteria pathogens in Africa. *Biotechnology* 9(2): 89-105.

- Rohlf, F.J. 2005. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.2. Exeter Software, Setauket, NY.
- Salzberg, S.L., D.D. Sommeri, M.C. Schatzi, A.M. Philippy, P.D. Rabinowicz, S. Tsuge, A. Furutani, H. Ochiai, A.L. Delcher, D. Kelley, R. Madupu, D. Puiu, D. Radune, M. Shumway, C. Trapnell, G. Apanas, G. Jha, A. Pandey, P.B. Patils, H. Ishihara, D.F. Meyer, B. Szureki, V. Verdier, R. Koebnik, J.M. Dow, R.P. Ryan, H. Hirata, S. Tsuyumu, S.W. Lee, P.C. Ronald, R.V. Sontis, M.V. Sluyo, J.E. Leach, F.F. White and A.J. Bogdanove. 2008. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics* 9(204):1-16.
- Shanti, M.L., M.L.C. George, C.M. Vera Cruz, A. Bernardo, R.J. Nelson and H. Leung. 2001. Identification of resistance genes effective against rice bacterial blight pathogen in Eastern India. *Plant Disease* 85(5):506-512.
- Tasliah, Mahruf dan J. Prasetyono. 2013. Identifikasi molekuler bakteri hawar daun (*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*) dan uji patogenitasnya pada galur-galur padi iosgenik. *Jurnal AgroBiogen* 9(2):49-57.
- Wahyudi, A.T., S. Meliah dan A.A. Nawangsih. 2011. *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* bakteri penyebab hawar daun pada padi: Isolasi, karakterisasi, dan telaah mutagenesis dengan transposon. *Makara Sains* 15(1):89-96.