



**KARAKTERISASI ISOLAT *Xanthomonas oryzae* pv.
oryzae YANG MENYERANG TANAMAN PADI
DI KABUPATEN JEMBER MENGGUNAKAN
TEKNIK RAPD (*Random Amplified
Polymorphic DNA*)**

SKRIPSI

Oleh

**Fadilla Nuraini
NIM 111510501052**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**KARAKTERISASI ISOLAT *Xanthomonas oryzae* pv.
oryzae YANG MENYERANG TANAMAN PADI
DI KABUPATEN JEMBER MENGGUNAKAN
TEKNIK RAPD (*Random Amplified
Polymorphic DNA*)**

SKRIPSI

diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk menyelesaikan
Program Sarjana pada Program Studi Agroteknologi (S1)
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh

Fadilla Nuraini
NIM 111510501052

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fadilla Nuraini

NIM : 111510501052

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: **Karakterisasi Isolat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang Menyerang Tanaman Padi di Kabupaten Jember Menggunakan Teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)** adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap dan etika ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 17 Agustus 2015

Yang menyatakan,

Fadilla Nuraini

NIM. 111510501052

SKRIPSI

**KARAKTERISASI ISOLAT *Xanthomonas oryzae* pv.
oryzae YANG MENYERANG TANAMAN PADI
DI KABUPATEN JEMBER MENGGUNAKAN
TEKNIK RAPD (*Random Amplified
Polymorphic DNA*)**

Oleh

Fadilla Nuraini
NIM 111510501052

Pembimbing

Pembimbing Utama : Hardian Susilo Addy, SP., MP. Ph.D.
NIP. : 198011092005011001

Pembimbing Anggota : Ir. Abdul Majid, MP
NIP. : 19670906 199203 1004

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “ Karakterisasi Isolat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang Menyerang Tanaman Padi di Kabupaten Jember Menggunakan Teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) “ telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian pada:

hari, tanggal : Senin, 14 September 2015

tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Hardian Susilo Addy, SP. MP.PhD.
NIP. 19801109 200501 1 001

Ir. Abdul Majid, MP.
NIP. 19670906 199203 1 004

Dosen Penguji,

Ir. Tatang Pranata, Dip.Agr
NIP. 19580316 198602 1 001

Mengesahkan
Dekan,

Dr. Ir. Jani Januar, MT.
NIP. 19590102 198803 1 002

RINGKASAN

Karakterisasi Isolat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang Menyerang Tanaman Padi di Kabupaten Jember Menggunakan Teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); Fadilla Nuraini; 111510501052; Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Padi merupakan komoditas yang sangat penting karena menjadi bahan makanan pokok penduduk Indonesia. Oleh karena itu produksi padi harus selalu meningkat dan berkesinambungan. Upaya peningkatan produksi padi nasional dihadapkan pada berbagai permasalahan salah satunya adanya penyakit penting pada tanaman padi yaitu hawar daun bakteri. Hawar daun bakteri disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang memiliki kemampuan tinggi dalam membentuk strain baru di lapang. Munculnya strain baru memerlukan teknik diagnosis yang erat kaitannya dengan deteksi dan identifikasi. Seiring dengan perkembangan teknologi dalam bidang mikrobiologi, berbagai teknik identifikasi dan deteksi telah dikembangkan mengenai analisis genetik dan identifikasi molekular isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* melalui teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

Sampel diambil dari 5 kecamatan dengan 5 varietas yang berbeda, yaitu Rambipuji dengan varietas Wayapuburu, Arjasa dengan varietas Situbagendit, Tempurejo dengan varietas pandanwangi, Tanggul dengan varietas Cihorang dan Puger dengan varietas Cibogo. Metode pertama yaitu penghitungan intensitas serangan pada masing- masing sampel, kemudian bakteri diisolasi dari daun yang bergejala hawar daun bakteri dan ditumbuhkan pada media *Yeast Dextrose Agar*. Setelah itu dilakukan pengujian Gram bakteri dan uji hidrolisis pati, kemudian dianalisis menggunakan teknik RAPD untuk mengetahui keragaman genetik masing- masing isolat.

Hasil pengamatan intensitas serangan pada masing-masing sampel menunjukkan bahwa besarnya intensitas serangan dipengaruhi oleh beberapa

faktor diantaranya lokasi pengambilan sampel, tingkat ketahanan suatu varietas padi dan usia tanaman padi. Masing- masing isolat menunjukkan ciri koloni berwarna kuning, bulat, cembung dan berlendir, uji Gram negatif, serta tidak menghidrolisis pati. Hasil analisis menggunakan RAPD menunjukkan kelima isolat merupakan isolat yang berbeda secara genetik, dilanjut dengan penghitungan menggunakan Metode Jaccard dan pembuatan *Phenogram similarity* yang menunjukkan kelima isolat terbagi menjadi 3 kelompok yang berbeda secara genetik, Kelompok A yaitu isolat dari Rambipuji dan tempurejo, Kelompok B yaitu Arjasa dan Puger, serta Kelompok C yaitu Tanggul.



SUMMARY

Characterization of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Isolated from Rice Plant in Jember Region Using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Technique; Fadilla Nuraini; 111510501052; Agrotechnology study program; Faculty of Agriculture, Jember University.

Rice is important commodity because it is used as Indonesian staple food. The rice production has to be increased and sustainable. However, efforts to increase of national rice production have some problems, one of them is the presence of important disease which is bacterial leaf blight (BLB) of rice plants. BLB disease is caused by *X. oryzae* pv. *oryzae*, it has high potency to form a new strain on rice field. The appearance of a new strain needs diagnosis techniques that correlated with detection and identification. Some of identification and detection techniques have evolve regarding genetic analysis and molecular identification of isolates *X. oryzae* pv. *oryzae* through RAPD technique.

Samples were taken from 5 subdistrict with different varieties, which were Rambipuji with Wayapuburu variety, Arjasa with Situbagendit variety, Tempurejo with Pandanwangi variety, Tanggul with Ciherang variety and Puger with Cibogo variety. First step was assesment of disease severity of each sample, following by isolation from leaves that have bacterial leaf blight symptom on YDA (Yeast Dextrose Agar) medium. Bacteria then was tested using KOH 3%, starch hydrolysis, and analysed using RAPD technique to compare genetic polymorphism of each isolate.

The observation result of disease severity from every sample showed that the value of disease severity depend on some factors, which were place of taking samples, level of rice variety resistance and age of rice plants. All isolates showed yellow in colour, convex, round, mucoid, Gram negative and did not starch hydrolysis. The result analysis of RAPD showed that 5 isolates were genetically different based on Jaccard Method and Phenogram Similarity showed and could

be divided into 3 groups as, Group A were isolates from Rambipuji and Tempurejo, Group B were Arjasa and Puger, and Group C was Tanggul.



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sholawat serta salam atas junjungan Nabi Muhammad SAW, sehingga penyusunan skripsi dengan judul Karakterisasi Isolat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang Menyerang Tanaman Padi di Kabupaten Jember Menggunakan Teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) dapat diselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) sebagai sarjana pertanian di Fakultas Pertanian Universitas Jember.

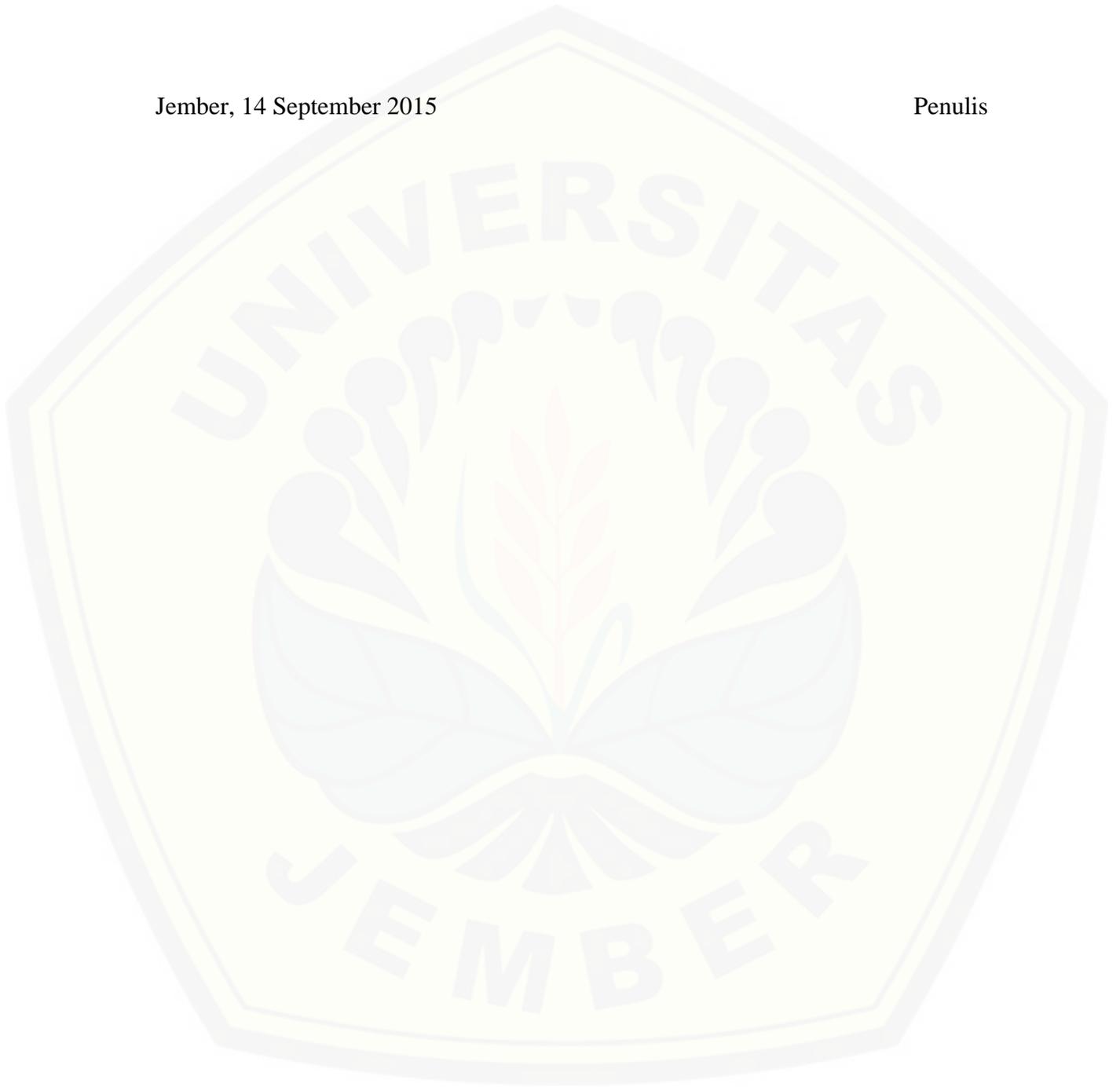
Beberapa pihak turut membantu penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Jani Januar. MT. selaku Dekan Fakultas Pertanian
2. Hardian Susilo Addy SP. MP.PhD. selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU), Ir. Abdul Majid, MP. selaku selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) dan Ir. Tatang Pranata, Dip.Agr. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, peningkatan wawasan, keterampilan, dan motivasi dalam pelaksanaan penelitian serta penyelesaian skripsi;
3. Ummi Sholikhah SP, MP. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
4. Prof. Dr. Bambang Sugiarto, M.Agr.Sc selaku Ketua CDAST yang telah membantu dan memberikan izin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di CDAST;
5. Orangtua saya bapak Panut dan Ibu Ambarwati, adik saya Putri Ayundari yang telah memberikan dukungan, doa dan semangat sehingga proses penyelesaian skripsi dapat berjalan dengan lancar.
6. Serta semua pihak yang telah memberikan saran, kritik dan motivasi selama di Universitas Jember.

Akhirnya penulis berharap semoga Karya Ilmiah (Skripsi) ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan dapat digunakan sebagai acuan penelitian-penelitian selanjutnya.

Jember, 14 September 2015

Penulis



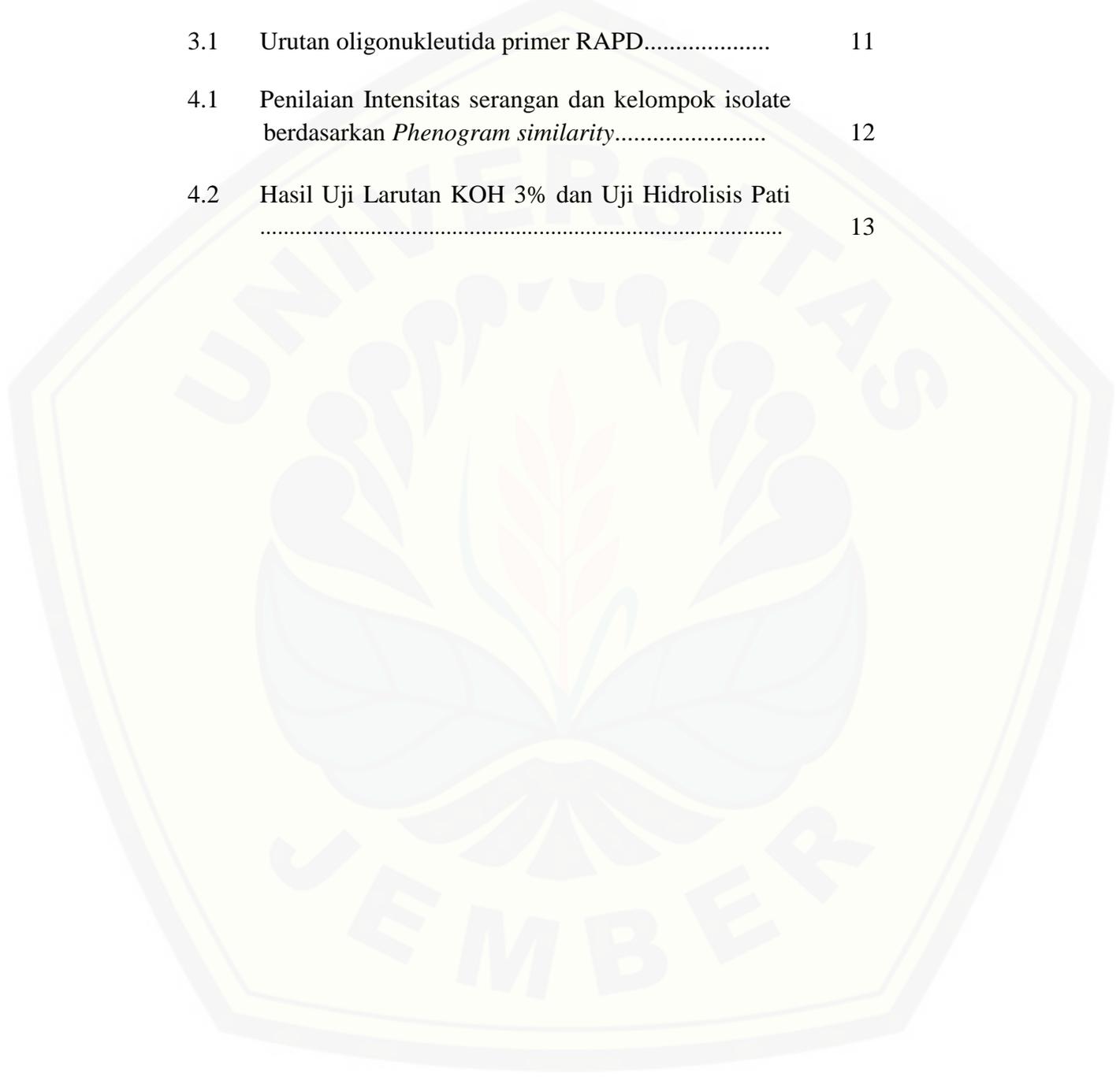
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN.....	ii
HALAMAN PEMBIBINGAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
RINGKASAN	v
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Penyakit Hawar Daun Bakteri	3
2.2 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	3
2.3 Karakterisasi strain <i>X. oryzae</i>	4
2.4 PCR-RAPD	5
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	7
3.1 Waktu dan Tempat.....	7
3.2 Bahan dan Alat	7
3.2.1 Bahan.....	7
3.2.2 Alat.....	7
3.3 Metode Penelitian	7
3.3.1 Pengambilan sampel	7
3.3.2 Penilaian Intensitas Serangan	8
3.3.3 Isolasi Bakteri	9
3.3.4 Uji Gram	9
3.3.5 Uji Hidrolisis pati	10
3.3.6 Ekstraksi DNA.....	10
3.3.7 PCR-RAPD.....	11
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	12
4.1 Hasil	12
4.2 Pembahasan	14
BAB 5. PENUTUP.....	17
5.1 Kesimpulan dan Saran	17
DAFTAR PUSTAKA	18



DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
3.1	Urutan oligonukleotida primer RAPD.....	11
4.1	Penilaian Intensitas serangan dan kelompok isolate berdasarkan <i>Phenogram similarity</i>	12
4.2	Hasil Uji Larutan KOH 3% dan Uji Hidrolisis Pati	13



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
3.1	Lokasi daerah pengambilan sampel.....	8
3.2	Plot pengambilan sampel.....	8
4.1	Gejala HDB pada daun padi.....	12
4.2	Isolat <i>X. oryzae</i>	13
4.3	Visualisasi hasil PCR RAPD Primer 5 pada gel agarose 1,2 % dan <i>Phenogram similarity X. oryzae</i> menggunakan analisis kluster DendroUPG.....	14

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Padi merupakan komoditas yang sangat penting karena menjadi bahan makanan pokok penduduk Indonesia (Djarmiko *dkk.*, 2011). Oleh karena itu produksi padi di Indonesia harus selalu meningkat dan berkesinambungan. Produksi padi di Indonesia tahun 2013 dengan luas panen 13.835.252 ha adalah sebesar 71.279.709 ton (BPS, 2013). Pada tahun 2014 produksi padi di Indonesia mengalami penurunan menjadi 69.870.950,40 ton dengan luas panen 13.569.941 ha (BPS, 2014). Upaya peningkatan produksi padi nasional dihadapkan pada beberapa permasalahan seperti adanya alih fungsi lahan pertanian, produktivitas lahan yang semakin menurun serta serangan hama dan penyakit. Salah satu penyakit penting pada tanaman padi yaitu hawar daun bakteri (HDB) atau penyakit kresek (Wahyudi *dkk.*, 2011).

Penyakit kresek atau yang dikenal dengan hawar daun bakteri disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* (Suryadi *dkk.*, 2006). Kehilangan hasil yang diakibatkan oleh penyakit kresek di Indonesia mencapai 70–80%, hal ini tergantung pada stadium pertumbuhan tanaman yang terinfeksi, tingkat kerentanan kultivar padi, dan kondisi lingkungan (Wahyudi *dkk.*, 2011). Susanto dan Sudir (2012) melaporkan bahwa ambang kerusakan penyakit HDB 20% pada dua minggu sebelum panen, di atas ambang tersebut setiap kenaikan keparahan penyakit 10% akan meningkatkan kehilangan hasil 5-7%.

Bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae* mempunyai kemampuan yang tinggi dalam mengubah virulensi dan membentuk strain baru di lapang sejalan dengan perkembangan penggunaan varietas padi. Hal ini menyebabkan ketahanan varietas padi seringkali menurun (Suryadi *dkk.*, 2006). Berbagai upaya pengendalian penyakit hawar daun bakteri telah dilakukan, diantaranya peramalan datangnya serangan patogen, sanitasi dipertanaman padi, penggunaan kombinasi agensia antagonis serta penggunaan varietas tahan (Djarmiko dan Fatichin, 2009).

Sumber ketahanan terhadap penyakit hawar daun bakteri telah teridentifikasi di negara penanam padi di Asia, namun demikian pemuliaan padi untuk ketahanan terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae* masih dalam tahap awal (Djarmiko dan Fatichin, 2009). Sampai saat ini perbedaan antar strain *X. oryzae* pv. *oryzae* belum dapat diketahui dengan jelas (Suryadi, 2006). Munculnya strain baru memerlukan teknik diagnosis yang erat kaitannya dengan deteksi dan identifikasi. Identifikasi diperlukan terhadap isolat bakteri, sehingga validitas isolat dapat dilanjutkan kepada uji kelompok strain yang telah diketahui. Seiring dengan perkembangan teknologi dalam bidang mikrobiologi, berbagai teknik identifikasi dan deteksi telah dikembangkan mengenai analisis genetik dan identifikasi molekuler isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* melalui teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Onasanya dkk., 2013).

Penanda molekuler RAPD dihasilkan melalui proses amplifikasi DNA secara invitro dengan *Polymerase chain reaction* (PCR) (Karsinah, 2002). Menurut Demeke dan Adams (1994) prosedur RAPD lebih murah, lebih cepat, membutuhkan sampel DNA lebih rendah (0,5-50 ng), tidak memerlukan radioisotop, dan tidak membutuhkan keahlian untuk pelaksanaannya. Berdasarkan pemikiran di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi dan karakterisasi strain *X. oryzae* pv. *oryzae* di Kabupaten Jember untuk mengetahui keragaman genetik isolat *X. oryzae* pv. *oryzae*.

1.2 Perumusan Masalah

1. Bagaimana intensitas penyakit hawar daun bakteri di Kabupaten Jember?
2. Bagaimana keragaman genetik *X. oryzae* pv. *oryzae* yang menyerang tanaman padi di Kabupaten Jember?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik dari *X. oryzae* pv. *oryzae* yang menyerang tanaman padi di Kabupaten Jember. Hasil penelitian dapat bermanfaat sebagai sumber informasi bagi pemulia tanaman untuk merakit varietas unggul baru yang membawa gen tahan terhadap strain *X. oryzae* pv. *oryzae* yang menyerang tanaman padi di Kabupaten Jember.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Hawar daun bakteri

Penyakit Hawar daun bakteri merupakan penyakit utama padi sawah di Indonesia yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Menurut Ou (1985) penyakit HDB pertama kali ditemukan di Indonesia pada tahun 1948/1949 pada musim hujan, pada waktu itu penyakit ini disebut sebagai kresek atau hama lodoh dan diamati di Indonesia pertama kali pada tahun 1988 (Mew, 1988). Kresek merupakan salah satu jenis gejala dari HDB yakni serangan HDB terjadi pada masa pembibitan, yang menyebabkan daun pada tanaman menjadi kuning pucat, layu, dan mati. Kresek merupakan gejala penyakit yang paling destruktif, sedangkan HDB adalah gejala yang lebih umum. Infeksi terjadi pada tanaman padi setelah pembibitan hingga dewasa (Mew *dkk.*, 1993).

Gejala diawali berupa bercak kebasahan berwarna keabu-abuan pada satu atau kedua sisi daun, biasanya dimulai dari pucuk daun atau beberapa sentimeter dari pucuk daun. Bercak ini kemudian berkembang meluas ke ujung dan pangkal daun dan melebar. Bagian daun yang terinfeksi berwarna hijau keabu-abuan dan agak menggulung, kemudian mengering dan berwarna abu-abu keputihan. Pada tanaman yang rentan, gejala ini terus berkembang hingga seluruh daun menjadi kering dan kadang-kadang sampai pelepah. Pada pagi hari saat cuaca lembap dan berembun, eksudat bakteri sering keluar ke permukaan, bercak berupa cairan berwarna kuning dan pada siang hari setelah kering menjadi bulatan kecil berwarna kuning. Eksudat ini merupakan kumpulan massa bakteri yang mudah jatuh dan tersebar oleh angin dan gesekan daun. Percikan air hujan menjadi pemicu penularan yang sangat efektif (Nuryanto dan Kadir, 2012).

2.2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Penyakit hawar daun bakteri atau *Bacterial Leaf Blight* (BLB) pertama kali ditemukan di Fukuoka Jepang pada tahun 1884 (EPPO, 2007). Penyakit ini

disebabkan oleh bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae*. Bakteri *X. oryzae* merupakan bakteri Gram negatif, aerobik, berbentuk batang dengan ukuran (0,4 - 0,7 × 0,7 – 1,8 µm) dengan flagel polar tunggal. Koloni pada media padat mengandung glukosa berbentuk bulat, cembung, berlendir dan berwarna kuning karena memproduksi pigmen xanthomonadin (Bradury, 1986).

Cara kerja patogen HDB masuk ke dalam tubuh inang melalui luka atau rongga yang terbuka secara alami atau mekanis, kemudian patogen ini masuk ke dalam jaringan tanaman dan memperbanyak diri (Huang, 1986). Luka secara mekanis akan lebih cepat bereaksi pada tanaman dibanding luka secara alami. Sedangkan Ou (1985) menyatakan bahwa HDB merupakan penyakit jaringan pembuluh yang masuk melalui luka mekanis yang sering terjadi pada daun dan akar. Pada tanaman yang peka, bakteri HDB menumpuk pada jaringan xilem (Kaku, 1993).

2.3 Karakterisasi strain *X.oryzae*

Bakteri *X. oryzae* berbentuk batang, memiliki ujung bulat, sel tunggal memiliki panjang 2.0 µm -7.0 µm, lebar 0,4 µm-0.7 µm. Sel bergerak dengan menggunakan flagela tunggal yang berada di ujung sel (*monotrichous*). Pada media padat sel *X. oryzae* berbentuk cembung, bulat, berlendir, dan berwarna kuning karena menghasilkan pigmen xanthomonadin. *X. oryzae* merupakan bakteri aerob obligat yakni bakteri yang memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya dan tidak membentuk spora. Suhu optimal untuk tumbuh 25-30°C (Liu, 2006).

Penyebaran bakteri *X. oryzae* dari setiap tanaman dipengaruhi oleh angin, hujan, air, irigasi adanya singgungan antar daun padi, petani dan hama (Liu, 2006). Bakteri *X. oryzae* diketahui merupakan bakteri yang memiliki patotipe yang tinggi. Telah dilaporkan bahwa terdapat 30 strain *X. oryzae* yang berbeda dari beberapa negara. Kadir (2009) melaporkan di Indonesia terdapat 8 strain *X. oryzae* (II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII) di berbagai wilayah. Bakteri *X. oryzae* memiliki tingkat perbedaan genetik yang tinggi diantara beda isolat berdasarkan

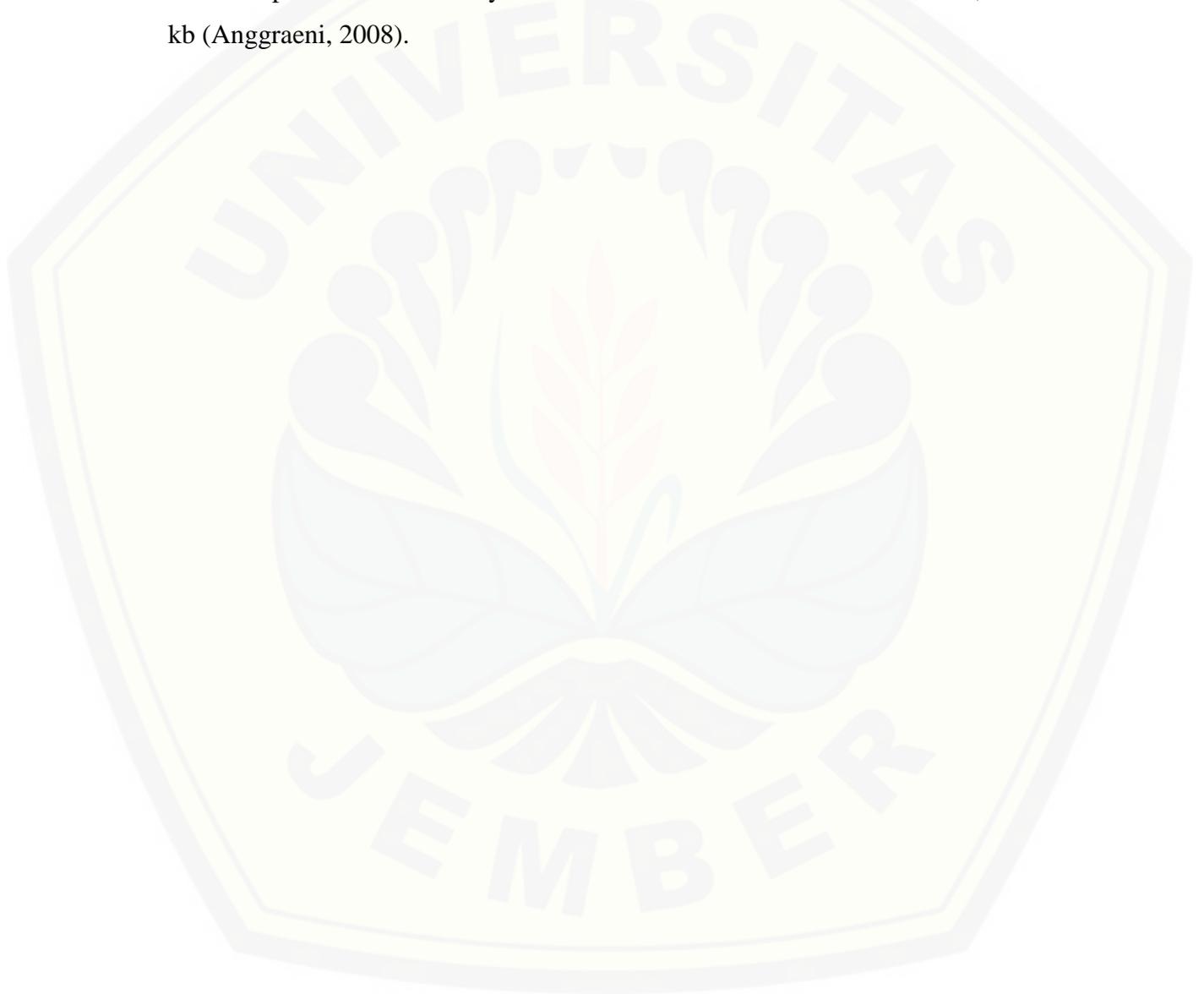
analisis patotipe dari 300 isolat berbeda dari Asia. Tingginya variabilitas tersebut disebabkan oleh adanya interaksi antar inang dan bakteri *X. oryzae* serta pengaruh lingkungan abiotik dan biotik. Perubahan salah satu komponen mempengaruhi patogenesis *X. oryzae* (Saputra, 2012).

2.4 PCR-RAPD

PCR adalah suatu metode *in vitro* untuk menghasilkan sejumlah besar fragmen DNA spesifik dengan panjang dan sekuens yang telah ditentukan dari sejumlah kecil template kompleks. PCR merupakan suatu teknik yang sangat kuat dan sensitif yang dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti biologi molekuler, diagnostik, genetika populasi dan analisis forensik. PCR didasarkan pada amplifikasi secara enzimatis satu atau beberapa fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang komplementer dengan ujung 5' dari kedua rantai sekuens target. Oligonukleotida ini digunakan sebagai primer (primer PCR) untuk memungkinkan DNA templat dikopi oleh DNA polimerase. Untuk mendukung terjadinya *annealing* primer pada templat pertama kali diperlukan pemisahan untai DNA yang *double stranded* melalui pemanasan. Suhu reaksi selanjutnya diturunkan untuk membiarkan terjadinya perpasangan sekuens dan akhirnya reaksi polimerisasi dilakukan oleh DNA polimerase untuk membentuk DNA komplementer. Proses ini dikenal dengan siklus PCR. Hasil dari PCR ini adalah akumulasi eksponensial fragmen target spesifik lebih dari berjuta kali lipat dalam beberapa jam. Teknik ini juga mampu memperbanyak molekul target tunggal dalam suatu campuran RNA dan DNA kompleks (Anggraeni, 2008).

Metode RAPD merupakan metode baru untuk mengidentifikasi sejumlah besar polimorfisme DNA pada genom dengan cepat dan efisien. Tipe polimorfisme ini membuat RAPD cocok untuk studi keanekaragaman genetik, hubungan kekerabatan, peta genetik dan sidik jari DNA. Metode RAPD menggunakan oligonukleotida pendek (biasanya 10 bp) sebagai primer yang akan berikatan dengan bagian (*sites*) komplementernya. Metode RAPD digunakan untuk

mendeteksi polimorfisme DNA yang digunakan sebagai genetik marker dan menentukan hubungan kekerabatan pada bermacam-macam tanaman dan serangga hama. RAPD diistilahkan oleh William *dkk.*, (1990) untuk *Random Amplified Polymorphic* untuk menghasilkan berjuta-juta kopi segmen DNA tertentu. Metode ini menggunakan primer tunggal (oligonukleotida sintetik) untuk memulai PCR. Primer tunggal memilih secara acak daerah-daerah genom urutan DNA tertentu untuk amplifikasi dan biasanya ditemukan dalam kisaran ukuran DNA 0,1 dan 3 kb (Anggraeni, 2008).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biomolekuler dan Bioteknologi CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember, Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penelitian dimulai pada bulan Januari 2015 sampai dengan Juli 2015.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : *Yeast extract*, dextrose, agar, NaOCl, aquadest, pepton, glukosa, asam amino acid, pati, larutan lugol, KOH 3%, gliserol, TE buffer pH 8, PCI, sodium asetat, etanol absolut, etanol 70%, RNase, gel agarose, TBE 1×, *loading dye*, ddH₂O, template DNA, PCR mix, *Ethidium Bromide*, primer RAPD.

3.2.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : *Stirrer*, *shaker*, *microwave*, bunsen, *autoclave*, cawan Petri, erlenmeyer, *beaker glass*, tabung reaksi, *Laminar Air Flow*, kulkas, oven, gunting, kaca preparat, pinset, jarum ose, mikropipet, tip, *tube*, sentrifus, cetakan gel, *chamber* elektroforesis, parafilm, *Gel Doc*.

3.3 Metode Penelitian

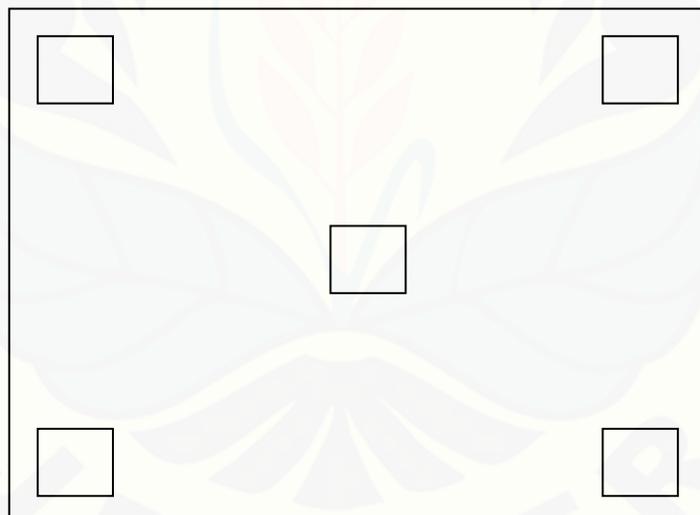
3.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari tanaman padi yang bergejala hawar daun bakteri pada berbagai jenis varietas padi yang ditanam di 5 kecamatan yang ada di Kabupaten Jember. Kelima kecamatan tersebut diantaranya Kecamatan Rambipuji Desa Rambigundam, Kecamatan Puger Desa Jambearum, Kecamatan Arjasa Desa Candijati, Kecamatan Tanggul Desa Kramat Sukoharjo, dan Kecamatan

Tempurejo Desa Pondokrejo. Pengambilan sampel di lapang menggunakan metode *diagonal random sampling*.



Gambar 3.1 Lokasi daerah pengambilan sampel



Gambar 3.2 Plot pengambilan sampel

3.3.2 Penilaian Intensitas Penyakit Hawar Daun Bakteri di Lapang

Pengamatan intensitas penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh *X. oryzae* di Kabupaten Jember menggunakan rumus sebagai berikut:

$$IP = \frac{\sum(n_x v)}{N \times Z} \times 100\%$$

Keterangan:

IP = intensitas penyakit

n = jumlah tanaman dari tiap kategori serangan

v = kategori serangan

N = jumlah tanaman yang diamati

Z = nilai kategori tertinggi

Menurut Tjubarjat *dkk.* (1999), kategori serangan *X. oryzae* yang digunakan yaitu:

0 = tidak ada serangan

1 = skala kerusakan 1–5%

3 = skala kerusakan 6–12%

5 = skala kerusakan 13–25%

7 = skala kerusakan 26–50%

9 = skala kerusakan 51–100%

3.3.3 Isolasi *X. oryzae* pv. *oryzae* Pada Tanaman Padi

Daun tanaman padi yang bergejala dipotong kecil- kecil antara yang sakit dan yang sehat. Potongan daun padi dimasukkan ke dalam gelas beker kemudian ditambahkan NaOCl 1% untuk sterilisasi permukaan dan didiamkan selama 3 menit. Daun kemudian dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali. Kemudian potongan daun tersebut diletakkan di atas tissue. Potongan daun ditunggu hingga mengering kemudian daun diletakkan di atas kaca preparat, daun dicacah lagi menggunakan skalpel lalu ditetesi air steril, diamkan selama 10 menit. Jarum ose dipanaskan di atas bunsen, kemudian suspensi bakteri pada kaca preparat diambil dan digoreskan pada media *YDA* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari. Setelah itu diamati koloni bakteri yang tumbuh dan diambil koloni yang diduga *X. oryzae* dan dikulturkan kembali pada cawan Petri baru agar diperoleh biakan murni.

3.3.4 Uji Gram

Uji Gram dilakukan untuk membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Uji Gram dilakukan dengan cara mengambil satu ose koloni bakteri dan diletakkan diatas kaca preparat, setelah itu ditetesi larutan KOH 3%. Suspensi diaduk hingga tercampur menggunakan jarum ose, kemudian jarum ose diangkat sedikit, jika suspensi lengket menunjukkan bakteri tersebut merupakan bakteri dengan jenis Gram negatif, namun jika suspensi tidak lengket maka bakteri tersebut merupakan bakteri Gram positif.

3.3.5 Uji Hidrolisis Pati

Uji hidrolisis pati dilakukan untuk mengetahui kemampuan dari isolat bakteri yang didapatkan dalam menghidrolisis pati atau amilum. Uji hidrolisis pati dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada media pati selama 48 jam. Setelah 48 jam isolat bakteri ditetesi larutan lugol dan didiamkan selama 5 menit, kemudian dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna di sekitar koloni pertumbuhan bakteri. Jika terdapat zona bening berwarna kuning disekitar koloni bakteri maka bakteri tersebut mampu menghidrolisis pati, namun jika tidak terdapat perubahan warna maka bakteri tersebut merupakan bakteri yang tidak dapat menghidrolisis pati.

3.3.6 Ekstraksi DNA

Bakteri pada medium cair digojog *overnight*, kemudian suspensi bakteri dituang ke dalam *tube* ukuran 1,5 ml dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 500 μ L TE buffer pada masing- masing *tube*. Selanjutnya ditambahkan 500 μ L PCI dan divortex sebentar kemudian simpan pada suhu -20°C selama 60 menit. Setelah disimpan, sentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil sebanyak 400 μ L dan ditaruh pada *tube* baru, kemudian ditambahkan sodium asetat sebanyak 40 μ L dan etanol absolut 97% sebanyak 1ml. Vortex sampai terlihat DNA kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu -20°C . Setelah diinkubasi, sentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan

dibuang dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 100 µl. Selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang kemudian *tube* dikering anginkan. TE buffer ditambahkan sebanyak 100 µl hingga pelet larut dan RNase ditambahkan sebanyak 5 µl.

3.3.7 Analisis PCR- RAPD

Analisis RAPD dilakukan dengan mesin PCR untuk mengamplifikasi DNA, dengan menggunakan bahan larutan campuran yang berisi PCR Mix sebanyak 15 µl, 2 µl DNA Template, 2 µl Primer, dan 11 µl ddH₂O. Masing-masing Reaksi PCR-RAPD dilakukan menggunakan satu Oligonukleotida (Primer) (Susianto, 2014).

Tabel 3.1 Urutan oligonukleotida primer RAPD

Nama Primer	5' 3'
Primer 4	AAG AGC CCG T
Primer 5	AAC GCG CAA C
Primer 6	CCC GTC AGC A

Sumber : Neoprobe, 2014.

Amplifikasi DNA dilakukan pada kondisi berikut (sesuai manual Protocol Intron) : Pre- denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, Denaturasi pada suhu 94°C selama 20 detik, Annealling pada suhu 72°C selama 30 detik, Elongasi pada suhu 72°C selama 40 detik, dan Final Elongasi pada suhu 72°C selama 3 menit sebanyak 30 siklus.

Setelah terlihat amplifikasi DNA dengan munculnya keragaman pita (band) pada gel agarose 1,2%, dilakukan perhitungan untuk mengetahui matriks dengan Metode Jaccard (Niwattanakul *dkk.*, 2013). Setelah dilakukan perhitungan dengan Metode Jaccard dan diketahui matriks *similarity* maka langsung dibuat *phenogram similarity* dengan dihubungkannya garis sesuai hasil *similarity* tiap isolat bakteri *X. oryzae* (Susianto, 2014).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Penilaian Intensitas Penyakit di Lapang

Hasil penilaian intensitas serangan penyakit hawar daun bakteri pada 5 Kecamatan di Kabupaten Jember disajikan pada Tabel 4.1. Besarnya intensitas serangan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya lokasi pengambilan sampel, tingkat ketahanan suatu varietas tanaman, dan usia tanaman padi.

Tabel 4.1 Penilaian intensitas penyakit dan kelompok isolat berdasarkan *Phenogram similarity*

Lokasi	Varietas	Luas lahan	Umur tanaman (HST)	Umur panen (HST)	Intensitas Serangan	Kelompok
Rambipuji	Wayapuburu	342 m ²	72 hst	120	21%	A
Arjasa	Situbagendit	200m ²	65 hst	120	7%	B
Tempurejo	Pandanwangi	300m ²	60 hst	145	10%	A
Puger	Cibogo	288m ²	55 hst	120	6%	B
Tanggul	Ciherang	288m ²	65 hst	120	15%	C

Keterangan : A = Kelompok pertama
B = Kelompok kedua
C = Kelompok ketiga

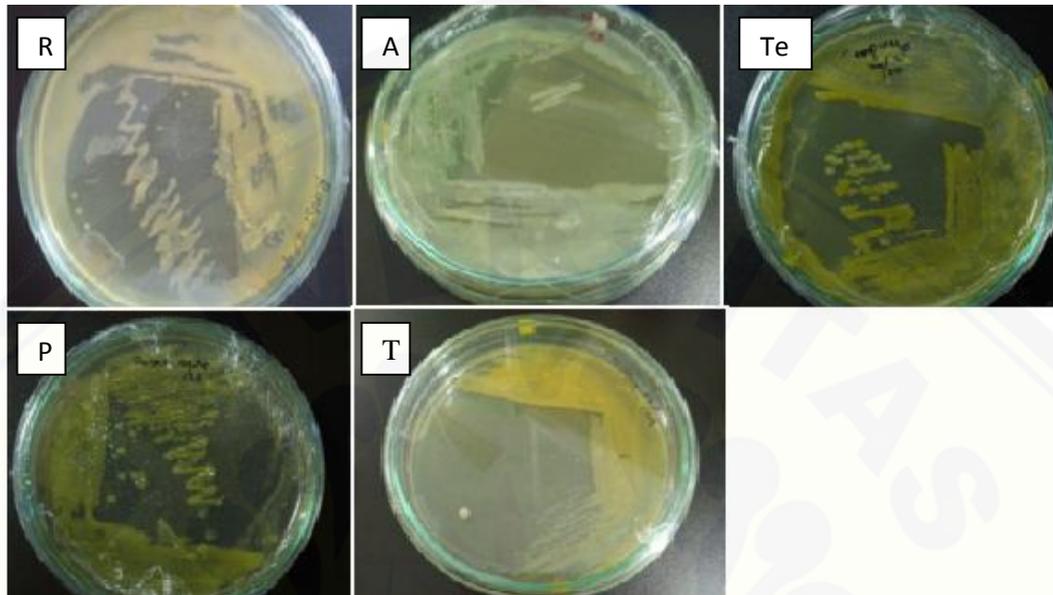
4.1.2 Isolat Bakteri *X. oryzae*

Isolat bakteri diperoleh dari tanaman padi yang bergejala hawar daun bakteri yang diambil dari 5 kecamatan di Kabupaten Jember. Daun padi yang bergejala hawar daun bakteri yang ditemukan di lapang memiliki karakteristik terdapat bercak berwarna keabu abuan yang dimulai dari tepi daun, tepi bercak berbentuk gelombang dan memiliki batas yang tegas (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Gejala HDB pada daun padi

Hasil isolasi bakteri *X. oryzae* pada semua isolat yang ditumbuhkan pada media *Yeast Dextrose Agar* memiliki bentuk bulat, cembung, berlendir dan berwarna kuning mulai dari kuning pucat hingga kuning terang (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 Isolat *X. oryzae* (R) Rambi, (A) Arjasa, (TE) Tempurejo, (P) Puger, (T) Tanggul.

4.1.3 Uji Gram dan Uji Hidrolisis Pati

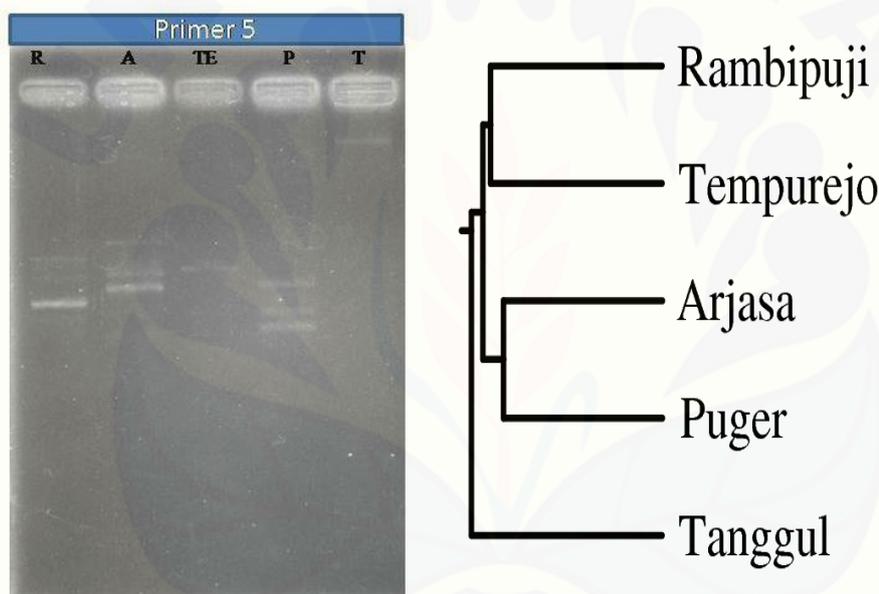
Lima isolat bakteri yang telah diuji menggunakan KOH 3% menunjukkan adanya suspensi yang lengket ketika diaduk, hal tersebut menunjukkan bahwa 5 isolat *X. oryzae* merupakan jenis bakteri Gram negatif. Pemberian larutan lugol pada koloni bakteri tidak menyebabkan terbentuknya zona bening disekitar koloni pertumbuhan bakteri. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang diuji tidak mampu menghidrolisis pati (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Hasil Uji Gram dan Uji Hidrolisis Pati

Asal Isolat	Kode Isolat	Uji KOH 3%	Uji Hidrolisis Pati
Rambipuji	R	Negatif	Negatif
Arjasa	A	Negatif	Negatif
Tempurejo	Te	Negatif	Negatif
Puger	P	Negatif	Negatif
Tanggul	T	Negatif	Negatif

4.1.4 Keragaman genetik *X. oryzae* pv. *oryzae*

Hasil PCR RAPD dari masing- masing isolat menggunakan primer 5 secara kualitatif menunjukkan bahwa isolat tersebut berbeda secara genetik (Gambar 4.3). Hal tersebut dapat dilihat dari jumlah dan ukuran pita DNA yang teramplifikasi. Penghitungan menggunakan Metode Jaccard dan pembuatan *Phenogram similarity* menghasilkan 3 kelompok isolat yang berbeda secara genetik. Kelompok A yaitu Rambipuji dengan varietas wayapuburu dan Tempurejo dengan varietas pandanwangi, Kelompok B yaitu Arjasa dengan varietas situbagendit dan Puger dengan varietas cibogo serta Kelompok C yaitu Tanggul dengan varietas ciherang (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Visualisasi hasil PCR RAPD Primer 5 pada gel agarose 1,2 % (50 V sampai batas gel akhir). Lane R= Rambipuji, Lane A= Arjasa, Lane Te= Tempurejo, Lane P=Puger, Lane T= Tanggul. *Phenogram similarity X. oryzae* menggunakan analisis kluster DendroUPGMA, aplikasi dibuat oleh Garcia dan Puigbo (2009).

4.2 Pembahasan

Intensitas penyakit hawar daun bakteri di lapang pada semua sampel yang diambil di 5 kecamatan di Kabupaten Jember tergantung dari beberapa faktor mulai dari lokasi penanaman padi, jenis varietas padi yang ditanam, dan stadia pertumbuhan tanaman. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Yuriah *dkk.* (2013)

bahwa tingkat serangan penyakit hawar daun bakteri bervariasi menurut waktu dan lokasi, tergantung pada genotipe padi, teknik budi daya atau keberadaan inokulum bakteri pada stadia tanaman yang berbeda, serta stadia pertumbuhan tanaman yang berkaitan dengan perbedaan kepekaan varietas.

Gejala hawar daun bakteri pada padi diantaranya terdapat bercak berwarna keabu-abuan yang dimulai dari tepi daun dan akan meluas ke seluruh permukaan daun. Bercak berbentuk hawar dengan tepi bergelombang dan berbatas tegas (Gambar 4.1). Sejalan dengan pengamatan Sudir *dkk.* (2012), pada tanaman dewasa umur lebih dari 4 minggu setelah tanam gejala diawali bercak kebasahan berwarna keabu-abuan pada satu atau kedua sisi daun dan akan terus berkembang ke seluruh daun hingga daun mejadi kering.

Bakteri yang telah diisolasi dari daun tanaman padi yang bergejala hawar daun bakteri yang diambil dari 5 kecamatan di Kabupaten Jember menunjukkan warna kuning terang hingga kuning pucat ketika ditumbuhkan pada medi YDA, bentuk koloni bulat dan mukoid. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Liu *dkk.* (2006) yang telah menumbuhkan isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* pada media *Yeast glucose agar* dan menunjukkan bentuk koloni yang bulat, cembung, mukoid dan berwarna kuning.

Uji Gram merupakan uji yang dilakukan untuk menentukan jenis Gram negatif atau positif pada suatu bakteri. Seluruh isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* yang diuji merupakan bakteri Gram negatif (Tabel 4.1). Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya suspensi bakteri yang lengket ketika diaduk dan diangkat setinggi 1 cm menggunakan jarum ose. Sejalan dengan penelitian Djatmiko *dkk.* (2011) yang telah melakukan pengujian menggunakan KOH 3% dan mendapatkan hasil bakteri yang diuji merupakan bakteri Gram negatif.

Uji hidrolisis pati merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolis pati. Bakteri yang dapat menghidrolis pati mempunyai aktivitas amilolitik, yaitu aktivitas yang mampu menghasilkan enzim amilase yang dapat mengubah pati menjadi molekul gula sederhana untuk

kebutuhan metabolisme sel (Hadioetomo, 1993). Seluruh isolat menunjukkan hasil yang negatif (Tabel 4.2), hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang diuji tidak mampu menghidrolisis pati ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona bening disekitar koloni pertumbuhan bakteri setelah ditetesi larutan lugol. Sesuai dengan penelitian Wahyudi *dkk.* (2011) yang telah melakukan uji pati pada tiga isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* menunjukkan hasil negatif atau bakteri yang diuji tidak mampu menghidrolisis pati.

Analisis *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) adalah metode untuk membedakan strain yang dimiliki oleh spesies yang sama (Ozbey *dkk.*, 2004). Identifikasi 5 isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* yang telah dilakukan menggunakan teknik RAPD menunjukkan hasil yang berbeda secara genetik. Hal tersebut diduga dikarenakan 5 isolat tersebut diisolasi dari tanaman padi dengan varietas dan lokasi yang berbeda. Pada berbagai wilayah bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae* memiliki tingkat perbedaan genetik yang tinggi diantara beda isolat, tingginya variabilitas tersebut disebabkan adanya interaksi antara inang (*Oryza sativa*) dan bakteri serta pengaruh lingkungan biotik dan abiotik (Saputra, 2012). Sejalan dengan penelitian Djatmiko *dkk.* (2011) yang telah melakukan analisis RAPD terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae* dari 6 kabupaten dan menunjukkan adanya perbedaan genetik dari ke enam isolat tersebut.

Pembuatan *phenogram similarity* dengan pendekatan Jaccard bertujuan untuk mengetahui seberapa besar keidentikan suatu spesies yang dianalisis. Melalui pembuatan dendogram dapat diketahui dari 5 isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* yang dianalisis terdapat 3 kelompok isolat yang berbeda secara genetik. Penggunaan RAPD dan *phenogram similarity* dilakukan pula oleh Onasanya *dkk.* (2013) untuk mengetahui keragaman genetik dari 50 isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* yang diambil dari 7 negara di Afrika Utara.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Intensitas penyakit hawar daun bakteri di lapang pada semua sampel yang diambil di 5 kecamatan di Kabupaten Jember tergantung dari beberapa faktor mulai dari lokasi penanaman padi, jenis varietas padi yang ditanam, dan stadia pertumbuhan tanaman.
2. Analisis keragaman genetik dari isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* yang diambil dari 5 kecamatan di Kabupaten Jember menggunakan teknik RAPD menunjukkan hasil yang berbeda secara genetik. Melalui penghitungan menggunakan Metode Jaccard dan pembuatan *Phenogram similarity* dihasilkan tiga kelompok isolat yang berbeda yaitu pada Kelompok A adalah isolat yang berasal dari Rambipuji dan Tempurejo, Kelompok B adalah Arjasa dan Puger serta Kelompok C adalah Tanggul.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui strain dari masing- masing isolat yang didapatkan agar informasi dapat disajikan secara utuh kepada pembaca dan juga pihak- pihak terkait.

DAFTAR PUSTAKA

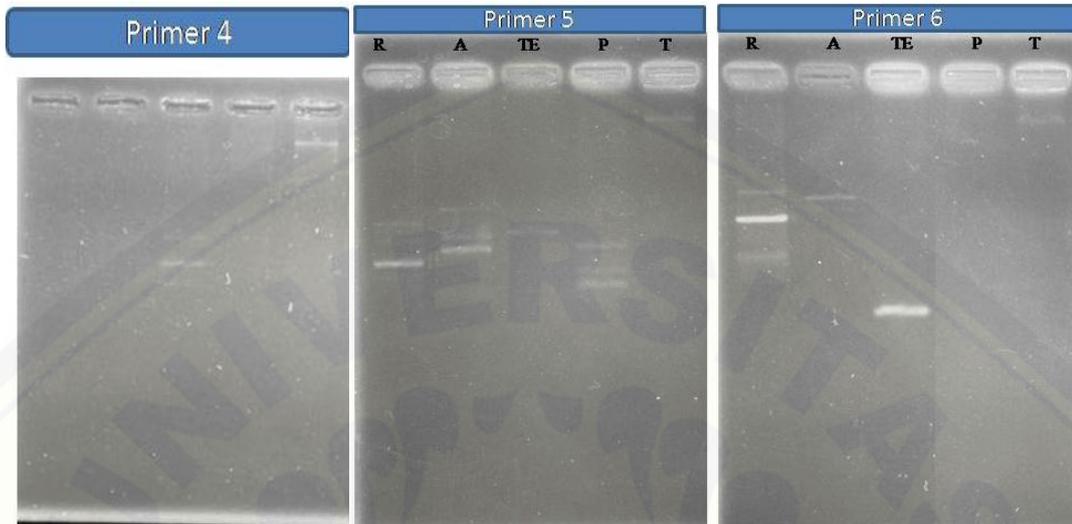
- Anggraeni E. 2008. *Random amplified polymorphic DNA (RAPD)*, suatu metode analisis DNA dalam menjelaskan berbagai fenomena biologi. *Biospecies* 1(2): 73-76.
- Azrai M. 2006. Sinergi teknologi marka molekuler dalam pemuliaan tanaman jagung. *Litbang Pertanian* 25(3): 81-89
- BPS. 2013. *Tanaman Pangan*. Jakarta: BPS
- BPS. 2014. *Tanaman Pangan*. Jakarta: BPS
- Cho HJ, YJ Park, TH Noh, YT Kim, JG Kim, ES Song, DH Lee, and BM Lee. 2007. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research* 33: 577-586.
- David O, N Liu, C Pamela, and AJ Bogdanove. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* 7(5): 303-324.
- Demeke T and RP Adams. 1994. *The Use of PCR-RAPD Analisis in Plant Taxonomy and Evolution*. PCR Technology Current Inovations. CRC Press, Inc. London
- Djarmiko HA, B Purwanto, dan N Purwatiningsih. 2011. Penentuan patotipe dan keragaman genetik *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada tanaman padi di wilayah karesidenan banyumas. *Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* 11(1): 35-46.
- Djarmiko HA dan Fathicin. 2009. Ketahanan dua puluh satu varietas padi terhadap penyakit hawar daun bakteri. *Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* 9(1): 168-173.
- EPPO. 2007. *Xanthomonas oryzae*. *Bulletin OEO* 37: 543-553.
- Ernawati NML. 2010. Pengaruh curah hujan terhadap perkembangan penyakit hawar daun bakteri pada bibit tanaman *Acacia crassicarpa*. *Budidaya Pertanian* 3(2): 142-146
- Garcia S and Puigbo P. 2009. DendroUPGMA: A Dendrogram Construction Utility. Biochemistry and Biotechnology Department. Universitat Rovira i Virgili (URV). Tarragona. Spain. <http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php?entrada=Example2>. Diakses pada tanggal 9 Juli 2015.
- Hadioetomo RS. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.

- Huang JS. 1986. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Rev. Phytopathol* 24: 141-157.
- Kadir TS. 2009. Menangkal HDB dengan menggilir varietas. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 31: 1-3.
- Kaku H. 1993. Infection types in rice *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* interaction. *Japan Agricultural Research Quartely* 27(2): 81-87.
- Karsinah S, L Setyobudi, dan H Aswidinnoor. 2002. Keragaman genetik plasma nutfah berdasarkan analisis penanda RAPD. *Biologi Pertanian* 7(1): 8-16.
- Khaeruni A, A Suwanto, dan B Cahyono. 2007. Deteksi cepat penyakit pustul bakteri pada kedelai menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik. *Hayati* 14(2): 76-80.
- Khaeruni A, M Taufik, T Wijayanto, dan EA Johan. 2014. Perkembangan penyakit hawar daun bakteri pada tiga varietas padi sawah yang diinokulasi pada beberapa fase pertumbuhan. *Fitopatologi* 10(4): 119-125.
- Lang JM, JP Hamilton, MGQ Diaz, V Sluys, MA Burgos, V Cruz, CM Buell, CR Tisserat, and JE Leach. 2010. Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant Disease* 94: 311- 319.
- Lu W, L Pan, H Zhao, Y Jia, Y Wang, X Yu, and X Wang. 2014. Molecular detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, and *Burkholderia glumae* in infected rice seeds and leaves. *Crop Journal* 20: 1-9.
- Mew TW, AM Alvarez, and J Swings. 1993. Focus on bacterial blight of rice. *Plant disease* 77: 5-21
- Niwattanakul S, J Singthongchai, E Naenudorn and S Wanapu. 2013. Using of jaccard coefficient for keywords similarity. *Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists* (1) IMECS 2013.
- Nuryanto SB dan TS Kadir. 2012. Epidemiologi, patotipe, dan strategi pengendalian penyakit hawar daun bakteri pada tanaman padi. *Iptek Tanaman Pangan* 7(2): 79-87.
- Onasanya A, RO Onasanya, and AA Ojo. 2013. Genetic analysis and molecular identification of virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates. *Molecular Biology* 9: 1-8.
- Ou SH. 1985. *Disease*. London : Commonwealth Mycological Institute.

- Ozbey G, HB Kilic, EA Muz. 2004. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* and *Manheimia haemolytica* strains isolated from cattle, sheep and goat. *Veteriner Medicine* 49(3): 65-69.
- Saputra IK. 2012. Identifikasi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dengan Teknik Biomolekuler dan Karakter Patogenesitas Terhadap Padi Galur Isogenik. [Skripsi S1]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sudir BN, TS Kadir. 2012. Epidemiologi, patotipe, dan strategi pengendalian penyakit hawar daun bakteri pada tanaman padi. *IPTEK Tanaman Pangan* 7(2): 79-87.
- Suryadi Y, TS Kadir, dan M Machmud. 2006. Deteksi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, penyebab hawar daun bakteri pada tanaman padi. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 25(2): 108-115.
- Susanto U dan Sudir. 2012. Ketahanan genotipe padi terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* patotipe III, IV dan VII. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 31(2): 108-116.
- Susianto G. 2014. Kisaran Inang Bakterioag ϕ SK Terhadap Beberapa Isolat Patogen Hawar Bakteri Pada Tanaman Kedelai di Jember. [Skripsi S1]. Jember: Univeristas Jember.
- Swings J. 1990. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pathovar *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pathovar *oryzicola*) of rice as pathovar of *Xanthomonas oryzae* new species. *System Bacteriol* 40: 309-311.
- Thein A and S Prathuangwong. 2010. Novel strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* UV mutated induce systemic resistance in rice againts bacterial leaf blight disease. *Kasetsart J* 44: 1026-1043.
- Tjubarjat T, TS Kadir, dan E Sumadi. 1999. Skrining varietas terhadap hawar daun bakteri. *Prosiding Kongres Nasional XV dan Seminar Ilmiah PFI*. Purwokerto, 16-18 September 1999.
- Wahyudi AT, S Meliah, dan AS Nawangsih. 2011. Bakteri penyebab hawar daun bakteri pada padi isolasi, karakterisasi dan telaah mutagenesis dengan transporon. *Makara Sains* 15(1): 89-96.
- Yuriah S, DW Utami, dan I Hanarida. 2013. Uji ketahanan galur-galur harapan padi terhadap penyakit hawar daun bakteri (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) ras III, IV, dan VIII. *Plasma Nutfah* 19(2): 53-60.

Lampiran A. Jaccard Coefficient

A.1 Penandaan Pita DNA pada gel agarose 1,2 % hasil elektroforesis PCR-RAPD



A.2 Tabel pita gel agarose 1,2 % hasil elektroforesis PCR-RAPD

No	Pita	Isolat				
		R	A	Te	P	T
1	P4-1	0	0	0	0	1
2	P4-2	0	0	1	0	0
3	P4-3	0	0	1	0	0
4	P4-4	0	0	1	0	0
5	P5-1	0	0	0	0	1
6	P5-2	0	1	0	0	0
7	P5-3	1	0	0	0	0
8	P5-4	1	1	1	0	0
9	P5-5	0	1	0	1	0
10	P5-6	1	0	0	0	0
11	P5-7	0	0	0	1	0
12	P5-8	0	0	0	1	0
13	P6-1	0	0	0	0	1
14	P6-2	1	0	0	0	0
15	P6-3	0	1	0	0	0
16	P6-4	1	0	0	0	0
17	P6-5	1	0	0	0	0
18	P6-7	0	0	1	0	0

A.3 Similarity Matrix computed with Jaccard coefficient

	Rambipuji	Arjasa	Tempurejo	Puger	Tanggul
Rambipuji	1	0.111	0.100	0.000	0.000
Arjasa		1	0.125	0.167	0.000
Tempurejo			1	0.000	0.000
Puger				1	0.000
Tanggul					1

A.4 Distance matrix based on Jaccard coefficient

Rambipuji	Arjasa	Tempurejo	Puger	Tanggul	
Rambipuji	0	0.889	0.900	1.000	1.000
Arjasa		0	0.875	0.833	1.000
Tempurejo			0	1.000	1.000
Puger				0	1.000
Tanggul					0