

KARAKTERISASI ISOLAT *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* YANG MENYERANG TANAMAN PADI DI KABUPATEN JEMBER MENGGUNAKAN TEKNIK RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)

Characterization of Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* Isolated from Rice Plant in Jember Region Using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Technique

Fadilla Nuraini¹, Hardian Susilo Addy^{1*}, Abdul Majid¹

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember
Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto, Jember 68121

*E-mail: hsaddy.faperta@unej.ac.id

ABSTRACT

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.

Keywords: *X. oryzae* pv. *oryzae*, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

ABSTRAK

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. 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 Ciherang 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 bakteri dengan KOH 3% 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.

Kata kunci: *X. oryzae* pv. *oryzae*, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

How to cite: Nuraini F, HS Addy, A Majid. 2015. Karakterisasi Isolat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang Menyering Tanaman Padi di Kabupaten Jember Menggunakan Teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1): xx-xx

PENDAHULUAN

Padi merupakan komoditas yang sangat penting karena menjadi bahan makanan pokok penduduk Indonesia (Djatmiko *dkk.*, 2011). Oleh karena itu produksi padi di Indonesia harus selalu meningkat dan berkesinambungan. Upaya peningkatan produksi padi nasional dihadapkan pada berbagai permasalahan salah satunya adalah penyakit penting pada tanaman padi yaitu hawar daun bakteri (Wahyudi *dkk.*, 2011). Hawar daun bakteri (HDB) disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Susanto dan Sudir, 2012). 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). Oleh karena itu 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*.

Munculnya strain baru memerlukan teknik diagnosis yang erat kaitannya dengan deteksi dan identifikasi (Suryadi *dkk.*, 2006). 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 molekular isolat *X. oryzae* pv. *oryzae* melalui teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Onasanya *dkk.*, 2013).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di 5 kecamatan di Kabupaten Jember dan uji laboratorium di CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*), Universitas Jember dengan waktu penelitian Januari 2015 – Juli 2015. Penelitian ini menggunakan alat dan bahan yaitu daun padi yang bergejala hawar daun bakteri, media *Yeast Dextrose Agar* (YDA), primer RAPD, alat standar kultur bakteri, alat standar ekstraksi DNA bakteri, alat standar untuk analisis PCR-RAPD.

Penghitungan Intensitas Serangan dan Pengambilan Sampel. Pengambilan sampel di lapang menggunakan metode *diagonal random sampling*. Menurut Djatmiko dkk. (2011) penghitungan intensitas serangan menggunakan rumus :

$$IP = \frac{\sum(n \times v)}{N \times V} \times 100\%$$

Keterangan:

IP = intensitas penyakit

n = jumlah tanaman dari tiap kategori serangan

v = kategori serangan

N = jumlah tanaman yang diamati

Z = nilai kategori tertinggi

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. 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. 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.

Uji Gram. 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.

Uji Hidrolisis Pati. 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.

Ekstraksi DNA. Bakteri pada medium cair dijogog *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 µL TE buffer pada masing- masing *tube*. Selanjutnya ditambahkan 500 µL 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 µL dan ditaruh pada *tube* baru, kemudian ditambahkan sodium asetat sebanyak 40 µL 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.

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 1. Urutan oligonukleotida primer RAPD

Nama Primer	5'.....3'
Primer 4	AAG AGC CCG T
Primer 5	AAC GCG CAAC
Primer 6	CCC GTC AGCA

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 45°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.

HASIL

Penilaian Intensitas Penyakit di Lapang. Hasil penilaian intensitas serangan penyakit hawar daun bakteri pada 5 kecamatan di Kabupaten Jember disajikan pada Tabel 2. Besarnya intensitas serangan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya lokasi pengambilan sampel, tingkat ketahanan suatu varietas tanaman, dan usia tanaman padi.

Tabel 2. Penilaian Intensitas penyakit dan kelompok isolat berdasarkan *Phenogram similarity*

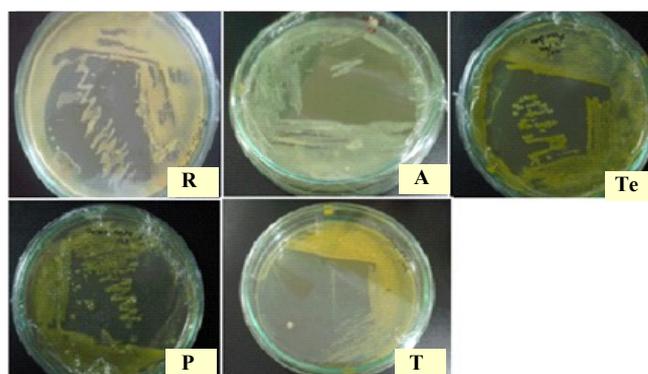
Lokasi	Varietas	Luas lahan	Umur tanaman (HST)	Umur panen (HST)	Intensitas Serangan	Kelompok
Rambipuji	Wayapuburu	342 m ²	72 hst	120	21%	A
Arjasa	Situbagendit	200 m ²	65 hst	120	7%	B
Tempurejo	Pandanwangi	300 m ²	60 hst	145	10%	A
Puger	Cibogo	288 m ²	55 hst	120	6%	B
Tanggul	Ciherang	288 m ²	65 hst	120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

Keterangan : A = Kelompok pertama

B = Kelompok kedua

C = Kelompok ketiga

Isolat Bakteri *X. oryzae*. Hasil isolasi bakteri *X. oryzae* pada semua isolat yang ditumbuhkan pada media YDA memiliki bentuk bulat, cembung, berlendir dan berwarna kuning mulai dari kuning pucat hingga kuning terang (Gambar 1).



Gambar 1. Isolat *X. oryzae* (R) Rambi, (A) Arjasa, (TE) Tempurejo, (P) Puger, (T) Tanggul.

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 3).

Tabel 3. Hasil Uji Gram dan Uji Hidrolisis Pati

Asal Isolat	Kode Isolat	Uji Gram	Uji Pati
Rambipuji	R	Negatif	Negatif
Arjasa	A	Negatif	Negatif

Tempurejo	Te	Negatif	Negatif
Puger	P	Negatif	Negatif
Tanggul	T	Negatif	Negatif

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 2). 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 2).

Gambar 2. Visualisasi hasil PCR RAPD Primer 5 pada gel agarose 1,2 % (50 V sampai batas gel akhir). Lane R= Rambi, 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).

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.

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 media 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 3). 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 menghidrolisis pati. Bakteri yang dapat menghidrolisis 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 3), 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 hidrolisis 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 (Ozbe *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 dendrogram 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.

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.

DAFTAR PUSTAKA

- Djatmiko 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.
- David O, N Liu, C Pamela, and AJ Bogdanove. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovar model patogen of a model crop. *Molecular Plant Pathology* 7(5): 303-324.
- Hadioetomo RS. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- Saputra IK. 2012. Identifikasi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dengan Teknik Biomolekuler dan Karakter Patogenesis Terhadap Padi Galur Isogenik. [Skripsi S1]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- 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.
- 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.
- Ozbe G, HB Kilic, and 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.
- 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.

- 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.