UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

KERAGAMAN GENETIK *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI

GABRIELA WELMA LITAAY
15/389567/PMU/08526

INTISARI

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) merupakan salah satu patogen penting penyebab penyakit hawar daun bakteri pada padi. Keragaman yang tinggi menyulitkan pengendalian patogen ini khususnya pengendalian dalam pencarian varietas tahan HDB. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji keragaman isolat-isolat *Xoo* dan mendeteksi gen yang diduga terkait patogenesitasnya. Sampling *Xoo* dilakukan di delapan kabupaten dari dua propinsi di Indonesia yaitu Yogyakarta dan Jawa Tengah. Identifikasi dilakukan berdasarkan karakterisasi makroskopis dan mikroskopis yang didukung dengan deteksi molekuler menggunakan primer spesifik *Xoo* yaitu primer Xoo2976. Analisis keragaman genetik dilakukan berdasarkan metode *Rep*-PCR dengan primer BOXA1R sedangkan gen yang diduga terkait patogenesitas dideteksi menggunakan primer yang dirancang berdasarkan gen *thiG* pada genom lengkap bakteri *Xoo*. Tiga puluh lima isolat *Xoo* berhasil diisolasi dan teridentifikasi sebagai *Xoo* berdasarkan pita ukuran 337bp menggunakan primer spesifik Xoo2976. Keragaman genetik *Xoo* diamati berdasarkan pola pita yang dihasilkan dari primer BOXA1R dengan ukuran sekitar 150bp-2500 bp. Hasil analisis klaster berdasarkan pola pita BOXA1R menunjukkan *Xoo* memiliki keragaman yang tinggi. Isolat terkelompok menjadi 5 klaster utama pada koefisien similaritas 70% dengan primer BOXA1R. Isolat-isolat yang berada pada klaster yang sama cenderung merupakan isolat-isolat yang berasal dari daerah yang sama. Terdeteksi adanya gen *thiG* yang diduga terkait patogenesitas pada sebagian besar isolat-isolat *Xoo*. Uji patogenisitas menunjukkan isolat PEM 1a yang tidak mengamplifikasi gen *thiG* tetap memiliki sifat virulen ditunjukkan dengan munculnya gejala hawar daun bakteri pada padi yang diinokulasi.

Kata kunci : *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Rep*-PCR, BOXA1R, keragaman.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

GENETIC DIVERSITY *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* OBTAINED FROM VARIOUS RICE CULTIVATION

GABRIELA WELMA LITAAY
15/389567/PMU/08526

ABSTARCT

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo)* is one of the important pathogen causing bacterial leaf blight (BLB) disease on rice. The diversity makes it difficult to control these pathogens. This study aims to examine the genetic diversity, as well as detection of putative pathogenesis-associated genes of *Xoo, thiG* gene. Isolation was conducted from eight districts of two provinces in Indonesia namely Yogyakarta and Central Java. Identification was performed on macroscopic and microscopic characterization supported by molecular detection using specific primers of *Xoo* that is Xoo2976. Genetic diversity analysis was performed by *Rep*-PCR method using BOXA1R primer whereas the putative pathogenesis-associated genes was detected using primers designed based on the thiG gene from complete genome of *Xoo* bacteria. Tirty five isolates of Xoo were isolated and identified as *Xoo* based on the bands of 337 bp formed using specific primers Xoo2976. Genetic diversity was observed based on the bands pattern generated from BOXA1R primer with sizes 150-2500 bp. The result of cluster analysis based on the banding pattern of BOXA1R showed a high similarity coefficient range. It grouped isolates into 5 main clusters with 70% similarity coefficient. Isolates in the same cluster tend to be isolates from the same origin region. The presence of a putative pathogenesis-associated genes, *thiG* gene, was detected through bands formed at 316 bp in most isolates. Pathogenicity test showed that PEM 1a isolate that did not amplify the *thiG* gene remained virulent indicated by the appereance of bacterial leaf blight symptoms on inoculated leaf rice.

Keywords : *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* , *Rep*-PCR, BOXA1R, diversity.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit hawar daun bakteri (HDB) merupakan salah satu penyakit utama pada padi yang tersebar di berbagai ekosistem padi di negara-negara penghasil padi, termasuk di Indonesia. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)* merupakan bakteri penyebab penyakit HDB. Patogen ini dapat menginfeksi tanaman padi pada semua fase pertumbuhan tanaman dari mulai pesemaian sampai menjelang panen. Penyebab penyakit (patogen) menginfeksi tanaman padi pada bagian daun melalui luka daun atau lubang alami berupa stomata dan merusak klorofil daun. Hal tersebut menyebabkan menurunnya kemampuan tanaman untuk melakukan fotosintesis yang apabila terjadi pada tanaman muda mengakibatkan mati dan pada tanaman fase generatif mengakibatkan pengisian gabah menjadi kurang sempurna (Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, 2015).

Kerugian yang ditimbulkan oleh HDB di wilayah tropis lebih tinggi dibandingkan di wilayah subtropik. Di Indonesia kerugian yang diakibatkan oleh penyakit kresek mencapai 70–80% (Kadir, 2009), di India mencapai 74–81% (Srinivasan & Gnanamanickam, 2005), Jepang mencapai 20–50% (IRRI, 2003) dan di Cina pada tahun 2005, HDB pernah diketahui menyebabkan kerugian pada sawah seluas 28.000 hektar (16,8% dari total luas keseluruhan lahan sawah nasional) (Qi, 2009) sehingga menyebabkan kerugian yang besar secara ekonomi (Yasin *et al.*, 2005). Selain itu menurut

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Wahyudi dkk (2011), serangan HDB di Indonesia sendiri menyebabkan kerugian hasil panen sebesar 21-36% pada musim hujan dan sebesar 18-28% pada musim kemarau. Luas penularan penyakit HDB pada tahun 2006 mencapai lebih dari 74 ribu hektar, 16 hektar di antaranya menyebabkan tanaman puso. Karakter iklim tropis juga menyebabkan banyaknya strain patogen yang ditemukan di wilayah tropis. Di Indonesia, munculnya HDB dilaporkan pada tahun 1950 dan hingga kini telah ditemukan 12 strain *Xoo* dengan tingkat virulensi yang berbeda.

Pengendalian penyakit HDB yang selama ini dianggap paling efektif adalah penanaman varietas tahan karena selain sangat efektif juga mudah diterapkan petani. Sejak varietas modern yang mengandung gen tahan terhadap penyakit HDB diperoleh, pemuliaan padi tahan HDB ini menjadi salah satu program penting dalam perbaikan varietas padi. Berbagai varietas dan galur padi dengan berbagai tingkat ketahanan telah dikembangkan (Sudir *et al*., 2012). Namun cara ini terkendala oleh *Xoo* yang diketahui mempunyai tingkat keragaman yang tinggi. Keragaman jenis *Xoo* terbentuk dari karakteristik molekuler *Xoo* itu sendiri karena diketahui bakteri *Xoo* dari berbagai daerah di Indonesia memiliki genetik yang cukup beragam (Djatmiko dan Prihatiningsih, 2011). Selain itu patogen memiliki kemampuan membentuk strain baru yang lebih virulen sehingga ketahanan varietas yang awalnya tahan dapat berubah menjadi tidak tahan (Verdier *et al*., 2011). Untuk itu struktur populasi patogen meliputi keragaman patogen,

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

filogenetik, musim dan daerah persebaran patogen penting untuk diketahui (Chen *et al*., 2012).

Strain *Xoo* yang cukup melimpah dan mempunyai tingkat keragaman strain tinggi yang disebabkan oleh lingkungan, varietas padi yang digunakan dan tingkat mutabilitas gen bakteri tinggi (Keller *et al.,* 2000). Perubahan genetik pada patotipe dalam populasi *Xoo* yang dapat diakibatkan dari beberapa faktor seperti perubahan genetik atau migrasi dari area geografis lainnya mampu mematahkan sifat resisten varietas tahan (Islam *et al.*, 2016). Hal ini menjadi kendala dalam upaya pengendalian HDB di dunia khususnya di Indonesia. Sehingga teknologi pencarian varietas yang tahan terhadap HDB menjadi kurang efektif. Maka pemantauan dominasi, keragaman genetik dan virulensi bakteri *Xoo* di suatu ekosistem padi (*spatial* dan *temporal*) menjadi sangat perlu untuk dilakukan secara berkala. Selanjutnya penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik beberapa isolat *Xoo* penyebab penyakit HBD pada padi dari berbagai lokasi pertanaman padi.

1.2 Permasalahan Penelitian

Berdasarkan latar belakang penelitian, berikut permasalahan yang akan dipecahkan melalui penelitian ini :

1) Apakah keragaman genetik *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* penyebab penyakit hawar daun bakteri pada padi yang diperoleh dari berbagai lokasi pertanaman padi tinggi berdasarkan metode *Rep*-PCR?

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

2) Apakah terdapat gen *thiG* salah satu gen yang diduga terkait patogenisitas pada isolat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* penyebab hawar daun bakteri pada padi dari berbagai lokasi pertanaman padi?

1.3 Keaslian Penelitian

Analisis keragaman *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secara molekular dan gen yang diduga terkait patogenesitas bakteri tersebut telah diteliti, di antaranya:

1) Islam *et al.* (2016) mengidentifikasi keragaman genetik *Xoo* di wilayah Bangladesh menggunakan *Repetitive element* IS1112 dan menemukan bahwa terdapat keragaman genetik yang tinggi.
2) Yuriyah dan Utami (2015) mengidentifikasi dan menganalisis keragaman genetik 18 isolat *Xoo* yang berasal dari beberapa lokasi koleksi di Indonesia. Analisis keragaman genetik dilakukan menggunakan marka VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) dan marka gen *avrxa7* dan menyimpulkan bahwa terdapat tiga kelompok genotipe *Xoo* dengan tingkat virulensi yang berbeda.
3) Pandey *et al.* (2014) meneliti keragaman patogen *Xoo* dan haplotipe dengan menggunakan *Rep*-PCR dan IS-PCR di daerah Udham Singh Nagar, India serta menyimpulkan bahwa populasi *Xoo* saat ini di U.S. Nagar sangat virulen dan beragam secara genetik.
4) Chen *et al.* (2012) meneliti tentang keragaman genetik dan patotipe *Xoo* yang berasal dari daerah dengan elevasi berbeda di Cina Barat Daya menggunakan penanda *Rep*-PCR dan IS-PCR. Berdasarkan penelitian ini disimpulkan bahwa keragaman genetik dan patotipe *Xoo* dapat dipengaruhi oleh perbedaan ketinggian suatu tempat.

KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

5) Yu *et al.* (2015) meneliti tentang gen yang diduga terkait patogenisitas dan menemukan bahwa gen *thiG*, gen pengkode protein *thiazole synthase* berperan dalam virulensi bakteri *Xoo*.

Berdasarkan hasil penelitian di atas maka penelitian mengenai keragaman genetik *Xoo* penyebab penyakit hawar daun bakteri pada padi di berbagai lokasi pertanaman padi dengan menggunakan *Rep*-PCR dan deteksi gen yang diduga terkait patogenisitas pada isolat *Xoo* yaitu gen *thiG* tersebut memiliki peluang besar untuk diteliti karena belum pernah dilakukan.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk

1) Mengetahui keragaman genetik *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* penyebab penyakit hawar daun bakteri pada padi yang diperoleh dari berbagai lokasi pertanaman padi.
2) Mengetahui adanya gen terkait patogenisitas *thiG* pada isolat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* penyebab hawar daun bakteri pada padi yang diperoleh dari berbagai lokasi pertanaman padi.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang keragaman genetik patogen *Xoo* penyebab hawar daun bakteri pada padi yang diperoleh dari berbagai lokasi pertanaman padi. Informasi tersebut dapat dibutuhkan dalam kebijakan dan manajemen pengendalian *Xoo*, khususnya pengembangan ke arah rekayasa genetik untuk mendapatkan varietas unggul padi yang tahan terhadap *Xoo.*

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

II. TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI

2.1 Tinjauan Pustaka

2.1.1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bersifat gram negatif, berbentuk batang pendek dengan ukuran 0,45 - 0,75 x 0,65-2,1 µ, dengan satu flagella polar di salah satu ujungnya dengan ukuran 0,03-8,75 µ. Koloni bakteri berwarna kekuningan dan tampak berlendir (Ou, 1985). Klasifikasi bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* adalah sebagai berikut (EPPO , 2007) :

Kingdom : Bacteria

Filum : Proteobacteria

Kelas : Gamma Proteobacteria

Orde : Xanthomonadales

Family : Xanthomonadaceae

Genus : *Xanthomonas*

Spesies : *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Kelompok genus *Xanthomonas* sp. memiliki ciri khas yaitu menghasilkan polisakarida ekstraseluler (EPS) yang berfungsi dalam pembentukan eksudat bakteri pada daun yang terinfeksi, memberikan perlindungan dari kekeringan dan membantu penyebaran melalui angin dan hujan (Ou, 1985). Patogen ini bersifat aerobik dan tidak membentuk spora. Suhu optimal untuk pertumbuhannya ialah berkisar antara 25°C - 30°C.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Seperti genus *Xanthomonas* secara keseluruhan, *Xoo* bersifat katalase-positif, tidak dapat mereduksi nitrat (Bradbury, 1984).

Bakteri Xoo tersebar di Asia, Afrika, Australia, Amerika Utara, Amerika Tengah dan Karibia, Amerika Selatan, serta Oseania. Namun bakteri ini paling banyak terdapat di Asia dan sebagian Afrika Barat, terutama di India, Cina, dan Indonesia, dimana populasinya telah tersebar luas hingga mewabah. Hal ini juga diakibatkan virulensi yang tinggi pada *Xoo* yang ada di Asia dibandingkan *Xoo* yang ada di benua lainnya (Nino-Liu *et al*., 2006). Bakteri ini memiliki tingkat virulensi yang bervariasi berdasarkan kemampuannya menginfeksi varietas padi yang mempunyai gen dengan resistensi yang berbeda dan interaksi antara gen virulen patogen dan gen tahan tanaman (Jha *et al*., 2007). Sifat virulensi patogen sangat mudah berubah, bergantung pada kondisi lingkungannya. Di rumah kaca, reaksinya lebih spesifik terhadap patotipe yang diinokulasikan, sedangkan pada suatu lokasi di lapangan dijumpai lebih dari satu patotipe *Xoo* dan populasinya beragam (Ochiai *et al*., 2005, Nayak *et al.,* 2008). Penelitian di Jepang menunjukkan bahwa beberapa kumpulan gen Xoo telah diketahui dan diurutkan yang memberikan harapan dapat menjelaskan proses mekanisme sifat virulensi patogen (Ochiai *et al*., 2005).

2.1.2 Penyakit Hawar Daun Bakteri

Penyakit hawar daun bakteri (HDB) atau *Bacterial Leaf Blight* (BLB) merupakan salah satu penyakit penting tanaman padi yang disebabkan oleh bakteri endemik di negara-negara penghasil beras di Asia yaitu *Xoo* (George

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

et al, 1998). Daun padi yang terinfeksi bisa pada semua fase pertumbuhan tanaman, mulai dari pesemaian sampai menjelang panen. Pada tanaman fase vegetatif, gejala yang muncul disebut kresek dan pada fase generatif disebut hawar. Proses pengisian gabah menjadi tidak sempurna jika infeksi terjadi pada fase generatif (Suparyono *et al*., 2004).

Infeksi *Xoo* pada daun menyebabkan fungsi fotosintesis daun terganggu sehingga tanaman padi yang terinfeksi menghasilkan gabah yang kosong (Suparyono *et al*., 2004; Sudir *et al*., 2016). *Xoo* masuk ke jaringan tanaman padi umumnya melalui hidatoda pada saat gutasi. (Niño-Liu *et al.,* 2006). Bakteri berkembang biak di ruang interselular pada parenkim lalu masuk dan menyebar ke tanaman melalui xilem (Noda dan Kaku, 1999; Niño-Liu *et al.,* 2006). *Xoo* juga dapat masuk ke jaringan angkut melalui luka atau bukaan yang ada pada daun (Ou, 1985; Niño-Liu *et al.,* 2006). Dalam beberapa hari patogen yang dapat menghasilkan *exopolysaccharide* (EPS) mampu berada di dalam jaringan angkut dan dapat keluar melalui hidatoda membentuk eksudat seperti manik-manik kecil pada permukaan daun atau ujung daun. Ini merupakan tanda khas penyakit HDB (Mew *et al*., 1993; Niño-Liu *et al.,* 2006).

Berbagai upaya untuk mengendalikan penyakit HDB telah dilakukan antara lain penggunaan antibiotik untuk melawan *Xoo* (Khan *et al*, 2006), pemanfaatan beberapa agen antagonis seperti *Bacillus subtillis*, *Fanicea agglomerans*, dan *Pseudomonas fluorescens* serta penanaman varietas tahan (IRRI, 2003). Untuk mengembangkan varietas padi unggul yang tahan

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

terhadap penyakit HDB, selain diperlukan sumber gen ketahanan terhadap HDB juga sangat diperlukan informasi tentang keragaman dan gen virulensi *Xoo* yang mendominasi suatu wilayah. Informasi tersebut sangat penting yang kemudian dapat dikaitkan satu sama lain sehingga diperoleh suatu strategi dalam menyusun kebijakan pengendalian penyakit tersebut dan perakitan varietas padi unggul tahan *Xoo* (Syair, 2012).

Penelitian mengenai keragaman genetik bakteri *Xoo* sudah banyak dilakukan di berbagai negara penghasil padi. Di antaranya keragaman genetik *Xoo* di Asia menggunakan penanda molekuler *Restriction Fragment Lenght Polymorphism* (RFLP) (Adhikari *et al.*, 1995), keragaman genetik isolat-isolat *Xoo* dari Sri Lanka dengan menggunakan penanda molekuler RFLP (Ochiai *et al*., 2000), keragaman patogen *Xoo* dan haplotipe dengan menggunakan *Rep*-PCR dan IS-PCR di daerah Udham Singh Nagar (Pandey *et al.,* 2014) dan lain-lain.

2.1.3 Analisis molekuler *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Perangkat molekuler adalah alat yang dapat digunakan dalam mengidentifikasi makhluk hidup secara akurat dalam waktu yang relatif singkat. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu teknik amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam secara *in vitro*. Kegunaan tersebut menjadi kelebihan PCR sehingga menjadi salah satu teknik yang paling umum digunakan oleh para peneliti di bidang biologi molekuler dan genetika (Bintang, 2010).

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Sehingga studi mengenai karakteristik pada bakteri dapat dilakukan bukan hanya berdasarkan aspek fenotipe seperti patogenisitas, spesifisitas inang, virulensi, dan distribusi geografis berkaitan erat dengan keragaman genetik dari bakteri padahal karakter fenotipe belum bisa untuk memastikan adanya perubahan secara genetik, karena sangat dipengaruhi faktor lingkungan yang akan memicu adaptasi yang bersifat sementara atau permanen. Namun juga terdapat metode genotipe yang dapat mempelajari karakteristik bakteri tanpa dipengaruhi faktor lingkungan. Salah satunya dengan penanda molekuler (Yildrim *et al.,* 2011).

Di antara berbagai penanda molekuler yang digunakan, RNA ribosomal paling banyak digunakan sebagai penanda molekuler. Pada prokaryota terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Namun 16S rRNA yang paling sering digunakan. 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena molekul ini bersifat ubikuitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies (Pangastuti, 2006).

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Analisis dari sekuen gen 16S rRNA tidak cukup mengungkapkan keragaman genetik bakteri patogen, karena tingkat evolusi dari gen 16S rRNA cukup lama (Tsushima *et al.,* 2006). Penanda molekuler yang sering digunakan untuk melihat keragaman genetik suatu bakteri adalah *Repetitive* PCR (*Rep*-PCR). *Rep*-PCR merupakan metode amplifikasi fragmen DNA dengan menggunakan primer yang berkomplemen dengan sekuens berulang yang terdapat pada bakteri (Lisek *et al.,* 2011). Setiap mikroorganisme memiliki sekuen yang berulang (*repetitive sequence*) dengan jumlah dan jarak yang bervariasi (Prihantoro *et al.,* 2012). *Rep*-PCR diakui sebagai teknik PCR yang sederhana dengan karakteristik yaitu mempunyai kekuatan diskriminatif yang tinggi, biaya yang cukup rendah, sesuai untuk strain yang tinggi, dan alat yang handal untuk mengklasifikasikan berbagai bakteri Gram negatif dan beberapa Gram positif (Yildrim *et al*., 2011). Keshavarz (2011) menyatakan bahwa metode *Rep*-PCR dapat digunakan untuk melakukan karakterisasi molekuler pada bakteri *Xoo* yang berasal dari populasi berbagai daerah di Malaysia.

Ada tiga negara yang telah melakukan sekuen lengkap *Xoo*, yakni Korea Selatan, Jepang, dan Amerika Serikat. Kajian sekuen bakteri ini juga dilakukan oleh Lee *et al.* (2005), yang melaporkan bahwa isolat *Xoo* KACC10331 (isolat asal Korea) memiliki ukuran genom sekitar 4.941.439 pasang basa, dengan bentuk kromosom bulat, *GC rich* 63,7%, dan *open reading frames* (ORFs) berjumlah 3340. Sebanyak 80% dari sekuen yang diperoleh identik dengan sekuen gen-gen dari genus *Xanthomonas*.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Berdasarkan sekuen tersebut selanjutnya didesain primer-primer spesifik untuk mengidentifikasi bakteri *Xoo.*

Identifikasi bakteri *Xoo* secara molekuler lebih efektif dan cepat dibandingkan metode "Postulat Koch" yang memerlukan waktu yang lama (Kadir, 2009). Identifikasi secara molekuler ini dapat dilakukan pada tahap awal isolasi bakteri dari sampel daun yang diduga terserang HDB. Identifikasi secara molekuler menggunakan primer-primer spesifik untuk bakteri *Xoo* yang relatif lebih cepat dan akurat dalam mendapatkan bakteri *Xoo* murni (Lang *et al*., 2010). Beberapa primer spesifik telah dirancang oleh beberapa peneliti. Primer-primer tersebut didesain berdasarkan kajian sekuen lengkap dari beberapa isolat bakteri *Xoo* (Salzberg *et al.*, 2008).

2.1.4 Gen yang Diduga Terkait Patogenisitas

Infeksi bakteri pada jaringan tanaman sangat bergantung pada faktor virulensi yang berkaitan dengan gen-gen yang diduga terkait patogenisitas yang mengkode bermacam-macam protein. Pada *Xoo* faktor virulensi yang disekresikan adalah adhesin, polisakarida, LPS dan enzim degradasi. Salah satu faktor patogenitas utama pada genus *Xanthomonas* adalah protein sekresi tipe III yang berfungsi memasukkan protein efektor ke sitosol sel tanaman untuk memanipulasi proses seluler tanaman seperti pertahanan dasar untuk kepentingan patogen tersebut (Buttner dan Bonas, 2010). *Xoo* juga dilaporkan menghasilkan faktor virulensi seperti EPS, enzim ekstraselular, *siderophore* dan protein sekresi tipe III, yang secara kolektif penting untuk virulensi (He *et al.*, 2010).

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Berbagai faktor virulensi yang berperan dalam patogenisitas *Xoo* terus dikaji hingga sekarang. Laporan terbaru menurut Yu *et al.* (2015), diduga adanya keterkaitan gen *thiG* pada virulensi bakteri Xoo. Gen *thiG* merupakan salah satu gen yang mengkode protein *thiazole* yang berperan dalam jalur biosintesis thiamin. Mutasi pada *Xoo* dengan menghilangkan gen *thiG* menunjukkan terganggunya virulensi. *Xoo* yang telah dihilangkan gen *thiG* menunjukkan penurunan virulensi pada *Xoo* yang diinokulasikan ke padi dan adanya pembentukan agregat sel dibandingkan dengan *wild type*. Meskipun pembentukan biofilm tetap terjadi, pergerakan dan perpindahan *Xoo* di daun padi ditekan pada sehingga perluasan infeksi patogen padi menjadi terbatas. Hal ini menunjukkan bahwa gen *thiG* terlibat dalam virulensi Xoo.

2.2 Landasan Teori

Xoo merupakan salah satu bakteri gram negatif yang menyebabkan penyakit hawar daun bakteri (HDB) pada padi. *Xoo* menginfeksi tanaman dengan cara masuk kedalam jaringan tanaman melalui luka, hidatoda, stomata, atau benih yang terkontaminasi. Gejala ini umum dijumpai pada stadium anakan, berbunga, dan pemasakan. Serangan penyakit pada tanaman yang masih muda dinamakan kresek, yang dapat menyebabkan daun berubah menjadi kuning pucat, layu, dan kemudian mati. Kresek merupakan bentuk gejala yang paling merusak. Penyebarannya pada wilayah persawahan melalui perantara air irigasi.

Gejala yang ditimbulkan oleh bakteri ini tergolong khas, yaitu mulai dari terbentuknya garis basah pada helaian daun yang akan berubah menjadi

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
KERAGAMAN GENETIK Xanthomonas oryzae pv. oryzae YANG DIPEROLEH DARI BERBAGAI LOKASI PERTANAMAN PADI
GABRIELA W LITAAY, Prof.Dr.Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

kuning kemudian putih. Tingkat evolusi bakteri *Xoo* tergolong cepat sehingga memiliki keragaman genetik yang cukup tinggi dan viabilitas yang cukup besar. Hal ini juga berhubungan dengan patogenisitasnya. Penelitian mengenai keragaman genetik bakteri *Xoo* sudah banyak dilakukan di berbagai negara penghasil padi, salah satunya Indonesia.

Polymerase Chain Reaction **(**PCR) adalah metode untuk melipatgandakan (amplifikasi) potongan DNA dalam waktu singkat secara *in vitro* (Bintang, 2010). Pendekatan teknik *Repetitive* PCR (*Rep*-PCR) merupakan salah satu teknik untuk menganalisis karakteristik molekuler pada bakteri. *Rep*-PCR akan mengamplifikasi pada urutan DNA yang berulang. Urutan DNA yang berulang ini dapat digunakan untuk membedakan ras bakteri yang sebelumnya sulit dibedakan dengan metode klasifikasi yang baku. Prosedur *Repetitive* PCR (*Rep*-PCR) melibatkan penggunaan satu primer nukleotida dengan sekuens berulang. Penelitian mengenai gen *thiG* sebagai gen terkait patogenisitas belum banyak dilakukan untuk melihat perannya yang berkaitan dengan virulensi bakteri patogen. Mutasi pada gen *thiG* penyandi protein *thiazole* menunjukkan menurunnya tingkat virulensi patogen. Keragaman genetik *Xoo* dan tingkatan virulensinya serta keberadaan gen *thiG* penyandi protein thiazole pada *Xoo* yang diisolasi dari padi di beberapa wilayah di Yogyakarta dan Jawa Tengah diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah terbaru yang bermanfaat.