

PENENTUAN PATOTIPE DAN KERAGAMAN GENETIK *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PADA TANAMAN PADI DI WILAYAH KARESIDENAN BANYUMAS

Heru Adi Djatmiko, Budi Prakoso & Nur Prihatiningsih

Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto
Jl. dr. Suparno Karangwangal Purwokerto
E-mail: heru_adi@yahoo.com

ABSTRACT

Identification of pathotype and genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice in Karesidenan Banyumas area. One of the major diseases of rice paddy fields in Indonesia and the Asian countries is bacterial leaf blight or kresek caused by *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). Losses caused by the disease in Indonesia reached 70–80%, in India reached 74–81%, and Japan reached 20–50%, thus causing great losses in the economy. The objectives of that research were: 1) Characterize *Xoo* from Karesidenan Banyumas; 2) To study of the amount of damage and AUDPC (the area under disease progress curve) of bacterial leaf blight disease at Karesidenan Banyumas; 3) To obtain of *Xoo* pathotype by using the test varieties; 4) To obtaining genetic diversity of *Xoo* that found in Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap dan Kebumen region. Research was carried out in several stages: isolation and characterization of *Xoo* from Barlingmascakeb region, testing of *Xoo* with five varieties testing, assesment of disease intensity of bacterial leaf blight and AUDPC in the field, and testing the genetic diversity of *Xoo*. The results showed that pathogen of bacterial blight on rice is *Xoo* characterized yellow colour of colonies on SPA medium, negative gram reaction, catalase positive, oxidase negative, negative growth at 0.1% TZC, negative starch hydrolisis, and resistance to 0.001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ positive. *Xoo* pathotype isolats found in Banjarnegara was pathotype X, Cilacap were pathotype I and II and Purbalingga was pathotype II. Eighteen of *Xoo* from Karesidenan Banyumas (Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap and Kebumen) of RAPD differ one from the others.

Key words: genetic diversity, pathotype, rice, *X. oryzae* pv. *oryzae*

ABSTRAK

Penentuan patotipe dan keragaman genetik *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada tanaman padi di wilayah Karesidenan Banyumas. Salah satu penyakit utama padi sawah di Indonesia dan negara Asia adalah hawar daun bakteri atau kresek yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). Kehilangan yang diakibatkan oleh penyakit tersebut di Indonesia mencapai 70–80%, di India mencapai 74–81% dan Jepang mencapai 20–50%, sehingga menyebabkan kerugian yang besar secara ekonomi. Tujuan penelitian yaitu: 1) Mengkarakterisasi *Xoo* dari wilayah Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap dan Kebumen; 2) Mengkaji besarnya kerusakan dan AUDPC (*the area under disease progress curve*) penyakit hawar daun bakteri di wilayah Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap dan Kebumen; 3) Mendapatkan patotipe *Xoo* dengan menggunakan varietas uji; 4) Mendapatkan keragaman genetik *Xoo* yang ditemukan di wilayah Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap dan Kebumen. Penelitian dilaksanakan dalam beberapa tahap yaitu isolasi dan karakterisasi *Xoo* dari wilayah Barlingmascakeb, pengujian *Xoo* dengan 5 varietas uji, penilaian intensitas penyakit hawar daun bakteri dan AUDPC di lapangan dan pengujian keragaman genetik *Xoo*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyebab penyakit hawar daun bakteri pada tanaman padi adalah *Xoo* dengan ciri warna koloni kuning pada medium SPA, reaksi gram negatif, katalase positif, oksidase negatif, pertumbuhan pada 0,1% TZC negatif, hidrolisis pati negatif dan ketahanan terhadap 0,001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ positif. Patotipe *Xoo* yang ditemukan di Kabupaten Banjarnegara yaitu patotipe X, Cilacap yaitu patotipe I dan II, dan Purbalingga yaitu patotipe II. Delapan belas isolat *Xoo* yang berasal dari Karesidenan Banyumas (Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap dan Kebumen) mempunyai genetik berbeda berdasarkan pada pola pita DNA hasil dari RAPD berbeda satu dengan lainnya.

Kata kunci: keragaman genetic, padi, patotipe, *X. oryzae* pv. *oryzae*

PENDAHULUAN

Padi merupakan komoditas yang sangat penting karena berasnya menjadi bahan makanan pokok penduduk Indonesia (Abdullah, 2002; Husodo, 2004). Beras menyumbangkan 60–80% kalori dan 45–55% protein untuk pemenuhan gizi penduduk Indonesia (Abdullah, 2002). Menurut Papanek (2005), nilai gizi yang diperlukan oleh setiap orang dewasa adalah 1821 kalori yang apabila disetarakan dengan beras, maka setiap hari diperlukan beras sebanyak 0,88 kg. Oleh karena itu, perlu produksi padi yang berkesinambungan. Seiring dengan pertambahan penduduk Indonesia maka produksi padi harus selalu ditingkatkan.

Produksi padi tahun 2006 sebesar 54,66 juta ton Gabah Kering Giling (GKG). Produksi padi tahun 2006 meningkat didasarkan pada kenaikan luas panen sekitar 16 juta hektar (0,13%) dan juga peningkatan produktivitas sebesar 0,37 kw ha⁻¹ (0,81%). Peningkatan luas panen terutama terjadi di Luar Jawa sebanyak 14 ribu ha (0,23%), sedangkan di Jawa hanya bertambah sekitar 2 ribu ha (0,03%) (BPS, 2006). BPS (2008) memperkirakan produksi padi 2008 sebanyak 59,8 juta ton atau naik 4,8% dibandingkan dengan tahun 2007 yang mencapai 57,2 juta ton gabah kering giling (GKG) atau setara 2,7 juta ton GKG. Kenaikan produksi diperkirakan terjadi karena peningkatan luas panen sebesar 237 ribu ha atau 1,96 lebih luas dari panen 2007 (12,15 juta ha) serta kenaikan produktivitas padi sebesar 1,3 kw ha⁻¹ atau 2,76% lebih tinggi dari produktivitas di tahun 2007.

Peningkatan produksi padi memiliki banyak kendala di antaranya adanya penyakit hawar daun bakteri (Tjubarjat *et al.*, 1999; Suparyono *et al.*, 2004; Kadir, 1999; Yashitola *et al.*, 1997; Srinivasan & Gnanamanickam, 2005), penyakit bercak coklat dan blas (Prihatiningsih & Djatmiko, 2001). Salah satu penyakit utama padi sawah di Indonesia dan di Asia secara umum adalah hawar daun bakteri atau kresek yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Kadir, 1999; Mundt *et al.*, 1999; IRRI, 2003). Di Indonesia kehilangan yang diakibatkan oleh penyakit kresek mencapai 70–80% (Kadir, 1999), di India mencapai 74–81% (Srinivasan & Gnanamanickam, 2005), dan Jepang mencapai 20–50% (IRRI, 2003), sehingga menyebabkan kerugian yang besar secara ekonomi (Yasin *et al.*, 2005).

Berbagai upaya pengendalian penyakit hawar daun bakteri telah dilakukan, diantaranya dengan penggunaan antibiotik *oxytetracycline*, *streptomycin*, dan *chloramphenicol* (Khan *et al.*, 2005); peramalan datangnya serangan patogen (Liu *et al.*, 2006); sanitasi di pertanaman padi (IRRI, 2003) dan penggunaan

kombinasi agensia antagonis *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Bacillus subtilis* AS (Babu & Thind, 2005), serta penggunaan varietas tahan (Djarmiko & Fatichin, 2009). Namun, cara pengendalian tersebut belum memberikan hasil yang memuaskan karena *X. oryzae* pv. *oryzae* mempunyai inang yang banyak yaitu *Leersia sayanuka*, *L. oryzoides*, *L. japonica*, *Leptochloa chinensis*, *L. filiformis*, *L. panicea*, *Cyperus rotundus*, *C. difformis*, *Oryza rufopogon* dan *O. australiensis* (IRRI, 2003). Selain inang yang banyak, *Xoo* mempunyai tingkat keragaman patotipe tinggi yang disebabkan oleh lingkungan, varietas padi yang digunakan dan tingkat mutabilitas gen bakteri inang (Keller *et al.*, 2000).

Ketahanan inang adalah komponen penting program pengelolaan penyakit terpadu untuk penyakit hawar daun bakteri. Saat ini, 21 gen ketahanan telah diidentifikasi dan digunakan dalam program pemuliaan padi, namun ras baru *Xoo* segera nampak karena adanya tekanan seleksi yang disebabkan adanya kultivar tahan ras spesifik. Dalam kenyataannya, strain virulen *Xoo* terdeteksi pada kultivar tahan semenjak populasi inang mempengaruhi keragaman genetik dan struktur populasi patogen (Gupta *et al.*, 2001).

Banyak sumber ketahanan terhadap penyakit hawar daun bakteri telah teridentifikasi di negara penanam padi di Asia, namun demikian pemuliaan padi untuk ketahanan terhadap *Xoo* masih dalam tahap awal. Informasi keberadaan populasi ras patogen di suatu daerah dapat digunakan untuk memilih dan membudidayakan plasma nutfah tahan. Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa di daerah pertanaman padi di Karesidenan Banyumas untuk wilayah Banjarnegara, Purbalingga, dan Purwokerto terserang berat oleh *Xoo* hingga mencapai 45% dan sampai saat ini patotipe dan genotipenya belum diketahui (Djarmiko & Fatichin, 2007). Hasil penelitian awal Djarmiko & Prakoso (2008) menunjukkan bahwa adanya perbedaan keragaman genetik *Xoo* yang berasal dari berbagai ketinggian tempat di Karesidenan Banyumas.

Berdasarkan pemikiran di atas, maka diperlukan penelitian tentang penentuan patotipe dan keragaman genetik *Xoo* pada tanaman padi di wilayah Karesidenan Banyumas.

Tujuan penelitian yaitu: 1) Mengkarakterisasi *Xoo* dari wilayah Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap dan Kebumen; 2) Mengkaji besarnya kerusakan dan AUDPC (*the area under disease progress curve*) penyakit hawar daun bakteri di wilayah Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap dan Kebumen; 3) Mendapatkan patotipe *Xoo* dengan menggunakan padi

varietas uji; 4) Mendapatkan keragaman genetik *Xoo* yang ditemukan di wilayah Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap dan Kebumen.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan selama 8 bulan mulai bulan April sampai November 2008. Penelitian di laboratorium dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan dan Genetika, Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. Penelitian lapang dilaksanakan di wilayah Karesidenan Banyumas yang meliputi Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap dan Kebumen.

Isolasi dan karakterisasi *X. oryzae* pv. *oryzae* dari wilayah Barlingmascakeb. Isolasi *Xoo* dengan menumbuhkan pada medium SPA atau *sucrose peptone agar* (Suparyono *et al.*, 2004): daun bergejala hawar daun bakteri disterilkan permukaannya dengan alkohol 70%, lalu dibilas dengan air steril tiga kali, dikeringanginkan dan dipotong dengan ukuran 5 x 5 mm, direndam dalam air steril selama 5 menit dalam tabung reaksi. Suspensi tersebut digoreskan pada medium SPA, inkubasi 48–72 jam, diperoleh koloni tunggal berwarna kuning, kemudian disimpan dalam medium SPA miring yang diberi parafin steril untuk disimpan pada suhu 4°C dan dalam air steril yang akan selalu digunakan untuk perbanyakannya. Dari hasil isolasi tersebut ditentukan 18 isolat *Xoo* yang digunakan untuk penelitian selanjutnya. Isolat tersebut dikarakterisasi secara fisika kimia untuk memastikan bahwa patogen hawar daun bakteri adalah *Xoo* yaitu ketahanan terhadap 0,001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, pertumbuhan pada 0,1% TZC, uji Gram, uji Katalase, hidrolisis pati dan pertumbuhan pada medium SPA.

Pengujian *X. oryzae* pv. *oryzae* dengan 5 varietas uji. Delapan belas isolat murni *Xoo* yang sudah dikarakterisasi, kemudian diinokulasikan pada padi varietas Kencana, PB5, Tetep, Kuntulan dan Jawa 14 untuk menentukan patotipe berdasarkan fenotipenya. Lima varietas padi tersebut adalah varietas uji umum digunakan untuk identifikasi dan mengklasifikasikan patotipe *Xoo* (Lee *et al.*, 2003). Pelaksanaannya sebagai berikut: benih padi ditumbuhkan di larutan hara di nyiru bambu. Pada umur bibit 14 hari dipindahkan ke dalam pot dengan diameter 35 cm sebanyak 3 rumpun. Kerapatan inokulum *Xoo* yang diinokulasikan pada tanaman padi 10^9 cfu ml⁻¹ (Yashitola *et al.*, 1997). Inokulasi isolat *Xoo* dilakukan dengan cara *clip-method* yaitu ujung daun padi dipotong kira-kira 2–3 cm dengan gunting yang sudah dicelupkan dalam suspensi *Xoo*, kemudian disungkup dengan plastik selama 24 jam dan diinkubasikan pada suhu 30°C (EPPO, 2007). Pengamatan dilakukan 2 minggu setelah inokulasi untuk mengetahui reaksi setiap varietas uji terhadap 18 isolat bakteri *Xoo*.

Variabel yang diamati. Variabel tersebut yaitu: sifat fisika dan kimia *Xoo* (Ketahanan terhadap 0,001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, pertumbuhan pada 0,1% TZC, uji Gram, uji Katalase, hidrolisis pati, pertumbuhan pada medium SPA), intensitas penyakit, AUDPC dan pola pita DNA.

Untuk menentukan patotipe *Xoo* maka perlu menghitung Intensitas Penyakit dengan rumus menurut Suparyono *et al.* (2004) sebagai berikut:

$$IP = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan:

IP = intensitas penyakit (%)

a = panjang gejala hawar daun bakteri (mm)

b = panjang daun secara keseluruhan (mm)

Tabel 1. Hubungan timbal balik varietas diferensial padi dan patogen *Xoo* berdasar Kadir (1999)

Varietas	Patotipe											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Kencana	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
PB5	T	R	R	R	T	T	R	R	R	T	R	T
Tetep	T	T	R	R	T	R	R	R	T	R	T	T
Kuntulan	T	T	T	R	R	T	T	R	R	R	R	R
Jawa 14	T	T	T	R	T	T	R	T	T	T	R	T

Keterangan: T= tahan; R= rentan.

Reaksi ketahanan tanaman padi terhadap *Xoo* menggunakan pedoman Tabel 2.

Penilaian intensitas penyakit hawar daun bakteri dan AUDPC di Wilayah Karesidenan Banyumas.

Pengamatan intensitas penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh *Xoo* di Wilayah Karesidenan Banyumas menggunakan rumus sebagai berikut:

$$IP = \frac{\sum n \times v}{N \times Z} \times 100\%$$

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 *et al.* (1999), kategori serangan *Xoo* 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%

AUDPC relatif dihitung dengan menggunakan rumus yang dikemukakan oleh Ahmed *et al.* (1999) sebagai berikut:

$$AUDPC = \frac{\sum_{i=1}^n \left[\frac{X_{i+1} + X_i}{2} \right] \times [t_{i+1} - t_i]}{N - 1}$$

Keterangan:

- X_i = keparahan penyakit pada waktu pengamatan
 t = waktu sesudah infeksi tampak di lapangan (hari)
 n = jumlah pengamatan

Pengujian keragaman genetik *X. oryzae* pv. *oryzae*.

Uji keragaman berdasarkan pola pita DNA hasil RAPD dilakukan di Laboratorium Genetika, Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. Pengujian ini merupakan modifikasi Prakoso (2003) dengan tahapan sebagai berikut:

Ekstraksi DNA bakteri *Xoo* dengan metode Wizard Genomic DNA Purification System Kit dari Promega.

Kultur bakteri *Xoo* ditumbuhkan dalam 10 ml medium pepton cair 5% dan digojog dengan *shaker* selama satu malam. Kultur bakteri *Xoo* sebanyak 1 ml dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml, kemudian disentrifus 14.000 rpm dengan sentrifus IEC Micro-MB selama 1 menit. Supernatan dibuang. Proses yang sama diulangi satu kali. Pelet yang terbentuk ditambah 600 μ l *Cell Lysis Solution* hangat dan dihomogenkan. Suspensi sel diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit, sambil digojog 150 rpm pada *waterbath* jenis BS-31. Setelah itu tabung dibiarkan pada suhu ruang selama 5 menit. RNase 3 μ l ditambahkan pada tabung, dihomogenkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam pada *waterbath* BS-31 sambil digojog 150 rpm. Ditambahkan 30 μ l *Protein Precipitation Solution*, digojog dengan vortex selama 5 menit, kemudian disentrifus 14.000 rpm dengan sentrifus IEC Micro-MB selama 2 menit. Supernatan sebanyak 600 μ l dipindahkan ke tabung 1,5 ml baru. Ditambahkan 300 μ l isopropanol, dibolak-balik sebanyak 10 kali, kemudian disentrifus 14.000 rpm dengan sentrifus IEC Micro-MB selama 2 menit. Supernatan dibuang, pelet ditambah etanol 70% sebanyak 500 μ l. Tabung disentil hingga pelet lepas dari dinding tabung, kemudian dibolak-balik sepuluh kali, disentrifus 14.000 rpm dengan sentrifus IEC Micro-MB selama 1 menit, kemudian supernatan dibuang. Pelet dikeringkan dalam LAF selama 30 menit, dengan posisi tutup tabung terbuka agar etanol yang tertinggal dalam tabung menguap. Pelet dilarutkan dalam air steril 100 μ l dan digunakan sebagai DNA stok. Absorbansi larutan DNA diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm untuk menentukan konsentrasinya. Larutan DNA siap digunakan

Pengukuran kualitas dan kuantitas DNA hasil ekstraksi.

DNA hasil ekstraksi divortek selama 1 menit. Spektrofotometer disiapkan hingga stabil, kemudian diatur pada panjang gelombang 260 nm. Dua buah kuvet disiapkan, kuvet pertama diisi dengan air steril sebanyak 120 μ l dan dijadikan sebagai blangko, kemudian kuvet kedua diisi dengan 20 μ l DNA yang telah ditambah air sebanyak 100 μ l. Kuvet dimasukkan ke dalam spektrofotometer untuk mengetahui nilai absorbansinya. Spektrofotometer diatur pada 280 nm dan dilakukan hal yang sama untuk mengetahui nilai serapannya.

Analisis RAPD pada 18 isolat *Xoo*. Analisis RAPD dilakukan dengan mesin PCR untuk mengamplifikasi DNA, dengan menggunakan bahan larutan campuran yang berisi *Easy Do PCR pre Mix* sebanyak 15 μ l, DNA working dengan konsentrasi 20 ng μ l⁻¹ sebanyak 5 μ l, dan primer 10 pmol μ l⁻¹ sebanyak 5 μ l. Tahapan RAPD dilakukan dengan siklus dan pengaturan suhu seperti pada Tabel 3.

Elektroforesis. Elektroforesis DNA dilakukan pada 1,5% gel agarose yang diberi DNA *marker* pada salah satu sumurnya. DNA hasil RAPD sebanyak 12,5 μ l dan DNA marker sebanyak 5 μ l dimasukkan ke dalam sumur gel agarose, satu sumur mewakili satu DNA. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 80 V selama 90 menit. Pita DNA hasil elektroforesis akan terlihat dengan meletakkan gel di atas UV transilluminator dan didokumentasikan dengan kamera digital.

Analisis Data. Data hasil bakteri isolasi dari daun padi bergejala hawar daun bakteri, karakterisasi isolat bakteri berdasar sifat kimia, penilaian penyakit, AUDPC, uji *Xoo* pada padi 5 varietas uji (standar), maupun keragaman genetik dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Karakterisasi Patogen Hawar Daun bakteri. Isolat yang digunakan berasal dari Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap, dan Kebumen. Seluruh sampel daun bergejala hawar daun bakteri ditumbuhkan pada medium SPA (*Sucrose Peptone Agar*). Patogen hawar daun bakteri diuji lanjut dengan menguji sifat biokimia ditunjukkan pada Tabel 4.

Pada Tabel 4 menunjukkan bahwa patogen hawar daun bakteri adalah *Xoo*. Hal tersebut sesuai dengan

Tabel 2. Reaksi tanaman padi berdasarkan nilai kerusakan daun

Reaksi Tanaman	Nilai Kerusakan Daun
Tahan	< 10 mm
Rentan	> 10 mm

Tabel 3. Siklus dan pengaturan suhu PCR untuk RAPD 18 isolat *Xoo*

Fase	Temperatur	Durasi Waktu	Siklus
Denaturasi awal	94°C	5 menit	1 kali
Denaturasi	94°C	1 menit	} 40 kali
Penempelan primer	36°C	1,5 menit	
Sintesis DNA	72°C	3 menit	
Sintesis DNA akhir	72°C	10 menit	1 kali
<i>Hold</i>	4°C	Tak terhingga	

Tabel 4. Karakterisasi bakteri sebagai patogen hawar daun bakteri

Pengujian Biokimia	Hasil Pengujian
Pertumbuhan pada medium SPA	Warna koloni kuning
Reaksi gram	Negatif
Katalase	Positif
Oksidase	Negatif
Pertumbuhan pada 0,1% TZC	Negatif
Hidrolisis pati	Positif
Ketahanan terhadap 0,001% Cu(NO ₃) ₂	Positif

penelitian Djatmiko & Fatichin (2009), berdasarkan pengujian biokimia patogen hawar daun bakteri yaitu pertumbuhan pada medium SPA, reaksi gram, uji katalase, oksidase, O/F, pertumbuhan pada 0,1% TZC, hidrolisis pati, dan ketahanan terhadap 0,001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ menunjukkan bahwa patogen hawar daun bakteri yaitu *Xoo*. Menurut Schaad *et al.* (2001), bakteri kelompok *Xanthomonas* mempunyai sifat oksidase negatif. Genus bakteri kelompok *Xanthomonas* yang ditumbuhkan pada medium SPA menunjukkan sifat gram negatif (Moffett & Croft, 1983), mempunyai flagelum polar tunggal, dan bersifat patogen pada tanaman (Schaad *et al.*, 2001).

Katalase adalah enzim yang mempunyai kemampuan mendekomposisi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Sands, 1990). Lebih lanjut dikatakan, sebagian besar bakteri mempunyai sifat katalase positif. Sebagian besar bakteri kelompok *Xanthomonas* mempunyai sifat katalase positif dan tidak membentuk spora (Liu *et al.*, 2006), serta menghasilkan polisakarida luarsel sebagai sumber “*xanthan gum*” pada medium yang mengandung glukosa (Schaad *et al.*, 2001). Polisakarida luarsel sangat penting dalam pembentukan eksudat bakteri dari daun terinfeksi, melindungi dari kekeringan, dan membantu penyebaran lewat hujan dan angin (Liu *et al.*, 2006).

Pertumbuhan patogen hawar daun bakteri pada medium SPA yang mengandung 0,1% TZC menunjukkan reaksi negatif karena koloni yang tumbuh berwarna oranye bukan merah muda. Warna koloni merah muda menunjukkan bahwa bakteri tersebut bukan *Xanthomonas oryzae*. Menurut Schaad *et al.* (2001), bahwa pertumbuhan *Xanthomonas oryzae* menunjukkan reaksi negatif terhadap 0,1% TZC.

Bakteri hawar daun bakteri pada medium yang mengandung pati, setelah 2 hari inkubasi digenangi larutan lugol (*iodin + potassium iodide*) menunjukkan adanya zona terang di sekitar koloni, sehingga mempunyai kemampuan menghidrolisis pati. Patovar *Xanthomonas oryzae* mempunyai kemampuan menghidrolisis pati (Moffett & Croft, 1983; Rudolph *et al.*, 1990) atau aktivitas amilase (Fahy & Hayward, 1983).

Salah satu yang membedakan antara penyakit hawar daun bakteri (*bacterial leaf blight*) atau penyakit kresak yang disebabkan oleh *Xoo* dan *bacterial leaf streak* yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* adalah ketahanannya terhadap 0,001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (Liu *et al.*, 2006). Patogen hawar daun bakteri yang ditumbuhkan pada medium SPA mengandung 0,001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ menunjukkan

pertumbuhan yang baik dengan koloni berwarna kuning dan berbentuk bulat. Menurut Liu *et al.* (2006), bahwa *Xoo* mempunyai respon positif terhadap 0,001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ dan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* berespons negatif terhadap 0,001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

Hasil tersebut sesuai dengan peneliti lain yang ditunjukkan pada Tabel 5. Berdasarkan Tabel tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang diuji termasuk *Xoo*.

Penentuan Patotipe *X. oryzae* pv. *oryzae* dari Barlingmascakeb. Penentuan patotipe *Xoo* pada lima varietas standar dari berbagai barlingmascakeb ditunjukkan Tabel 6.

Hasil inokulasi *Xoo* pada 5 varietas padi (Kencana, PB5, Tetep, Kuntulan, dan Jawa 14) menunjukkan intensitas penyakit dan reaksi tanaman beragam. Hal ini menunjukkan adanya keragaman isolat tersebut dalam menyebabkan reaksi ketahanan pada 5 varietas padi. Berdasarkan Tabel 6 dan penentuan patotipe menurut Kadir (1999), isolat Bj1 (isolat asal Banjarnegara) digolongkan patotipe X dan isolat C4 (isolat asal Cilacap), serta P2 (isolat asal Purbalingga) digolongkan patotipe II, sedangkan C5 (isolat asal Cilacap) digolongkan patotipe I.

Daerah Kabupaten Banyumas dan Kebumen tidak terdeteksi berdasarkan pengolongan patotipe yang dikembangkan oleh Kadir (1999), diduga *Xoo* di Kabupaten Banyumas dan Kebumen mempunyai patotipe baru.

Penyebaran *Xoo* patotipe X, II dan I, dan II masing-masing ada di Kabupaten Banjarnegara, Cilacap, dan Purbalingga. Hal berkaitan di 3 kabupaten penanam varietas Ciherang yang disukai oleh petani di daerah tersebut. Varietas Ciherang adalah varietas yang rentan terhadap penyakit hawar daun bakteri. Selain itu, seiring dengan meluasnya penanaman padi varietas Ciherang yang rentan terhadap penyakit hawar daun bakteri menyebabkan kelompok patotipe baru menjadi berkembang di suatu wilayah. Menurut Reddy *et al.* (1979), bahwa penyakit hawar daun bakteri berkembang pesat pada varietas padi yang rentan. Beragamnya patotipe di lapangan karena adanya perbedaan sifat fisiologis tanaman maupun faktor lingkungan (suhu dan kelembapan). Suhu dan kelembapan di daerah Banjarnegara, Cilacap, dan Purbalingga yaitu masing-masing 24–27°C dan 60–75%, sedangkan suhu optimum yang menguntungkan perkembangan penyakit hawar daun bakteri adalah 26–30°C. Menurut Hwang *et al.* (1987 dalam Sudir, 2009), bahwa faktor yang berpengaruh terhadap interaksi stadium tumbuh tanaman dengan variasi patotipe patogen adalah fenomena sifat

Tabel 5. Sifat biokimia dan fisiologi bakteri uji

Pengujian	Bakteri yang diuji	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>				
		Goto (1992)	Lelliot & Stead (1987)	Moffett & Croft (1983)	Schaad <i>et al.</i> (2001)	Liu <i>et al.</i> (2006)
Uji reaksi gram	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Uji katalase	Positif	T	Positif	Positif	Positif	Positif
Uji oksidase	Negatif	T	Negatif	Negatif	Negatif	T
Uji O/F	T	Oksidatif	Oksidatif	T	Oksidatif	Oksidatif
Pertumbuhan pada 0,1% TZC	Negatif	Negatif	Negatif	T	T	T
Pertumbuhan pada medium YDC	Positif	T	T	T	Positif (kuning)	T
Ketahanan terhadap 0,001% Cu(NO ₃) ₂	Positif	T	T	T	T	Positif
Pertumbuhan pada medium SPA	Kuning, bulat, halus, cembung, berlendir	Kuning, bulat, halus, cembung, berlendir	Kuning, bulat, halus, cembung, berlendir	Kuning, bulat, halus, cembung, berlendir	T	T
Pertumbuhan pada suhu 35°C	T	T	T	Positif	Positif	T
Hidrolisis pati	Positif	T	T	T	T	T

Keterangan: T= tidak diamati.

Tabel 6. Hasil inokulasi *Xoo* pada lima varietas uji padi (Kencana, PB5, Tetep, Kuntulan, dan Jawa 14)

Isolat	Kencana		PB5		Tetep		Kuntulan		Jawa 14		Patotipe
	IP (%)	Reaksi	IP (%)	Reaksi	IP (%)	Reaksi	IP (%)	Reaksi	IP (%)	Reaksi	
Bj1	26,9	R	8,7	T	21,1	R	26,3	R	4,6	T	X
Bj3	3,4	T	20,33	R	29,1	R	3,9	T	3,8	T	Negatif
Bj4	5,04	T	39,22	R	23,8	R	1,1	T	100	R	Negatif
B3	8,5	T	14,1	R	1,6	T	1,4	T	18,25	R	Negatif
B4	1,7	T	13,7	R	26,4	R	1,03	T	100	R	Negatif
C4	14,3	R	19,8	R	2,08	T	6,8	T	1,8	T	II
C5	48,6	R	0	T	1,96	T	0,83	T	3,3	T	I
K1	23,7	R	0	T	21,5	R	27,7	R	55,5	R	Negatif
K2	3,8	T	6,5	T	14,3	R	26,7	R	4,8	T	Negatif
K3	11,7	R	0,9	T	2,7	T	17,8	R	100	R	Negatif
K4	11,02	R	0	T	16,1	R	27,8	R	46,7	R	Negatif
K5	3,3	T	3,26	T	31,9	R	12,3	R	1,6	T	Negatif
K6	2,6	T	0,23	T	75,7	R	36,4	R	37,8	R	Negatif
K7	2,7	T	14,3	R	3,17	T	2,8	T	24,6	R	Negatif
P1	74,7	R	1,36	T	1,4	T	56,4	R	75,8	R	Negatif
P2	19,43	R	17,7	R	1,44	T	2,9	T	4,1	T	II

Keterangan: Bj1, Bj3, Bj4: isolat *Xoo* asal Banjarnegara; B3 dan B4: isolat *Xoo* asal Banyumas; C4 dan C5: isolat *Xoo* asal Cilacap; K1, K2, K3, K4, K5, K6, dan K7: isolat *Xoo* asal Kebumen; P1 dan P2: isolat *Xoo* asal Purbalingga.

tahan yang muncul pada saat tanaman mencapai umur tertentu, mutasi gen patogen, dan sifat heterogen alamiah yang ada pada populasi patogen.

Pengamatan Intensitas Penyakit dan AUDPC. Pengukuran intensitas penyakit hawar daun bakteri dan AUDPC dilakukan di 5 kabupaten selama 8 kali pengamatan (Tabel 7).

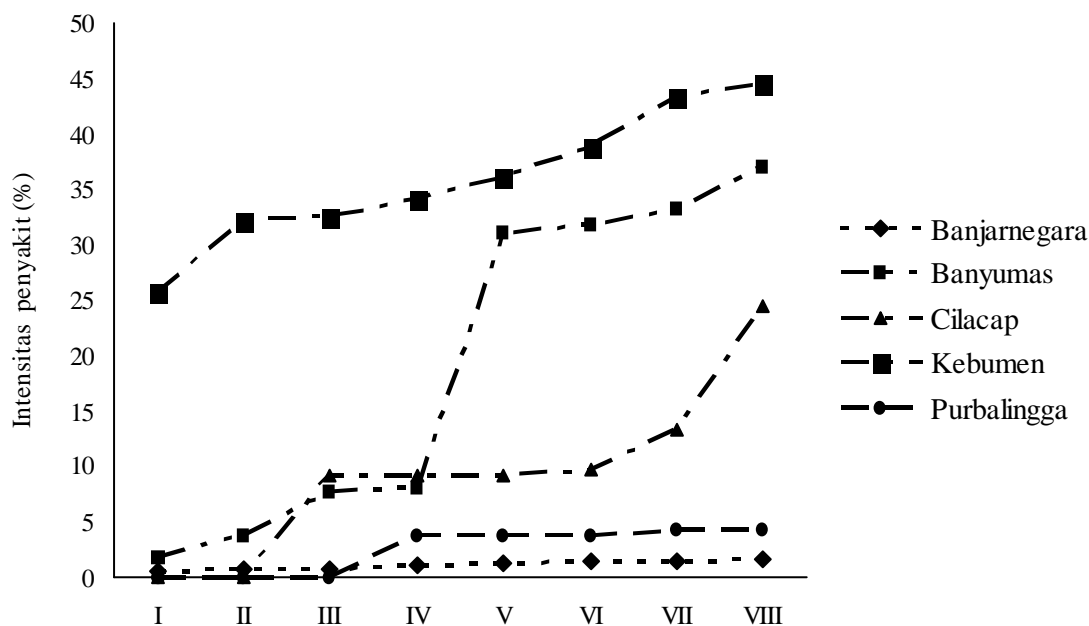
Tabel 7 menunjukkan bahwa intensitas penyakit dan AUDPC (per hari) tertinggi masing-masing adalah 44,62% dan 0,2996% di Kabupaten Kebumen dan terendah di Kabupaten Banjarnegara masing-masing adalah 1,60% dan 0,0092. Berdasarkan kenyataan tersebut, penyakit hawar daun bakteri berpotensi menimbulkan epidemi di Kabupaten Kebumen. Selain itu, penyakit hawar daun bakteri di Kabupaten Cilacap

dan Banyumas juga berpotensi menimbulkan epidemi karena menunjukkan peningkatan perkembangan penyakit secara nyata (Gambar 1).

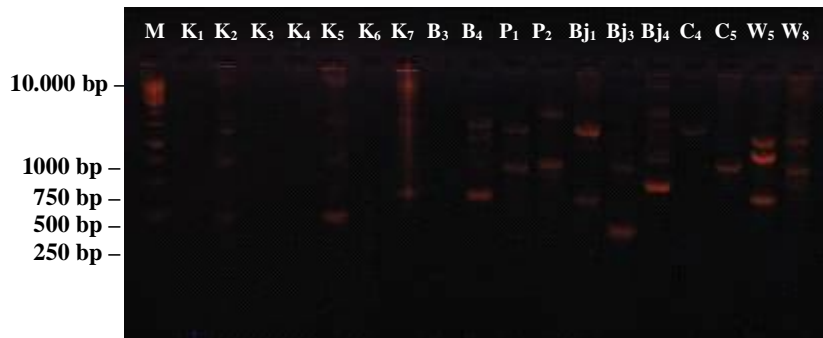
Besarnya intensitas penyakit di Kabupaten Kebumen dikarenakan lingkungan areal pertanaman padi sesuai dengan perkembangan penyakit hawar daun bakteri, diantaranya ketinggian tempat (8 m dpl), suhu sekitar 24–27°C. Selain itu, faktor lain juga mendukung yaitu varietas Cihayang padi merupakan varietas yang rentan, belum pernah dilakukan pengendalian terhadap penyakit hawar daun bakteri. Pupuk kandang berpengaruh nyata terhadap keparahan penyakit hawar daun bakteri (Sudir & Abdulrachman, 2009). Menurut Reddy *et al.* (1979), faktor yang mempengaruhi perkembangan penyakit hawar daun bakteri yaitu aplikasi pupuk Nitrogen yang tinggi. Pemupukan

Tabel 7. Intensitas penyakit hawar daun bakteri dan AUDPC di Wilayah Karesidenan Banyumas

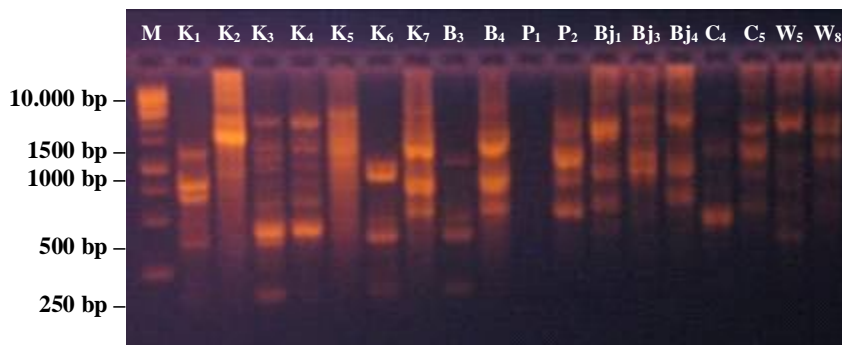
Kabupaten	Intensitas Penyakit (%) pada minggu ke-								AUDPC relatif
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Banjarnegara	0,50	0,70	0,80	1,00	1,20	1,50	1,50	1,60	0,0092
Banyumas	1,85	3,7	7,78	8,15	31,11	31,85	33,33	37,04	0,1606
Cilacap	0,00	0,00	9,26	9,26	9,26	9,63	13,33	24,44	0,0707
Kebumen	25,76	32,18	32,64	34,18	36,16	38,84	43,30	44,62	0,2996
Purbalingga	0	0	0	3,70	3,70	3,70	4,40	4,40	0,0210



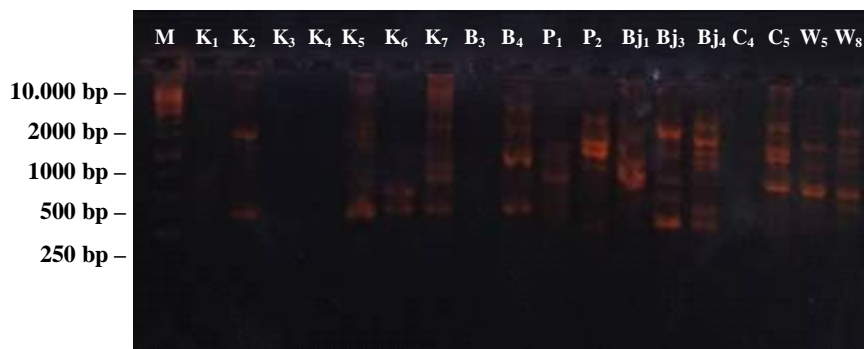
Gambar 1. Perkembangan penyakit hawar daun bakteri di Kabupaten Banjarnegara, Banyumas, Cilacap, Kebumen, dan Purbalingga



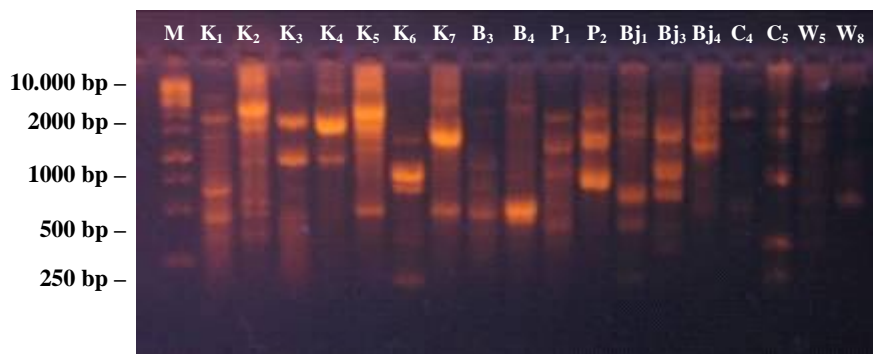
Gambar 2. Pola pita hasil RAPD menggunakan primer OPA 10
Keterangan: M = 1 Kb DNA *ladder* dari Fermentas; K₁–W₈ = hasil RAPD isolat *Xoo*.



Gambar 3. Pola pita hasil RAPD menggunakan primer OPA 18
Keterangan: M = 1 Kb DNA *ladder* dari Fermentas; K₁–W₈ = hasil RAPD isolat *Xoo*.



Gambar 4. Pola pita hasil RAPD menggunakan primer OPA 244.
Keterangan: M = 1 Kb DNA *ladder* dari Fermentas; K₁–W₈ = hasil RAPD isolat *Xoo*.



Gambar 5. Pola pita hasil RAPD menggunakan primer UBC 100

Keterangan: M = 1 Kb DNA ladder dari Fermentas; K_1 – W_8 = hasil RAPD isolat *Xoo*.

Nitrogen yang tinggi juga mempengaruhi perbanyakannya patogen dan perkembangan bercak.

Keragaman Patotipe dan Genotipe *Xoo* dari Barlingmascakeb. Keragaman genotipe 18 isolat *Xoo* yang diamati dengan pola RAPD ditunjukkan pada Gambar 2, 3, 4, dan 5.

Gambar 2–5 menunjukkan pola pita 18 isolat *Xoo* dengan menggunakan primer OPA 10, OPA 18, OPA 244, dan UBC 100, dengan marker 1 kb dari Fermentas. Berdasarkan gambar dapat terlihat adanya perbedaan jumlah dan ukuran pita DNA dari 18 isolat *Xoo* hasil RAPD, kecuali pada primer OPA 18 isolat K_7 dan B_4 menunjukkan adanya persamaan pola pita DNA. Tetapi dengan menggunakan primer OPA 10, OPA 244, dan UBC 100 isolat K_7 dan B_4 menunjukkan pola pita yang berbeda.

Ukuran basa tertinggi pada primer OPA 10, OPA 18, dan UBC 100 yaitu di atas 10.000 bp, dan ukuran basa terendah yaitu di bawah 250 bp. Sedangkan pada primer OPA 244, isolat dengan ukuran basa tertinggi adalah 10.000 bp dan yang terendah berukuran antara 250–500 bp. Variasi ukuran dan jumlah pita DNA pada hasil elektroforesis memungkinkan adanya perbedaan genetik 18 isolat *Xoo* asal 6 wilayah Kabupaten yaitu Banjarnegara, Banyumas, Cilacap, Kebumen, dan Purbalingga.

SIMPULAN

Penyebab penyakit hawar daun bakteri pada tanaman padi di Wilayah Karesidenan Banyumas adalah *Xoo* dengan ciri warna koloni kuning pada medium SPA, reaksi gram negatif, katalase positif, oksidase negatif, pertumbuhan pada 0,1% TZC negatif, hidrolisis pati

negatif, dan ketahanan terhadap 0,001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ positif. Kerusakan serangan *Xoo* dan AUDPC terbesar ada di Kabupaten Kebumen yaitu masing-masing 44,62% dan 0,2996%. Patotipe *Xoo* yang ditemukan di Kabupaten Banjarnegara yaitu patotipe X, Kabupaten Cilacap yaitu patotipe I dan II, dan Kabupaten Purbalingga yaitu patotipe II, berbeda dengan yang umum di Jawa Barat yaitu patotipe IV dan VIII. Delapan belas isolat *Xoo* yang berasal dari Wilayah Karesidenan Banyumas (Banjarnegara, Purbalingga, Banyumas, Cilacap, dan Kebumen) berdasarkan pola pita hasil RAPD DNA berbeda satu dengan yang lain

SANWACANA

Terima kasih kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional atas dana Hibah Penelitian Strategi Nasional dan Fundamental tahun 2009 yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah B. 2002. Inovasi teknologi padi tipe baru, pengelolaan tanaman dan sumber daya terpadu dan integrasi padi dan ternak. *Seminar Temu Lapang Balitpa*, Subang 26 September 2002.
- Ahmed HU, Finckh MR, Alfonso RF & Mundt CC. 1999. Epidemiological effect of gene deployment strategies on bacterial blight of rice. *Phytopathology* 87: 66–70.
- Babu AG & Thind BS. 2005. Potential use of combinations of *Pantoea agglomerans*,

- Pseudomonas fluorescens*, and *Bacillus subtilis* AS biocontrol agents for the control of bacterial blight of rice. http://www.agridept.gov.lk/other_sub_pages.php?id=8. Diakses tanggal 10 Oktober 2009.
- BPS. 2006. Production of paddy maize and soybeans. (On line) [http://www.bps.go.id/releases/Production of Paddy Maize and Soybeans/Bahasa Indonesia/index.html](http://www.bps.go.id/releases/Production%20of%20Paddy%20Maize%20and%20Soybeans/Bahasa%20Indonesia/index.html). Diakses tanggal 29 Desember 2006.
- BPS. 2008. Produksi padi, jagung, dan kedelai. (Angka perkiraan sementara tahun 2007 dan angka ramalan I Tahun 2008). (On-line). <http://www.bps.go.id/release/files/aram-03mar08.pdf>. Diakses tanggal 14 Oktober 2008.
- Djarmiko HA & Fatichin. 2007. Ketahanan 20 varietas padi terhadap penyakit hawar daun bakteri. *Laporan Penelitian*. Fakultas Pertanian, Unsoed, Purwokerto.
- Djarmiko HA & Fatichin. 2009. Ketahanan dua puluh satu varietas padi terhadap penyakit hawar daun bakteri. *J. Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* 9: 168–173.
- Djarmiko HA & Prakoso. 2008. Keragaman patotipe dan genotipe *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada tanaman padi dari berbagai ketinggian tempat. *Laporan Penelitian*. Fakultas Pertanian, Unsoed, Purwokerto.
- EPPO. 2007. *Xanthomonas oryzae*. *Buletin OEPP/EPPO* 37: 543–553.
- Fahy PC & Hayward AC. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic test. Pp. 337–378. In: P.C. Fahy and G.J. Persley (Eds.), *Plant Bacterial Disease*. Academic Press, London.
- Goto M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, Tokyo.
- Gupta VS, Rajebhosale MD, Sodhi M, Singh S, Gnanamanickam SS, Dhaliwal HS, & PK Ranjekar. 2001. Assessment of genetic variability and strain identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Using RAPD-PCR and *IS1112*-based PCR. *Current Science* 80: 1043–1049.
- Husodo SY. 2004. *Swasembada beras masih labil*. (On line) <http://www.kapan.lagi.com/h/0000039194.html>. Diakses tanggal 5 Januari 2007.
- IRRI. 2003. *Bacterial leaf blight*. (On line) http://www.knowledgebank.irri.org/riceDoctor/MX/Fact_Sheets/Diseases/Bacterial_Leaf_Blight.htm. Diakses tanggal 2 Januari 2007.
- Kadir TS. 1999. Variasi patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Prosiding Kongres Nasional XV dan Seminar Ilmiah PFI*, Purwokerto, 16-18 September 1999.
- Keller B, Feuillet C & Messmer M. 2000. Basic Concepts and Application in Resistance Breeding. Pp. 101–160 In: Slusarenko AJ, Fraser RSS, van Loon LC, eds. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Kluwer Academic Publisher, London.
- Khan TUZ, Yasin SI, Ayub M, Shah JA & Ahmad M. 2005. Effect of different chemicals and antibiotics on bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) of rice. *Mycopath* 3: 57–59.
- Lee KS, Rasabandith S, Angeles ER & Khush GS. 2003. Inheritance of resistance to bacterial blight in 21 cultivars of rice. *Phytopathology* 93: 147–152.
- Lelliot RA & Stead DE. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publications, Melbourne.
- Liu DN, Ronald PC & Bogdanove AJ. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* 7: 303–324.
- Moffett MJ & Croft BJ. 1983. *Xanthomonas*. Pp. 189–228 In: Fahy PC & Persley GJ, eds. *Plant Bacterial Diseases*. Academic Press, London.
- Mundt CC, Ahmed HU, Finckhn MR, Nieva LP & Alfonso RF. 1999. Primary disease gradients of bacterial blight of rice. *Phytopathology* 89: 64–67.

- Papanek CC. 2005. *Budidaya Tanaman Padi*. (Online). http://distan.gorotanloprov.go.id/agronomi/komiditi_tanaman_pangan/budidaya%20padi.pdf. Diakses tanggal 10 Oktober 2008.
- Prakoso B. 2003. Detection and quantification of genetically modified soybean in tempe. *Dissertation*. Asian Institute of Technology Bangkok.
- Prihatiningsih N & Djatmiko HA. 2001. Eksistensi jamur patogen dan filoplan pada tanaman padi akibat perlakuan fungisida serta pengaruhnya terhadap penyelamatan produksi. *Prosiding Kongres Nasional XVI dan Seminar Ilmiah PFI*, Bogor, 22-24 Agustus 2001.
- Reddy APK, MacKenzie DR, Rouse DI & Rao AV. 1979. Relationship of bacterial leaf blight severity to grain yield of rice. *The American Phytopathological Society* 69: 967–969.
- Rudolph K, Roy MA, Sasser M, Stead DE, Davis M, Swings J & Gossele F. 1990. Isolation of bacteria. Pp. 45–86 In: Klement Z, Rudolph K & Sands DC, eds. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest.
- Sands DC. 1990. Physiological criteria-determinative test. Pp. 133–143 In: Klement Z, Rudolph K & Sands DC, eds, *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest.
- Schaad NW, Jones JB & Lacy GH. 2001. *Xanthomonas*. Pp. 175–200 In: Schaad NW, Jones JB & Chun W, eds. *Laboratory Guide For Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, St. Paul. Minnesota.
- Srinivasan B & Gnanamanickam SS. 2005. Identification of a new source of resistance in wild rice, *Oryza rufipogon* to bacterial blight of rice caused by Indian strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Current science* 88: 1229–1231.
- Sudir. 2009. Struktur patotipe *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada stadium tumbuh berbeda beberapa varietas. Hlm. 421–429 Dalam: Suprihatno B *et al.*, eds. *Prosiding Seminar Nasional Padi, Balai Besar Penelitian Tanaman Padi tahun 2009*.
- Sudir & Abdulrachman S. 2009. Pengaruh pupuk terhadap penyakit hawar daun bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada varietas padi unggul baru, tipe baru, dan hibrida. Hlm. 431–441 Dalam: Suprihatno B *et al.*, eds. *Prosiding Seminar Nasional Padi, Balai Besar Penelitian Tanaman Padi tahun 2009*.
- Suparyono, Sudir & Suprihanto. 2004. Pathotype profile of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from the rice Ecosystem in java. *Indonesian Journal of Agriculture Science* 5: 63–69.
- Tjubarjat T, Kadir TS & Sumadi E. 1999. Skrining varietas terhadap hawar daun bakteri. *Prosiding Kongres Nasional XV dan Seminar Ilmiah PFI*, Purwokerto, 16-18 September 1999.
- Yashitola J, Krishnaveni D, Reddy APK & Sonti RV. 1997. Genetic diversity within the population of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in India. *Phytopathology* 87: 760–765.
- Yasin SI, Khan TUZ, Ayub M, Shah JA & Anwar M. 2005. Economic evaluation of bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) disease of rice. *Mycopath* 3: 65–67.