

***Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* BAKTERI PENYEBAB HAWAR DAUN PADA PADI: ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN TELAAH MUTAGENESIS DENGAN TRANSPOSON**

Aris Tri Wahyudi^{1*)}, Siti Meliah¹, dan Abdjad Asih Nawangsih²

1. Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor, Darmaga, Bogor 16680, Indonesia
2. Departemen Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

^{*)}E-mail: ariswa@ipb.ac.id

Abstrak

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) menyebabkan hawar daun bakteri (HDB) pada padi (*Oryza sativa* L.), yang merupakan penyakit utama dan menjadi pembatas bagi produksi tanaman pokok di banyak negara di dunia. Isolasi *Xoo* dilakukan dari daun padi yang terserang hawar daun bakteri. Identifikasi *X. oryzae* pv. *oryzae* dilakukan berdasarkan pada gejala yang ditimbulkannya, patogenisitas, karakter morfologi, fisiologi, dan genetik biakan bakteri yang diisolasi dari tanaman padi yang terinfeksi *Xoo*. Sebanyak 50 isolat yang diduga *Xoo* telah berhasil diisolasi. Bakteri tersebut bersifat aerobik, berbentuk batang, dan tergolong Gram negatif. Isolat-isolat tersebut diuji hipersensitivitasnya pada tanaman tembakau dan patogenisitasnya pada padi. Kelima puluh isolat bakteri tersebut mampu menginduksi reaksi hipersensitif pada tanaman tembakau dan menyebabkan gejala sakit pada tanaman padi dengan perkembangan gejala yang berbeda. Hasil uji fisiologi, reaksi hipersensitivitas dan patogenisitas, tiga isolat bakteri yang diduga kuat *Xoo* yaitu STG21, STG42, dan STG46 menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak membentuk indol, tidak menghasilkan pigmen fluoresens, menghidrolisis kasein, memiliki aktivitas enzim katalase, tetapi tidak memiliki aktivitas enzim oksidase. Hasil parsial sekuensing gen penyandi 16S rRNA dari STG21 dan STG42 menunjukkan homologi dengan *X. oryzae* pv. *oryzae* masing-masing sebesar 80% dan 82%, sedangkan STG46 menunjukkan homologi dengan *X. campestris* sebesar 84%. Mutagenesis dengan transposon Mini-Tn5 pada STG21 menghasilkan salah mutan (M5) yang tidak dapat menginduksi reaksi hipersensitif pada tanaman tembakau dan berkurang patogenisitasnya pada padi. Panjang gejala HDB pada padi yang ditimbulkan mutan M5 berkurang sebesar 80%.

Abstract

***Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* the Causal Agent of Bacterial Leaf Blight of rice: Isolation, Characterization, and Study of Transposon Mutagenesis.** *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) causes bacterial leaf blight (BLB) of rice (*Oryza sativa* L.), a major disease that constrains production of the staple crop in many countries of the world. Identification of *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) was conducted based on the disease symptoms, pathogenicity, morphological, physiological, and genetic characteristics of bacterial cultures isolated from the infected plants. Fifty bacterial isolates predicted as *Xoo* have been successfully isolated. They are aerobic, rod shaped, and Gram negative bacteria. The isolates were evaluated for their hypersensitivity in tobacco and pathogenicity in rice plant. Fifty isolates induced hypersensitive reaction in tobacco and showed pathogenicity symptom in rice in different length. Based on physiological test, hypersensitivity and pathogenicity reactions, three bacterial isolates strongly predicted as *Xoo*, i.e. STG21, STG42, and STG46, were non indole formation, non pigment fluorescent, hydrolyzed casein, catalase activity positive, but negative oxidase. Partial sequencing of 16S rRNA genes of STG21 and STG42 showed 80% and 82% homology with *X. oryzae*, respectively, while STG46 showed 84% homology with *X. campestris*. Mini-Tn5 transposon mutagenesis of STG21 generated one of the mutants (M5) losted it's ability to induce hypersensitive reaction in tobacco plant and deficient in pathogenicity on rice. The lesion length of rice leaf caused by the mutant M5 decreased up to 80%.

Keywords: bacterial leaf blight, characterization, isolation, transposon mutagenesis, Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*

1. Pendahuluan

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) merupakan bakteri Gram negatif yang menyebabkan penyakit

hawar daun bakteri (HDB) pada padi. HDB tergolong penyakit penting di banyak negara penghasil padi. Hal ini disebabkan karena HDB dapat mengurangi hasil panen dengan tingkat yang bervariasi, tergantung pada

stadium pertumbuhan tanaman yang terinfeksi, tingkat kerentanan kultivar padi, dan kondisi lingkungan [1]. Kerugian yang ditimbulkan oleh HDB di wilayah tropis lebih tinggi dibandingkan di wilayah subtropik. Serangan HDB di Indonesia menyebabkan kerugian hasil panen sebesar 21-36% pada musim hujan dan sebesar 18-28% pada musim kemarau [2]. Luas penularan penyakit HDB pada tahun 2006 mencapai lebih dari 74 ribu ha, 16 ha diantaranya menyebabkan tanaman puso [3]. 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. Strain IV dan VIII diketahui mendominasi serangan HDB pada tanaman padi di Indonesia [4]. Keragaman komposisi strain *Xoo* juga dipengaruhi oleh stadium tumbuh tanaman padi. Dominasi kelompok strain yang ditemukan pada stadium anakan, berbunga, dan pemasakan berbeda [5]. Fenomena ketahanan tanaman dewasa, mutasi, dan karakter heterogenitas alamiah populasi mikroorganisme diperkirakan sebagai faktor yang mempengaruhi komposisi strain dengan stadium tumbuh tanaman padi.

Xoo menginfeksi tanaman dengan cara masuk kedalam jaringan tanaman melalui luka, hidatoda, stomata, atau benih yang terkontaminasi [6]. 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 kuning kemudian putih. 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 [7].

Upaya pengendalian HDB di dunia terkendala oleh kemampuan patogen untuk membentuk strain baru yang lebih virulen sehingga teknologi pencarian varietas yang tahan terhadap HDB menjadi kurang efektif. Sementara itu, penggunaan pestisida berupa bahan kimia antibakteri diketahui dapat menyebabkan gangguan pada kesehatan manusia dan lingkungan karena meninggalkan residu. Oleh karena itu, penggunaan agens biokontrol yang tepat dapat menjadi solusi alternatif untuk mengendalikan penyakit HDB.

Bakteri isogenik yang nonpatogen diketahui dapat digunakan sebagai agens biokontrol karena dapat berkompetisi dengan bakteri patogen. Bakteri isogenik yang nonpatogen tersebut dapat dihasilkan melalui mutagenesis menggunakan transposon [8]. Transposon merupakan fragmen DNA yang dapat berpindah dari

satu ruas DNA ke ruas DNA lain dalam replikon yang sama atau antar replikon yang berbeda. Transposon akan menyisip ke dalam genom dan terutama sekuen DNA yang berperan dalam regulasi suatu proses fisiologis tertentu seperti sifat virulen, sehingga dapat menyebabkan perubahan ekspresi gen.

Transposon mini-Tn5Km1 digunakan untuk mengkonstruksi mutan *Xoo* yang tidak menginduksi reaksi hipersensitivitas sehingga kehilangan atau berkurang sifat virulennya. Pemanfaatan mutan bakteri yang berkurang atau hilang sifat virulennya diharapkan mampu membantu mengurangi kerugian produksi padi akibat penyakit HDB. Penelitian ini bertujuan mengisolasi, mengidentifikasi *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, dan mengkonstruksi mutan *Xoo* isogenik nonpatogenik melalui mutagenesis dengan transposon.

2. Metode Penelitian

Galur Bakteri, Media, Antibiotik, dan Tanaman. Bahan yang digunakan terdiri dari 50 isolat bakteri hasil isolasi di daerah persawahan Situgede dan Ciherang, Bogor, Jawa Barat. Galur bakteri dan plasmid yang digunakan lebih lanjut dalam penelitian ini tercantum pada Tabel 1. Media pertumbuhan yang digunakan yaitu *Xanthomonas* Agar (XA) (CaCO₃ 30 g/L, glukosa 10 g/L, yeast extract 5 g/L, dan agar 15 g/L), Luria Agar (LA) (*tryptone* 10 g/L, NaCl 10 g/L, yeast extract 5 g/L, dan agar 15 g/L), *Luria Bertani Broth* (LB), dan *Nutrient Agar* (NA) (NB 8 g/L dan agar 20 g/L). Antibiotik yang digunakan terdiri dari Rifampisin, Tetrasiklin, Kloramfenikol, Streptomisin, dan Kanamisin (Sigma). Tanaman tembakau dan benih padi IR64 berturut-turut digunakan untuk uji hipersensitivitas dan patogenisitas.

Isolasi *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (*Xoo*). Daun padi yang menunjukkan gejala HDB diambil dari persawahan Situgede dan Ciherang kemudian dipotong-potong dan direndam dalam larutan garam fisiologis 0,85%. Suspensi bakteri diencerkan hingga 10⁻⁶ dan disebar menggunakan metode cawan sebar pada media XA. Selanjutnya dilakukan pemurnian koloni dengan metode gores kuadran hingga diperoleh koloni tunggal. Koloni tunggal yang telah diperoleh diremajakan pada media agar miring XA.

Uji hipersensitivitas. Uji hipersensitivitas isolat bakteri terhadap tanaman tembakau dilakukan menurut Zou [9]. Koloni bakteri hasil isolasi dengan kerapatan ±10⁸ sel/mL dalam kultur cair disuntikkan ke daun tanaman tembakau menggunakan *syringe* 1 mL (tanpa jarum). Sebagai kontrol positif digunakan *Pseudomonas* sp. Crb 69 dan Crb 70 yang merupakan bakteri patogen tanaman, sedangkan untuk kontrol negatif digunakan *Escherichia coli* (DH5α) dan akuades. Pengamatan gejala penyakit dilakukan hingga 48 jam setelah penyuntikan.

Tabel 1. Galur Bakteri dan Plasmid yang Digunakan dalam Penelitian

Galur bakteri atau plasmid	Karakteristik	Sumber atau referensi
Galur <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		
STG21	Pat ⁺ (pathogen)	
STG42	Pat ⁺	
STG46	Pat ⁺	
MSTG21	Rif ^r , Pat ⁺	
M5	Rif ^r , Kan ^r	
Galur <i>Escherichia coli</i>		
S17-1 (λ pir)	Ap ^r , Km ^r	[10]
DH5 α	Hrp ⁻	Koleksi Lab Mikrobiologi IPB
Galur <i>Pseudomonas</i> sp.		
Crb 69	Hrp ⁺	[11]
Crb 70	Hrp ⁺	[11]
Plasmid		
pUTmini-Tn5Km1	mini-Tn5Km1: Ap ^r , Km ^r	[10]

Uji patogenisitas. Benih padi IR64 yang telah disterilkan dengan Natrium-hipoklorit 2% ditumbuhkan dalam keadaan steril di dalam *growth chamber* hingga berusia dua minggu. Daun padi selanjutnya dilukai dengan gunting dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri (kerapatan $\pm 10^8$ sel/ mL) selama ± 10 detik. Pengamatan gejala penyakit dilakukan pada 3 dan 14 hari setelah inokulasi, selanjutnya dilakukan isolasi kembali bakteri dari daun padi yang menunjukkan gejala HDB. Uji patogenisitas dinyatakan positif jika diperoleh koloni bakteri yang serupa dengan bakteri yang diinokulasikan pada daun padi dan dinyatakan negatif jika koloni yang diperoleh tidak serupa dengan bakteri yang diinokulasikan.

Karakterisasi fisiologi dan identifikasi molekuler. Identifikasi berdasarkan karakter fisiologi pertama-tama dilakukan dengan pewarnaan Gram untuk melihat jenis dan bentuk bakteri. Tiga isolat bakteri yang diduga kuat *Xoo* yaitu STG21, STG42, dan STG46, selanjutnya dikarakterisasi secara fisiologi dengan menggunakan *kit* MicrogenTM GN-ID A + B panel. Isolat bakteri dalam media XA berusia 24 jam diambil sebanyak 7 lup kemudian dilarutkan dalam 10 mL larutan NaCl 0,85% steril. Sebanyak 20 μ L di pipet ke dalam masing-masing lubang panel *kit* Microgen. Minyak mineral ditambahkan kedalam lubang panel tertentu lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, kedalam lubang panel tertentu ditambahkan reagen sebanyak 20 μ L. Pembacaan hasil uji dilakukan dengan mencocokkan perubahan warna pada tiap lubang panel uji terhadap *color chart* yang tersedia. Pengujian

lainnya terhadap kemampuan hidrolisis pati, hidrolisis kasein, katalase, VP, dan uji pigmen fluoresens dilakukan secara manual.

Isolasi DNA genom untuk identifikasi molekuler dilakukan dengan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Amonium Bromide*) [12]. DNA genom yang diperoleh digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer spesifik untuk prokariot, yaitu 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan 1387r (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3') [13]. Komposisi reaksi PCR terdiri dari enzim La Taq DNA polymerase 0,25 μ L, 2X buffer GC 12,5 μ L, dNTP mixture 4 μ L, primer 63f 1 μ L, primer 1387r 1 μ L, ddH₂O 2,25 μ L, dan DNA genom 4 μ L. Kondisi PCR yang digunakan yaitu predenaturasi (94 °C, 5 menit), denaturasi (94 °C, 1 menit), *annealing* (55 °C, 1 menit), *Elongation* (72 °C, 1 menit), dan *post* PCR (72 °C, 7 menit) sebanyak 25 siklus. Pemisahan DNA produk PCR dilakukan pada mesin Elektroforesis mini-gel menggunakan agarose 1% pada tegangan listrik 70 Volt selama 45 menit. Visualisasi DNA dilakukan diatas UV transluminator menggunakan pewarna Ethidium Bromida (EtBr).

DNA hasil amplifikasi diseku untuk mengetahui urutan basa nukleotidanya menggunakan jasa PT Charoen Phokphand Indonesia, Jakarta. Urutan basa nukleotida hasil seku kemudian disejajarkan dengan data GeneBank menggunakan program BLASTN (*basic local alignment search tool-nucleotida*) dari situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Uji resistensi antibiotik. Isolat bakteri STG21, STG42, dan STG46 diuji resistensinya terhadap antibiotik: Rifampisin (Rif), Tetrasiklin (Tet), Kloramfenikol (Chl), Streptomisin (Strep), dan Kanamisin (Kan) masing-masing dengan konsentrasi 50 μ g/mL. Isolat bakteri digores pada media XA yang telah diberi masing-masing antibiotik dengan pengulangan sebanyak tiga kali (triplo).

Mutasi spontan *Xoo* dengan rifampisin. Sebanyak 1 lup biakan bakteri berusia 24 jam ditumbuhkan dalam media cair XA + rif (50 μ g/mL) selama 2 hari. Bakteri yang tumbuh dipindahkan ke media cair XA + rif (100 μ g/mL). Setelah 2 hari, disebar pada media padat XA + rif (50 μ g/mL). Koloni yang tumbuh digores pada media agar miring XA + rif (50 μ g/mL).

Mutagenesis *Xoo* dengan transposon. Perbandingan jumlah sel donor dan resipien untuk konjugasi bakteri sebesar 1 : 1. Isolat bakteri resipien (R) STG21 ditumbuhkan pada media LB + Rif (50 μ g/mL), sedangkan bakteri donor (D) yaitu *E. coli* S17-1 (λ pir) yang membawa plasmid pUTmini-Tn5Km1 (Gambar 1) ditumbuhkan pada media LB + Amp (50 μ g/mL) + Kan (50 μ g/mL) semalaman di inkubator bergoyang.

Panen bakteri dilakukan setelah kerapatan bakteri mencapai 10^8 - 10^9 sel/mL. Banyaknya sel bakteri dihitung dengan menggunakan hemasitometer. Sebanyak 1 mL biakan bakteri dalam tabung mikro steril disentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama 10 menit. Pembilasan antibiotik pada pelet dilakukan dengan menambahkan larutan NaCl 0,85% steril selanjutnya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit. Kegiatan pembilasan ini dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing bakteri donor dan resipien.

Pelet bakteri resipien ditambahkan media LB sebanyak 40 μ L selanjutnya dicampurkan kedalam tabung mikro berisi pelet bakteri donor dan diresuspensi secara perlahan. Sebagai kontrol, pelet bakteri resipien dan donor masing-masing ditambahkan LB sebanyak 40 μ L. Media pertumbuhan LA yang telah terbagi menjadi tiga juring disiapkan. Pada setiap juring diletakan membran filter steril berukuran 0,45 μ m. Campuran bakteri donor dan resipien (M), (D), dan (R) sebanyak 40 μ L ditaruh diatas masing-masing membran filter. Konjugasi bakteri dilakukan selama 24 jam.

Setelah 24 jam membran filter diangkat dan dilarutkan dalam 1 mL larutan NaCl 0,85% steril pada tabung mikro, kemudian divorteks. Selanjutnya sebanyak masing-masing 25 μ L disebar pada agar cawan NA + Kan (50 μ g/mL) + Rif (50 μ g/mL) untuk M, R, dan D. Frekuensi konjugasi diperoleh sebagai hasil perbandingan antara jumlah koloni yang tumbuh pada cawan sebar hasil konjugasi terhadap jumlah sel penerima.

Seleksi mutan isogenik *Xoo* hasil mutagenesis dengan transposon. Seleksi mutan isogenik *Xoo* dilakukan melalui uji hipersensitivitas dan patogenisitas terhadap koloni transkonjugan yang ditentukan secara random. Koloni bakteri mutan ditumbuhkan pada media LB + Kan (50 μ g/mL) + Rif (50 μ g/mL) hingga kerapatannya mencapai $\pm 10^8$ sel/mL. Uji hipersensitivitas dilakukan dengan kembali menyuntikkan suspensi bakteri mutan ke tanaman tembakau. Pengamatan dilakukan hingga 48 jam setelah inokulasi. Inokulasi bakteri mutan tersebut ke tanaman padi untuk uji patogenisitas dilakukan dengan metode seperti uji patogenisitas awal.

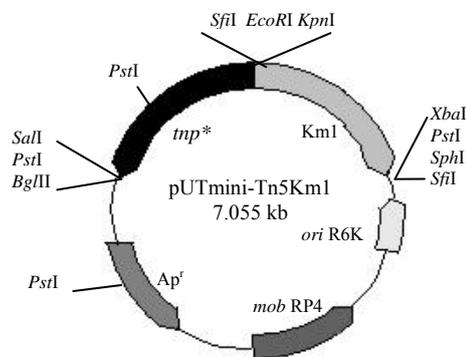
3. Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil isolasi bakteri dari daun padi yang terinfeksi HDB pada dua daerah persawahan di Bogor, Jawa Barat diperoleh 50 isolat bakteri yang terdiri dari 46 isolat asal sawah Situgede yang selanjutnya diberi kode STG dan 4 isolat asal Ciherang yang selanjutnya diberi kode CHG. Koloni bakteri berbentuk bulat, berwarna kuning pucat hingga kuning, berlendir, permukaan timbul, dengan tepian rata (Gambar 2). Isolat bakteri termasuk kedalam Gram negatif dengan

bentuk sel batang pendek dan motil. Hal ini sesuai dengan deskripsi *Xoo* menurut Gnanamanickam *et al.* [7]. Bakteri mampu tumbuh dengan baik pada media XA karena menghasilkan diameter koloni yang lebih besar dan lendir yang lebih banyak dibandingkan ketika bakteri ditumbuhkan pada media NA.

Sebanyak 50 isolat yang diinokulasi kedalam tanaman tembakau mampu menginduksi reaksi hipersensitif. Daun tembakau menjadi kecoklatan pada area masuknya bakteri. Reaksi ini paling jelas teramati 48 jam setelah penyuntikan. Reaksi yang sama juga ditunjukkan oleh daun tembakau yang diinokulasi dengan *Pseudomonas* sp. Crb 69 dan Crb 70, yaitu dengan munculnya bercak kekuningan hingga coklat pada permukaan daun. Sebaliknya, *E. coli* (DH5 α) dan akuades yang digunakan sebagai kontrol negatif tidak menunjukkan reaksi serupa (Gambar 3).

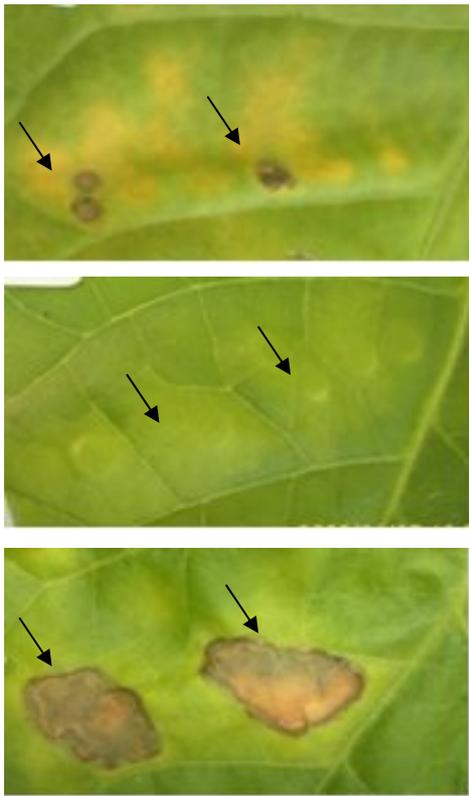
Reaksi hipersensitif merupakan program kematian sel yang cepat dan terlokalisasi. Reaksi ini muncul pada tanaman yang terinfeksi saat pengenalan patogen dan bersamaan dengan itu, merupakan usaha untuk menghambat pertumbuhan patogen. Induksi reaksi hipersensitif dan patogenisitas dipengaruhi oleh gen *hrp* yang umum ditemukan pada bakteri Gram negatif patogen tanaman, termasuk kelompok *Xanthomonas* sp. [14].



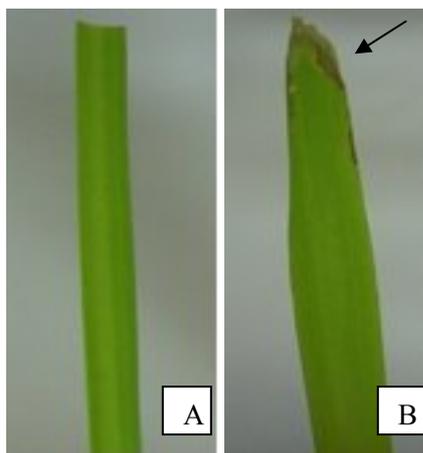
Gambar 1. Peta Plasmid pUTmini-Tn5Km1 (7.055 kb) dalam *E. coli* S17-1 (λ pir)



Gambar 2. Penampilan Koloni Bakteri (STG21) Hasil Isolasi dari Daun Padi yang Terserang HDB pada Suhu 25 °C di Media XA



Gambar 3. Hasil Uji Hipersensitivitas setelah Diinokulasi dengan *Pseudomonas* sp. Crb 70 (A), *E. coli* (B), dan Bakteri Hasil Isolasi STG21 (C), Bagian yang Disuntik Ditunjukkan dengan Anak Panah



Gambar 4. Penampilan Daun Padi Kontrol yang Diberi *Aquades* (A) dan yang Diinokulasi dengan Salah Satu Bakteri Hasil Isolasi (STG21) (B). Gejala HDB Ditunjukkan dengan Anak Panah

Daun padi IR 64 yang diinokulasi dengan bakteri hasil isolasi menunjukkan gejala mirip HDB (Gambar 4). Bagian ujung daun berubah warna menjadi hijau kusam kemudian kuning. Garis kuning tersebut muncul setelah

24 jam. Gejala penyakit tersebut memanjang di sepanjang tepi daun atau di seluruh helaian daun. Panjang gejala tersebut bertambah sepanjang waktu pengamatan.

Dua minggu setelah inokulasi, panjang gejala telah mencapai rata-rata 3,1 cm. Hasil isolasi ulang menunjukkan adanya bakteri yang sama dengan yang diinokulasikan. Dengan demikian dapat dinyatakan gejala penyakit yang timbul disebabkan oleh infeksi dari isolat bakteri. Bakteri tersebut mampu menginfeksi padi melalui luka akibat pengguntingan kemudian bergerak dan bermultiplikasi menuju xilem. Hidatoda juga dapat menjadi jalan masuknya *Xoo* ke dalam tanaman padi. Namun, infeksi patogen melalui luka lebih mudah dibandingkan melalui hidatoda [7].

Uji pewarnaan Gram menunjukkan isolat termasuk Gram negatif dengan bentuk sel batang pendek. Karakter fisiologi isolat bakteri yang diuji menggunakan kit Microgen™ GN-ID A + B panel disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan hasil karakterisasi fisiologi bakteri, diketahui tiga isolat yang diuji tidak mampu menghidrolisis pati, tidak memiliki pigmen fluoresens, tidak memiliki aktivitas oksidase, tidak memproduksi indol dan H₂S, namun mampu menghidrolisis kasein. Karakter ini serupa dengan isolat *Xoo* yang diisolasi dari wilayah persawahan Iran yang terinfeksi HDB [15].

Amplifikasi gen 16S rRNA menghasilkan pita DNA berukuran ~1300 pb (Gambar 5). Analisis sekuen gen 16S rRNA isolat uji menunjukkan adanya kemiripan dengan bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae* terutama STG21 dan STG42 masing-masing sebesar 80% dan 82%, sedangkan STG46 mempunyai kesamaan dengan *X. campestris* sebesar 84% (Tabel 3).

Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan untuk mengetahui pengelompokan dan hubungan kekerabatan isolat uji dengan *Xoo* (Gambar 6). Posisi STG21 pada pohon filogenetik berada satu kelompok dengan *Xoo* strain KACC10331 yang merupakan strain asal Korea [16]. Sedangkan STG42 dan STG46 berada dalam kelompok yang sama. Ketiga isolat lebih memiliki kedekatan dengan *Xoo* strain asal Korea dan Jepang (MAFF 311018) dibandingkan dengan strain asal Filipina (PXO99A). Strain PXO99A diketahui memiliki kekerabatan paling jauh dibandingkan dengan dua strain lainnya dan juga terhadap strain asal Filipina pada umumnya serta lebih virulen. Secara genotipe, strain PXO99A lebih dekat kekerabatannya dengan strain asal Asia Selatan seperti Nepal dan India [17]. Secara umum berdasarkan morfologi, fisiologi, dan molekuler serta uji hipersensitivitas dan patogenisitas dapat dinyatakan bakteri yang berhasil diisolasi merupakan *Xoo*, penyebab penyakit HDB pada padi.

Hasil pengujian resistensi terhadap antibiotik disajikan pada Tabel 4. Uji resistensi antibiotik pada ketiga

isolate menunjukkan isolat STG21 dan STG46 sensitif terhadap seluruh antibiotik yang diuji, sedangkan STG42 cenderung resisten terhadap kanamisin dan sensitif terhadap antibiotik lainnya sehingga tidak dapat digunakan sebagai resipien dalam mutagenesis dengan transposon menggunakan donor yang membawa gen resisten kanamisin.

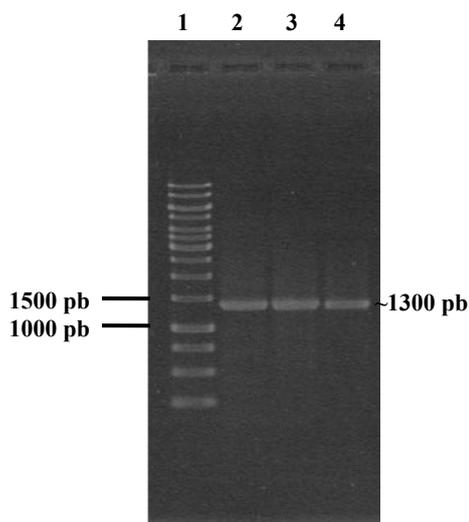
Isolat STG 21 selanjutnya digunakan sebagai resipien. Mutasi spontan perlu dilakukan untuk menentukan penanda resipien agar dapat dibedakan dengan sel

Tabel 2. Sifat-sifat Isolat STG21, STG42, dan STG46 Berdasarkan Uji Fisiologi

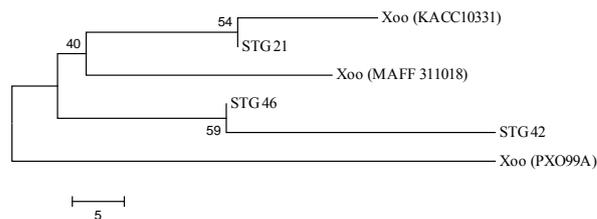
Uji	STG 21	STG 42	STG 46	Uji	STG 21	STG 42	STG 46
Fermentasi	+	-	-	VP	-	-	-
Pigmen flouresens	-	-	-	Citrate	+	+	-
Hidrolisis pati	-	-	-	TDA	-	+	-
Hidrolisis kasein	+	+	+	Gelatin	-	-	+
Katalase	+	+	+	Malonate	-	-	-
Oksidase	-	-	-	Inositol	+	+	-
Motilitas	+	+	+	Sorbitol	-	-	-
Nitrate	-	-	-	Arginin	+	-	-
Lysine	-	+	-	Rhaminose	-	-	-
Ornithine	-	+	-	Sukrosa	+	+	+
H2S	-	-	-	Laktosa	+	-	+
Glukosa	+	+	+	Arabinosa	+	+	+
Manitol	+	-	+	Adonitol	-	-	-
Xylose	+	+	-	Raffinosa	+	-	-
ONPG	+	-	+	Salicin	-	-	+
Indol	-	-	-	Toleransi NaCl 10%	-	-	-
Urease	-	+	-				

Tabel 3. Analisis Homologi Menggunakan Program BLAST-N Sekuen Gen 16S rRNA Isolat yang Diduga *Xoo*

Isolat	Homolog	% Identitas	No. Akses
STG21	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>	80%	AE013598.1
STG42	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>	82%	AP008229.1
STG46	<i>Xanthomonas campestris</i>	84%	AY549593.1



Gambar 5. Elektroforesis Gel Agarose Gen 16S rRNA (~1300 pb) dari Genom Isolat STG21, STG42, STG46 yang Diampifikasi dengan PCR. Sumur 1 adalah Marker 1 kb, Sumur 2: STG21, Sumur 3: STG42, dan Sumur 4: STG46



Gambar 6. Pohon Filogenetik yang Memperlihatkan Posisi Isolat STG21, STG42, dan STG46 berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA dibandingkan dengan beberapa Galur *Xoo*

Tabel 4 Hasil Uji Resistensi Antibiotik

Isolat	Tet	Strp	Chl	Rif	Kan
STG21	-	-	-	-	-
STG42	-	-	-	-	+
STG46	-	-	-	-	-

Keterangan:
 - : tidak resisten
 + : resisten

donor. Rifampisin dipilih sebagai penanda karena hanya sedikit bakteri yang diketahui resisten terhadap antibiotik ini, diantaranya *Rhizobium* sp., Rifampisin dapat menghalangi sintesis RNA pada saat transkripsi. Mutasi spontan menggunakan rifampisin pada STG21 menyebabkan bakteri menjadi resisten. Hal ini disebabkan oleh mutasi pada gen *rpoB* yang menyandi subunit RNA polimerase [18]. Dengan demikian, kanamisin dan rifampisin dapat digunakan sebagai

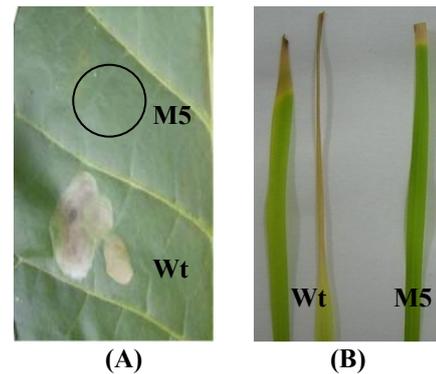
penanda untuk seleksi mutan hasil mutagenesis dengan transposon.

Mutagenesis dengan transposon banyak dilakukan untuk menghasilkan mutan *Xoo* yang nonpatogenik sebagai upaya mengendalikan HDB. Mutan yang dihasilkan secara genetik sama dengan tipe liarnya (isogenik). Mutan isogenik yang nonpatogenik diharapkan mampu menekan pertumbuhan tipe liarnya dengan cara kompetisi. Penggunaan mutan isogenik tersebut lebih menguntungkan karena mutan akan berperilaku sama dengan tipe liarnya dalam merespon perubahan lingkungan sehingga memiliki kesintasan yang sama di alam.

Berdasarkan hasil mutagenesis dengan transposon, integrasi gen resisten kanamisin (Km1) pada transposon mini-Tn5Km1 yang dibawa oleh plasmid pUTmini-Tn5Km1 (Gambar 1) dalam *E. coli* S17-1 (λ pir) ke dalam genom *Xoo* melalui konjugasi menyebabkan *Xoo* resisten terhadap kanamisin. Frekuensi konjugasi sebesar $4,4 \times 10^{-6}$ per resipien yang diperoleh dengan masa inkubasi selama 24 jam. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan Mesak *et al.* [19] yang mendapatkan frekuensi konjugasi sebesar $3,3 \times 10^{-7}$ dan $1,3 \times 10^{-7}$ terhadap *Xanthomonas campestris* pv. *glycine* menggunakan galur *E. coli* yang sama. Mutan yang dihasilkan memiliki kemampuan tumbuh pada media dengan penambahan antibiotik rifampisin dan kanamisin.

Seleksi mutan melalui uji hipersensitivitas pada tanaman tembakau terhadap 300 mutan yang ditentukan secara random diketahui sebanyak 299 mutan mampu menginduksi reaksi hipersensitif seperti tipe liarnya dengan menimbulkan bercak kecoklatan pada permukaan daun. Hanya satu mutan (M5) yang diketahui tidak dapat menginduksi reaksi hipersensitif (Gambar 7A). Mutan M5 dan tipe liarnya memiliki kemampuan yang sama untuk tumbuh dengan baik pada media agar cawan sehingga dapat dinyatakan hilangnya kemampuan dalam menyebabkan reaksi hipersensitif pada tanaman tembakau tidak disebabkan oleh adanya hambatan dalam pertumbuhan. Mutan dengan karakter yang sama juga diperoleh [20] menggunakan transposon yang sama (mini Tn5) pada *Xoo* strain BXO yang diisolasi dari India. Mutan tersebut tidak menyebabkan reaksi hipersensitif pada daun tanaman tomat yang disuntik dengan bakteri mutan. Oleh karena itu, diperkirakan transposon menyisip pada gen *hrp* yang menyandi reaksi hipersensitif pada bakteri patogen tanaman sehingga menyebabkan gen tidak dapat bereksresi.

Uji patogenisitas terhadap mutan Hrp- (M5) menunjukkan bahwa mutan masih dapat menimbulkan gejala penyakit pada tanaman padi namun panjang gejala yang terbentuk lebih rendah dari tipe liarnya



Gambar 7. Perbandingan Hasil Uji Hipersensitivitas (A) dan Patogenisitas (B) Tipe Liar terhadap Mutan M5

Tabel 5. Perbandingan Panjang Gejala HDB Tipe Liar terhadap Mutan M5

Isolat	Panjang gejala (cm)
Wt	2,87 ± 1,18
M5	0,47 ± 0,12

(Gambar 7B). Panjang gejala HDB pada helai daun padi yang diinokulasi dengan bakteri mutan berkurang sebesar 80% terhadap tipe liarnya (Tabel 5). Hasil ini sejalan dengan [20] yang melaporkan bahwa mutasi gen *hrpF* pada bakteri *Xoo* tidak menghilangkan patogenisitasnya tetapi dapat mengurangi kemampuan bakteri untuk tumbuh pada padi dan juga mengurangi kemampuannya dalam menyebabkan gejala HDB.

Kegiatan mutagenesis dengan transposon dalam penelitian ini tidak menghasilkan mutan yang kehilangan seluruh sifat virulennya. Hal ini mungkin disebabkan adanya keterlibatan gen-gen lain yang menentukan sifat virulen *Xoo*. Beberapa gen yang diketahui berperan dalam menentukan virulensi *Xoo* diantaranya *xps* [20], *aroE* [22], *rpfF* [23], *pgi* [24], *purH* [25], *fur* [26] dan *eglXoB* [27] sehingga mutasi pada gen *hrp* *Xoo* tidak dapat secara langsung menghilangkan seluruh sifat patogenisitasnya pada tanaman padi. Hasil ini berbeda dengan mutasi *hrpF* pada *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* yang tidak hanya dapat menghilangkan kemampuannya dalam menginduksi reaksi hipersensitif pada tanaman tembakau tapi juga mampu menghilangkan seluruh sifat patogenisitasnya pada tanaman inang yaitu padi [8].

4. Simpulan

Isolasi bakteri dari daun tanaman padi yang diduga terinfeksi HDB menghasilkan 50 isolat asal sawah Situgede dan Ciharang, Bogor, Jawa Barat. Berdasarkan hasil identifikasi morfologi dan fisiologi, reaksi

hipersensitivitas dan patogenisitas diketahui tiga isolat (STG21, SGT42, STG46) memiliki beberapa kesamaan sifat yang kuat dengan *Xoo*. Identifikasi secara molekuler berdasarkan sekuens gen 16S rRNA isolat STG21 dan STG 42, masing-masing memiliki kesamaan dengan *Xoo* sebesar 80% dan 82%. Untuk isolat STG 46 memiliki kesamaan dengan *X. campestris* sebesar 84%. Mutagenesis dengan transposon pada isolat STG21 menghasilkan satu mutan *Xoo* (M5) yang tereduksi patogenisitasnya hingga 80% didasarkan pada gejala penyakit yang ditimbulkan dibandingkan dengan tipe liarnya (*Xoo* STG21).

Daftar Acuan

- [1] B. Abdullah, Penel. Pertanian. Tan. Pangan 21 (2002) 1.
- [2] Suparyono, Sudir, Media Penel. Sukamandi 12 (1992) 6.
- [3] T.S. Kadir, Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian 31 (2009) 1.
- [4] Suparyono, Sudir, Suprihanto, Indones. J. Agric. Sci. 5 (2004) 63.
- [5] Suparyono, Sudir, Suprihanto, Penel. Pertanian Tan. Pangan 22 (2003) 45.
- [6] C. L. Wang *et al.*, Eur. J. Plant Pathol. 123 (2009) 343.
- [7] S.S. Gnanamanickam, V.B. Priyadarisini, N.N. Narayanan, P. Vasudevan, S. Kavitha, Curr. Sci. 77 (1999) 1435.
- [8] Y. Rukayadi, A. Suwanto, B. Tjahjono, R. Harling, Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000) 1183.
- [9] L. Zou *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 6212.
- [10] M. Herrero, V. de Lorenzo, K.N. Timmis, J. Bacteriol. 172 (1990) 6557.
- [11] A.T. Wahyudi, N. Racmania, Kajian Bakteri Rizosfer Pemacu Pertumbuhan Tanaman Kedelai (*Glycine max*): Isolasi, Karakterisasi, dan Peningkatan Pemacuan Pertumbuhan. IPB Bogor: Laporan Akhir Insentif Riset Dasar Tahun II, Bogor, 2008.
- [12] J. Sambrook, D.W. Russell. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Ed ke-3, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pr., 2001.
- [13] A.T. Wahyudi, R.I. Astuti, Giyanto, Am. J. Agric. Biol. Sci. 6 (2011) 134.
- [14] W. Zhu, M.M. Magbanua, F.F. White, J. Bacteriol. 182 (2000) 1844.
- [15] E. Ghasemie, M.N. Kazempour, F. Padasht, Plant. Protect Res. 48 (2008) 53.
- [16] B.M. Lee *et al.*, Nucleic Acids Res. 33 (2005) 577.
- [17] S.L. Salzberg *et al.*, BMC Genomics 9 (2008) 204.
- [18] W.L. Nicholson, H. Moughan, J. Bacteriol 184 (2002) 4936.
- [19] F.M. Mesak, A. Suwanto, B. Tjahjono, E. Guhardja, J. I. Pertan. Indones. 4 (1994) 77.
- [20] S.K. Ray, R. Rajeshwari, R.V. Sonti, Mol. Plant Microbe Interact. 13 (2000) 394.
- [21] A. Sugio, B. Yang, F.F. White, Mol. Plant Microbe Interact. 18 (2005) 546.
- [22] A.K. Goel, L. Rajagopal, R.V. Sonti, Appl Environ Microbiol 67 (2001) 245.
- [23] S. Chatterjee, R. Sonti, Mol. Plant Microbe Interact. 15 (2002) 463.
- [24] S. Tsuge *et al.*, Phytopathology 94 (2004) 478.
- [25] S. Chatterjee, R. Sonti, Can. J. Microbiol. 51 (2005) 575.
- [26] S. Subramoni, R.V. Sonti, Mol. Plant Microbe Interact. 18 (2005) 644.
- [27] J. Hu, W. Qian, C. He, FEMS Microbiol. Lett. 269 (2007) 273.