

## Deteksi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Penyebab Hawar Daun Bakteri pada Tanaman Padi

Y. Suryadi<sup>1</sup>, T.S. Kadir<sup>2</sup>, dan M. Machmud<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian  
Jl. Tentara Pelajar 3A Bogor 16111

<sup>2</sup>Balai Besar Penelitian Tanaman Padi  
Jl. Raya 9 Sukamandi Subang, Jawa Barat

**ABSTRACT. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the causal agent of Rice Bacterial Blight.** Bacterial blight (BB) caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) is an economically important bacterial disease, which is very destructive to rice plant. Hence, early detection and identification of the pathogen is a crucial step in the disease management. A study was done to detect *Xoo* using a polyclonal antibody (PAb) and the NCM-ELISA technique. PAb-*Xoo* derived from Sukamandi isolate (strain 4) revealed positive reaction against all isolates tested. High titer of antibody was obtained as much as 2048, mean of protein purity ( $OD_{280/260}$ ) ranging from  $1.23 \pm 0.14$  to  $1.55 \pm 0.25$ . The result showed that the optimum dilution of specific PAb *Xoo* was 1:800. The PAb was able to detect incidence of *Xoo* antigen derived from crude extract (whole cells), heated cells, and pure cultures of samples fixed with glutaraldehyde or formalin. The minimum detectable concentration of *Xoo* antigen was approximately  $10^4$  cells/ml. The samples containing plant sap or pure culture of *Xoo*, which was extracted from diseased rice plant of various locations in West Java, Central Java, East Java, and Lampung showed a positive reaction against PAb-*Xoo*. The study indicated that no other cross-reaction observed with other different plant pathogenic bacteria such as *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* or *Xanthomonas campestris* pv. *glycinea*.

Keywords: PAb, *Xoo*, NCM-ELISA

**ABSTRAK.** Hawar daun bakteri (HDB) yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) merupakan salah satu penyakit penting yang sangat merusak tanaman padi. Oleh karena itu, deteksi dan identifikasi secara dini keberadaan patogen tersebut berperan penting dalam pengendalian penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi *Xoo* penyebab penyakit HDB menggunakan antibodi poliklonal (PAb) dan NCM-ELISA. PAb yang diperoleh dari satu isolat asal Sukamandi (strain 4) menunjukkan reaksi positif terhadap semua isolat yang diuji. Titer tertinggi antibodi diperoleh pada nilai 2048, dan memiliki rata-rata kandungan kemurnian protein ( $OD_{280/260}$ ) berkisar antara  $1,23 \pm 0,14$  sampai  $1,55 \pm 0,25$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengenceran optimum PAb *Xoo* adalah 1:800. PAb *Xoo* mampu mendeteksi keberadaan bakteri asal contoh ekstrak kasar (sel utuh), contoh biakan murni yang dipanaskan maupun contoh Ag yang difiksasi dengan glutaraldehyde atau formalin. Konsentrasi terendah hasil deteksi terhadap antigen *Xoo* adalah  $10^4$  sel/ml. PAb *Xoo* yang digunakan menunjukkan reaksi positif terhadap contoh tanaman padi maupun biakan murni *Xoo* yang diekstraksi dari berbagai lokasi di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Lampung. Hasil penelitian mengindikasikan tidak terlihat adanya reaksi silang dengan antigen bakteri lain seperti *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* dan *Xanthomonas campestris* pv. *glycinea*.

Kata kunci: PAb, *Xoo*, NCM-ELISA

Hawar daun bakteri (HDB) yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) merupakan salah satu penyakit utama padi. Penyakit ini tidak hanya merusak tanaman pada fase bibit tetapi juga pada fase generatif. Kerugian yang ditimbulkannya bervariasi berkisar antara 20-30%, bergantung pada varietas yang ditanam dan musim tanam (Hifni *et al.* 1996). Selama periode 1996-2002, HDB merupakan penyakit penting padi di Indonesia. Luas penularan HDB dilaporkan mencapai 28.766 ha dengan puncak kejadian terjadi pada musim hujan (Widiarta 2003). Dalam kurun waktu tersebut, penyakit HDB menimbulkan kerusakan di Jawa Barat dan Jawa Tengah. Hal ini terkait dengan meluasnya areal pertanaman varietas unggul yang rentan terhadap HDB. Sebagai contoh varietas unggul IR64 yang dilaporkan tahan hama wereng coklat tetapi rentan terhadap HDB (Hifni *et al.* 1996).

*Xoo* mempunyai kemampuan variabilitas virulensi yang tinggi dan membentuk strain baru di lapang sejalan dengan perkembangan penggunaan varietas padi. Hal ini menyebabkan ketahanan varietas padi seringkali menurun (Suryadi dan Machmud 1987). Berdasarkan karakteristik fenotipik maupun genotipiknya, *Xoo* dikelompokkan ke dalam strain (*pathotype*) maupun *haplotype* yang berbeda antar geografi yang berbeda (Leach *et al.* 1990; George *et al.* 1996). Di Indonesia paling tidak telah dijumpai 11 kelompok strain *Xoo* dengan tingkat virulensi yang berbeda (Hifni *et al.* 1996). Triny (2000) melaporkan terdapat 12 kelompok strain *Xoo*.

Sampai saat ini perbedaan antarstrain *Xoo* belum dapat diketahui dengan jelas. Munculnya strain baru memerlukan teknik diagnosis yang erat kaitannya dengan deteksi dan identifikasi. Diagnosis penyakit bakteri biasanya dilakukan berdasarkan kemunculan suatu gejala dan eksudat bakteri dari jaringan tanaman. Identifikasi diperlukan terhadap isolat bakteri, sehingga validitas isolat dapat dilanjutkan kepada uji kelompok strain yang telah diketahui. Salah satu cara identifikasi yang cukup cepat adalah uji serologi menggunakan antibodi dan teknik ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent*

*Assay* (Smith *et al.* 1995). Serodiagnosis sebagai suatu upaya pengelompokan strain *Xoo* di Asia menunjukkan bahwa isolat-isolat asal India, Indonesia, Jepang, Thailand, Vietnam, dan Malaysia terdiri dari tiga kelompok serovars (Quimio 1989). Deteksi dan identifikasi *Xoo* pada pertanaman padi dan air irigasi di Filipina menggunakan PAb *Xoo* dan teknik pewarnaan langsung antibodi immunofluoresent (FAS) dilaporkan mampu mendeteksi  $\pm 10^5$  sel *Xoo* (Goto 1970). Hasil penelitian Lee *et al.* (1982) di Cina dengan menggunakan PAb *Xoo* asal sel hidup dan teknik FAS mampu mendeteksi 88 kultur positif terinfeksi *Xoo* dari contoh asal benih dan daun padi. Selain itu, mereka juga mampu mendeteksi *Xoo* dari benih padi yang diinokulasi secara buatan sampai 90 sel *Xoo*/ml.

Beberapa jenis PAb dalam negeri telah dihasilkan dalam jumlah terbatas, namun penggunaannya relatif sedikit dan masih perlu diteliti spesifisitasnya untuk mendeteksi keberadaan patogen pada tanaman. Produksi PAb *Xoo* masih perlu dikaji dan dikembangkan untuk deteksi keberadaan *Xoo* secara cepat pada padi, terutama terhadap beberapa benih padi yang harus diimpor. Penelitian ini bertujuan untuk deteksi *Xoo* pada padi yang diduga terinfeksi HDB, uji sensitivitas dan spesifisitas PAb yang telah diproduksi, sehingga diharapkan dapat bermanfaat untuk memberikan informasi deteksi dini *Xoo* sebagai langkah awal pencegahan penyakit HDB, khususnya tentang keberadaan *Xoo* asal contoh tanaman padi yang dideteksi menggunakan prosedur NCM-ELISA.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi Bakteri dan Produksi PAb-Xoo

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium dan Rumah Kaca Kelti Biokimia, BB Biogen, Bogor, sejak bulan Februari sampai Agustus 2004. Contoh daun padi terinfeksi HDB dikumpulkan dari berbagai lokasi di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Lampung pada MT 2003/2004. Setiap contoh daun disimpan dalam *freezer* untuk keperluan pengujian. Daun terinfeksi HDB diisolasi menggunakan media Wakimoto Agar (WA) yang diinkubasikan selama 3 hari. Koloni bakteri diukur konsentrasinya setara dengan  $10^9$  sel hidup (*colony forming unit* = cfu/ml) menggunakan spektrofotometer (Hitachi).

Sumber antigen (Ag) berupa sel bakteri *Xoo* asal isolat Sukamandi (kelompok strain 4) masing-masing difiksasi dengan larutan formalin 37%, glutaraldehid 2%, dan tanpa fiksasi (perlakuan dengan pemanasan dalam air mendidih). Sel bakteri ( $10^7$  cfu/ml) sebagai

sumber Ag selanjutnya disuntikkan pada kelinci putih New Zealand (Ball *et al.* 1990). Kelinci disuntik secara intramuskuler (otot paha) sebanyak dua kali dengan selang penyuntikan 2 minggu, menggunakan 5 ml Ag dalam campuran larutan garam *buffer phospat* (PBS) pH 7,0 dan *Freund's adjuvant*. Antiserum kasar dikumpulkan dan dimurnikan secara parsial menggunakan presipitasi amonium sulfat, diikuti oleh satu seri proses dialisis menggunakan larutan PBS pH 7,2 (Smith *et al.* 1995). PAb diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (absorbansi) 280 nm dan 260 nm. Kemurnian protein sebanyak 1 mg/ml diasumsikan setara dengan nilai kerapatan optik  $(OD)_{280/260} = 1,4$ .

### Optimalisasi Ag dan PAb Xoo

Sumber Ag asal bagian tanaman yang digunakan adalah daun padi dan beras, masing-masing digerus dalam mortar. Ekstrak yang diperoleh masing-masing diencerkan dalam air dan *Tris Buffer Sulphate* (TBS) (1 : 2,5). Ag *Xoo* yang berasal dari berbagai perlakuan fiksasi dengan glutaraldehid dan formalin juga diuji dengan meneteskan pada membran nitroselulose. Ag isolat murni *Xoo* ( $10^7$  cfu/ml) sebagai kontrol positif diencerkan konsentrasinya menjadi  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}$ , sedangkan untuk PAb diencerkan pada konsentrasi 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, dan 1 : 1000. Isolat bakteri *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* (PSG), *Ralstonia solanacearum* (RS) dan *Xanthomonas campestris* pv *glycinea* (XCG) digunakan sebagai kontrol negatif.

### Deteksi Xoo pada Contoh Benih dan Tanaman Padi dengan NCM-ELISA

Contoh benih padi yang diuji terdiri atas empat varietas lokal asal Banyumas, Purwokerto (Rojolele, Pandanwangi, padi lokal, dan ketan lokal), tujuh varietas padi asal Muara, Bogor (IR64, Cisadane, Kencana, Cisokan, Cisanggarung, Asahan, dan Krueng Aceh), dan tujuh galur hibrida asal Sukamandi (IR 68886A/R2, IR68885A/R7, R8, IR68888A/R9, IR68897A/R10, R13, R14). Contoh benih padi didisinfeksi untuk menghilangkan patogen lain yang menempel pada permukaan benih menggunakan  $\text{NaOCl}_2$  selama 6 menit. Setelah didisinfeksi, benih padi dicuci dengan  $\text{H}_2\text{O}$  steril sebanyak dua kali. Benih digerus dalam mortar, kemudian ditambahkan TBS (1 : 10) (v/v). Selanjutnya campuran ekstrak diinkubasi semalam dengan perlakuan penggojokan dan tanpa penggojokan menggunakan *shaker*. Perlakuan lainnya yaitu benih digerus dan tanpa digerus dalam mortar kemudian ditambahkan media cair Wakimoto dan diinkubasikan selama 48 jam pada suhu 28°C. Supernatan dari benih hasil rendaman disentrifugasi selama 15 menit

pada kecepatan sentrifugasi 5000 g, selanjutnya pelet diresuspensi dengan 2 ml PBS pH 7,2. Perlakuan *growing on test* dilakukan dengan menumbuhkan contoh benih selama satu minggu pada cawan petri yang diberi alas kertas saring Whatman No. 1. Setiap hari dilakukan penyiraman untuk menjaga kelembaban tanaman. Jaringan tanaman yang sudah terbentuk setelah seminggu digerus dalam mortar, selanjutnya diencerkan dalam buffer TBS dengan perbandingan 1 : 10 (v/v) dan ditetaskan pada membran nitroselulose.

NCM-ELISA digunakan berdasarkan prosedur baku seperti dikemukakan oleh Lazarovits *et al.* (1989) dan Fuentes (1993). Sebanyak 20  $\mu$ l Ag ditetaskan ke permukaan membran nitroselulose. Membran selanjutnya direndam dengan larutan buffer TBS (Tris sulphate, 2% susu skim, 2% TritonX) diikuti oleh tiga kali pencucian dengan TTBS (TBS + Tween 20) selama 15 menit. Membran dilapisi larutan *Goat anti rabbit* (GAR) yang dikonjugasi dengan enzim alkaline phosphatase (AP) dalam buffer TBS selama satu jam, kemudian dicuci kembali dengan TTBS selama 15 menit. Selanjutnya ke dalam membran dilarutkan *Nitroblue tetrazolium/Bromochloro Indole Phosphate* (NBT/BCIP) yang diinkubasikan selama 30 menit dan selanjutnya diamati perubahan warna contoh pada membran. Variabel yang diamati adalah intensitas warna hasil deteksi yang dapat dinilai dari skor 0-4, yaitu 0 = reaksi negatif (-), 1 = reaksi lemah ( $\pm$ ), +2 = reaksi agak kuat (+), 3 = reaksi kuat (++) , 5 = reaksi sangat kuat (+++).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi Bakteri dan Produksi PAb-Xoo

Sebelum pengujian, bakteri patogen tertular benih (*seed borne*) diisolasi terlebih dahulu melalui beberapa tahapan dan selanjutnya diinkubasikan pada media selektif (Mortensen 1986; Di *et al.* 1991). Hasil penumbuhan bakteri pada media WA menghasilkan koloni yang tumbuh berbentuk sirkular, cembung (*convex*), berwarna kuning, permukaannya halus dan tumbuh menepi. Kenampakan koloni memerlukan waktu sekitar empat hari. PAb *Xoo* yang diproduksi dari isolat strain 4 asal Sukamandi menunjukkan reaksi positif terhadap semua isolat yang diuji. Titer antibodi tertinggi diperoleh pada nilai 2048 dengan rata-rata kemurnian protein ( $OD_{280/260}$ ) pada kisaran  $1,23 \pm 0,14$  sampai  $1,55 \pm 0,25$ .

### Optimalisasi Ag dan PAb Xoo

Pengujian optimalisasi konsentrasi Ag dan PAb yang efektif bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi yang

efisien, sehingga mengurangi kemungkinan pemborosan dalam penggunaannya, mengingat jumlah dan kualitas tiap PAb yang dihasilkan berbeda-beda, bergantung cara produksinya (Ball *et al.*, 1990). Pengujian PAb untuk optimalisasi deteksi *Xoo* dilakukan terhadap sel bakteri yang berasal dari biakan murni. Hasil optimasi konsentrasi Ag dan PAb *Xoo* dapat dilihat pada Tabel 1.

Pengenceran Ab 1 : 100, 1 : 200, dan 1 : 400 menunjukkan intensitas warna ungu yang kuat, sedangkan pada pengenceran 1: 800 dan 1 : 1000 menunjukkan intensitas warna sedang. Selanjutnya pengenceran PAb 1:800 dipilih untuk digunakan pada uji selanjutnya karena mampu mendeteksi *Xoo* cukup baik, sedangkan konsentrasi minimum Ag *Xoo* yang masih dapat terdeteksi adalah pada pengenceran  $10^{-3}$  (konsentrasi kira-kira  $10^4$  sel/ml). Quimio (1989) menyatakan bahwa limit deteksi menggunakan prosedur FAS untuk deteksi *Xoo* adalah  $10^4$  cfu/ml.

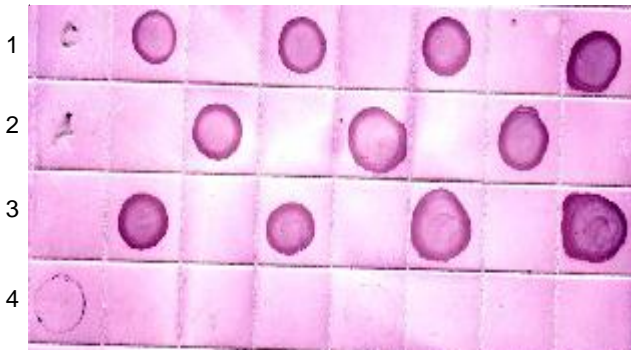
Pengujian reaksi PAb dengan berbagai jenis Ag *Xoo* yang difiksasi dengan formalin, glutaraldehyde, dan perlakuan pemanasan sel  $100^\circ\text{C}$  dapat dilihat pada Gambar 1a. Hasil penelitian menunjukkan bahwa PAb yang telah diperoleh dapat mendeteksi keberadaan Ag *Xoo* yang berasal dari berbagai contoh ekstrak kasar maupun biakan murni bakteri. Quimo (1989) melaporkan *Xoo* dapat dideteksi cepat dengan PAb yang disiapkan dari sel hasil fiksasi glutaraldehyde, namun Choi *et al.* (1980) melaporkan bahwa kemungkinan akan terjadi reaksi nonspesifik antara *Xoo* dengan antisera yang disiapkan dari sel hidup maupun sel yang dipanaskan (*heated cells*).

Dalam penelitian ini PAb tidak bereaksi silang (*cross-reaction*) dengan beberapa Ag bakteri lain seperti RS, PSG atau XCG (Gambar 1 b). Dengan demikian PAb yang diproduksi pada penelitian ini cukup spesifik dalam mendeteksi *Xoo*. PSG dan XCG menunjukkan reaksi negatif karena tidak menghasilkan warna. Hal ini menunjukkan bahwa PAb yang dihasilkan tidak mengakibatkan reaksi silang dengan genus bakteri lain

Tabel 1. Optimasi pengenceran PAb dan Ag *Xoo* dengan NCM-ELISA.

Pengenceran PAb	Pengenceran Ag Isolat <i>Xoo</i>						
	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1 : 100	+++	++	+	$\pm$	-	-	-
1 : 200	+++	++	+	$\pm$	-	-	-
1 : 400	++	++	+	$\pm$	-	-	-
1 : 800	++	++	+	$\pm$	-	-	-
1 : 1000	+	+	+	$\pm$	-	-	-

+++ = sangat kuat, ++ = kuat, + = agak kuat,  $\pm$  = lemah, - = negatif.



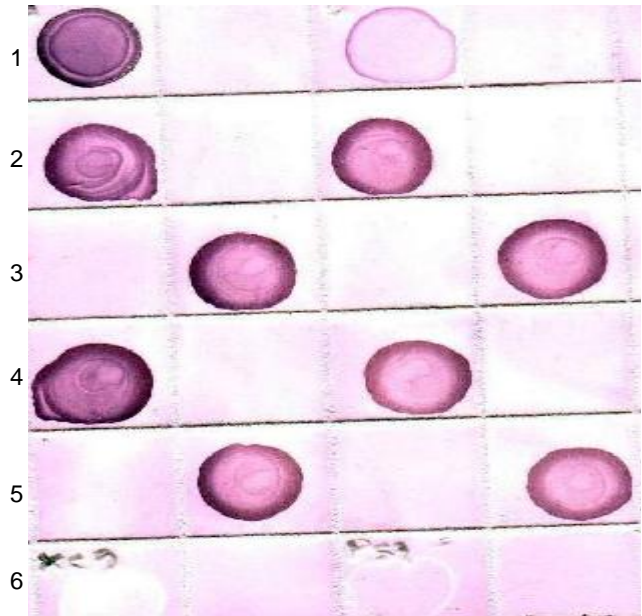
Gambar 1a. Jenis Ag hasil fiksasi yang dideteksi dengan PAb-Xoo (pengenceran PAb 1:800)  
 Baris 1 = Ag yang difiksasi dengan formalin,  
 Baris 2 = Ag yang difiksasi dengan glutaraldehide,  
 Baris 3 = Ag perlakuan pemanasan sel (100°C),  
 Baris 4 = Ag kontrol positif, RS, PSG, XCG, kontrol negatif (*buffer*).

(*Pseudomonas*, *Xanthomonas*) yang masih tergolong ke dalam satu famili dengan *Xoo*, yaitu *Pseudomonadaceae* (Goto 1992). Hal yang sama dilaporkan oleh Wang *et al.* (1980) yang menggunakan uji penggumpalan tidak langsung (RIHT) terhadap sel bakteri *Xoo* dari daun padi, dimana hasilnya bereaksi negatif terhadap biakan bakteri *X. campestris* pv *oryzicola*, *X. campestris* pv *panici*, *Erwinia herbicola*, dan *Pseudomonas translucens*. Quimio (1989) melaporkan antisera *Xoo* yang difiksasi dengan glutaraldehide dan teknik pewarnaan langsung FAS juga mampu membedakan *Xoo* secara spesifik dengan bakteri lain.

Berdasarkan hasil pengujian Ag dari daun padi sehat dan beras dari berbagai penyiapan memperlihatkan reaksi negatif. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak asal daun dan beras tidak menyebabkan reaksi nonspesifik yang dapat mengganggu pengamatan kualitas warna. Menurut Smith *et al.* (1995), reaksi silang dapat terjadi antara lain karena Ag yang digunakan tidak murni yang menyebabkan campuran Ab dalam serum tidak spesifik. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa *Xoo* yang digunakan sebagai Ag dalam pembuatan PAb dalam penelitian ini relatif murni, sehingga PAb yang diperoleh cukup peka dan spesifik terhadap *Xoo*.

#### Deteksi *Xoo* pada Contoh Benih dan Tanaman Padi dengan NCM-ELISA

Sumber *Xoo* di lapangan dapat terdeteksi, di antaranya pada benih, permukaan daun, jaringan tanaman sakit maupun sumber air irigasi (Choi *et al.* 1980). Kejadian epidemi penyakit antara lain dapat disebabkan oleh adanya patogen yang terbawa benih, sehingga penyediaan benih padi yang baik dan sehat dalam jumlah yang cukup merupakan langkah menuju peningkatan hasil padi. Benih yang terinfeksi patogen seringkali tidak menunjuk-



Gambar 1b. Contoh HDB dan Ag bakteri lain yang dideteksi dengan PAb *Xoo* (pengenceran Pab 1:800).  
 Baris 1-5 contoh *Xoo*, baris 6= XCG, negatif kontrol, PSG.

kan gejala penyakit, sehingga mempersulit pencegahan (Cottyn *et al.* 1996).

Pengendalian penyakit HDB pada tanaman padi yang disebabkan oleh *Xoo* masih cukup sulit dilakukan, mengingat patogen ini mempunyai daerah pencair yang luas dan mempunyai kemampuan untuk beradaptasi pada tanaman inang pengganti, seperti pada beberapa jenis gulma di samping adanya pergeseran strain *Xoo* dari waktu ke waktu di lapang (Mew 1987; Gonzalez *et al.* 1991). Hal ini masih dapat dilihat dari banyaknya contoh benih padi yang berasal dari beberapa lokasi positif terinfeksi *Xoo* setelah diuji dengan PAb *Xoo* menggunakan prosedur NCM-ELISA. Pengujian deteksi benih padi dalam penelitian ini dilakukan dengan memodifikasi cara deteksi keberadaan *Xoo* pada benih antara lain dengan cara penyiapan: a) pengenceran, b) perendaman dalam bufer ekstraksi TBS, dan c) benih padi dikecambahkan selama 7 hari. Penggunaan TBS sebagai *buffer* ekstraksi dan perlakuan benih dengan penggerusan dan penggoyangan menunjukkan reaksi kuat sampai lemah. Reaksi sangat kuat ditunjukkan oleh galur hibrida IR 68886A/R2, R8 dan IR 68897A/R10 (Tabel 2). Ashura *et al.* (1999) melaporkan bahwa dengan prosedur ELISA dan cara penyiapan pengenceran benih (*liquid assay*), sebanyak 30 isolat bakteri *Xoo* yang diekstraksi dari benih padi berhasil dideteksi. Dapat dilihat perlakuan optimal untuk pengujian penyiapan Ag bakteri *Xoo* yang berasal dari benih padi adalah melalui upaya inkubasi selama 24-48 jam, baik dengan cara

penggerusan maupun tanpa penggerusan. Hal ini diduga dengan adanya masa inkubasi, jumlah bakteri di dalam contoh dapat meningkat sehingga limit deteksi dapat tercapai. Hal ini ditunjang oleh pendapat Priou (1998) yang menyatakan bahwa limit deteksi untuk bakteri RS pada contoh benih kentang dapat ditingkatkan 10 kali lipat melalui inkubasi dalam media selektif selama 24 jam.

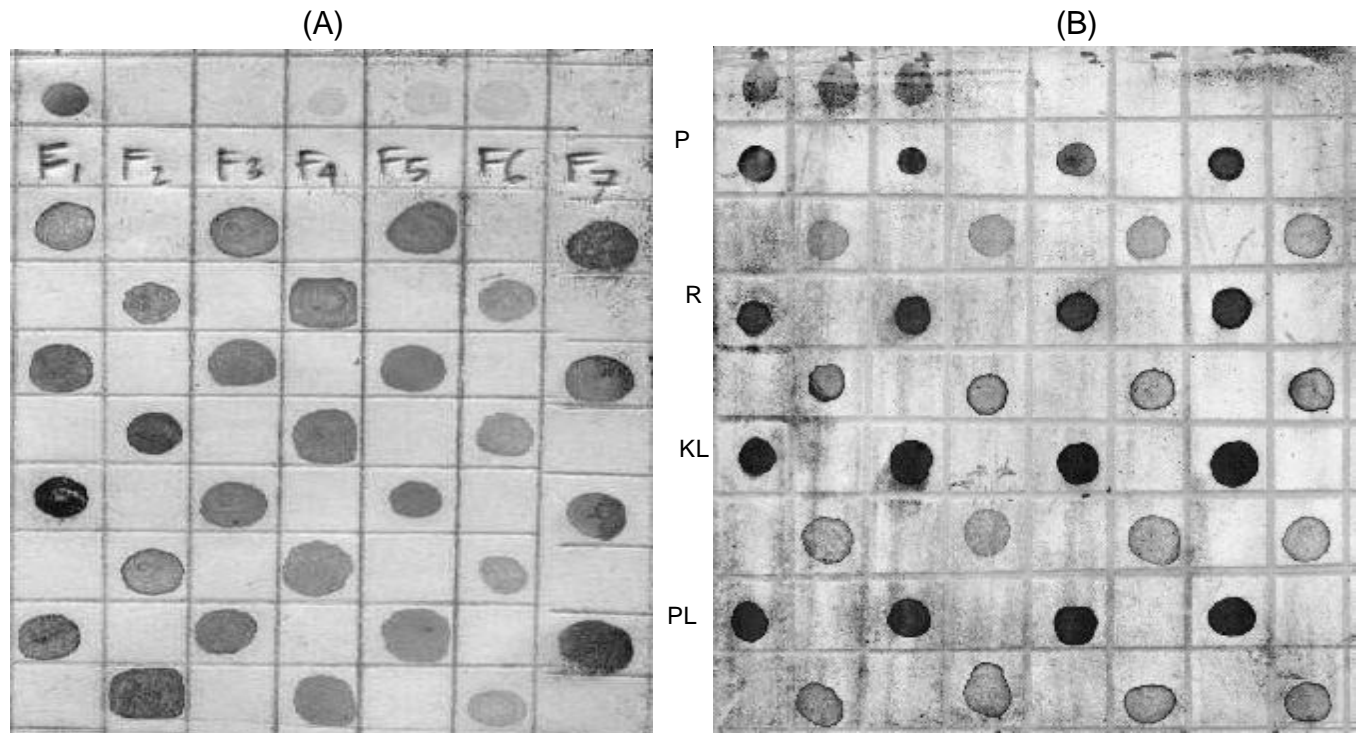
Hasil deteksi terhadap beberapa varietas padi asal Muara maupun Banyumas dapat dilihat pada Gambar

2. Dewasa ini untuk menanggulangi penyakit HDB dan meningkatkan hasil panen yang cukup efektif dengan menggunakan varietas tahan dan pembentukan padi hibrida masih dikembangkan (Sutaryo dan Suparyono 1997). Galur mandul jantan (padi hibrida) mempunyai kualitas yang baik dan sterilitas yang stabil, namun pengamatan di lapang menunjukkan banyak galur tersebut (sebagai tetua hibrida) masih rentan terhadap hama penyakit. Hasil deteksi *Xoo* pada berbagai benih padi galur hibrida asal Sukamandi menggunakan TBS

Tabel 2. Nilai/skor hasil pengujian teknik penyiapan Ag untuk deteksi *Xoo* pada benih padi galur hibrida menggunakan PAb *Xoo*.

Galur hibrida	Digerus		Tidak digerus		Inkubasi 24 jam		Inkubasi 48 jam	
	digojok	tidak digojok	digojok	tidak digojok	digerus	tidak digerus	digerus	tidak digerus
IR 68886 A/R2	2	3	2	1	3	4	3	4
IR 68885A/R7	2	2	1	1	3	3	1	2
R8	1	3	1	1	4	3	2	2
IR 68888A/R9	2	3	1	3	3	3	2	2
IR 68897A/R10	1	1	1	2	1	3	4	4
R13	3	3	2	2	2	2	1	2
R14	3	3	2	2	1	2	1	2

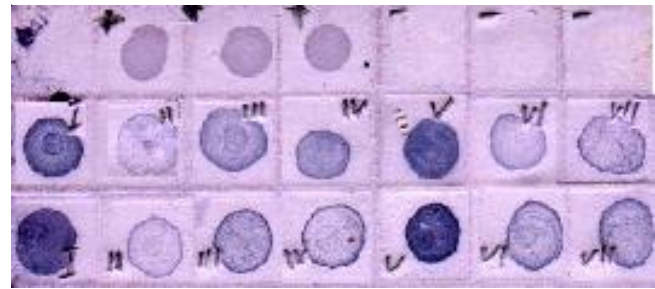
+++ = reaksi sangat kuat (4), ++ = reaksi kuat (3), + = reaksi agak kuat (2), ± = reaksi lemah (1), - = tidak ada reaksi (0).



Gambar 2. Hasil deteksi *Xoo* dengan Pab *Xoo* pada benih padi asal Muara Bogor (A) dan Banyumas Jawa Tengah (B).  
 (A) Muara, Bogor.  
 Kolom F1 = IR64, kolom F2 = Cisadane, kolom F3 = Kencana, kolom F4 = Cisokan, kolom F5 = Cisanggarung, kolom F6 = Asahan, kolom F7 = Krueng Aceh.  
 (B). Banyumas, Jawa Tengah,  
 Baris P = Pandan wangi, Baris R = Rojolele, Baris KL = ketan lokal, Baris PL = padi lokal,  
 += positif kontrol, - = negatif kontrol (bufer).



Gambar 3a. Hasil deteksi *Xoo* pada benih padi galur hibrida menggunakan TBS sebagai buffer ekstraksi. Baris 1. Kontrol positif (*Xoo*) dan kontrol negatif (buffer), Baris 2 dan 3. I=IR 68886 A/R2, II= IR 68885A/R7, III=R8, IV= IR 68888A/R9, V= IR 68897A/R10, VI= R13, VII= R14. += positif kontrol, - = negatif kontrol (bufer/air steril).



Gambar 3b. Hasil deteksi *Xoo* pada benih padi galur hibrida menggunakan NB sebagai buffer ekstraksi. Baris 1. Kontrol positif (*Xoo*) dan kontrol negatif (buffer), Baris 2 dan 3. I = IR 68886 A/R2, II= IR 68885A/R7, III=R8, IV= IR 68888A/R9, V= IR 68897A/R10, VI= R13, VII= R14. += positif kontrol, -= negatif kontrol (bufer/air steril).

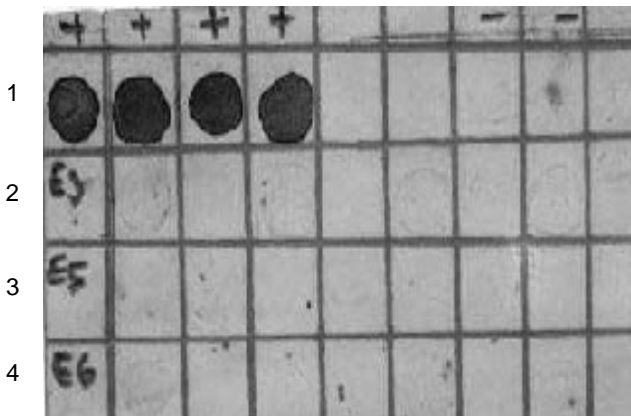
dan media NB sebagai buffer ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 3a dan 3b. Hasil penelitian menunjukkan bahwa teknik penyiapan Ag yang cepat adalah dengan penggerusan benih dan menggunakan buffer ekstraksi TBS.

Hasil deteksi *Xoo* pada benih padi galur hibrida yang disiapkan melalui cara penumbuhan benih dapat dilihat pada gambar 4a. Benih yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada cawan petri yang diberi alas kertas saring Whatman lembab dan ekstraksi menggunakan TBS. Pada perlakuan dimana benih terlebih dahulu dikecambahkan selama 7, 14, dan 21 hari dan selanjutnya diuji dengan NCM-ELISA menunjukkan bahwa *Xoo* tidak terdeteksi secara efektif. Hal ini mungkin disebabkan karena setelah benih tumbuh, sumber inokulum yang berada atau terbawa di bagian benih telah menurun konsentrasinya sejalan dengan pertumbuhan tanaman. Meskipun demikian bakteri tersebut dapat bertindak sebagai sumber inokulum awal yang penting untuk infeksi selanjutnya, apabila kondisi inang dan lingkungan menguntungkan perkembangan patogen. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa benih padi, terutama bagian endosperma, merupakan sumber inokulum primer pada infeksi di pembibitan, meskipun demikian penularan penyakit melalui benih relatif kurang penting di daerah tropik (Eamchit dan Ou 1970). Dalam kondisi yang kurang menguntungkan, *Xoo* dapat bertahan pada benih padi sampai beberapa bulan sebagai sumber inokulum pada pertanaman berikutnya (Kaufmann *et al.* 1973). Hasil penelitian Suryadi dan Machmud (1990) menunjukkan bahwa infeksi parah *Xoo* pada padi lebih banyak terjadi pada luka bagian tanaman dibanding pada bagian stomata daun. Hasil penelitian ini menguatkan pendapat bahwa *Xoo* bukan merupakan patogen tular-benih (*seed-borne*) yang penting. Nampaknya tidak ada hubungan antara ketebalan warna selaput NCM dengan sifat tahan tidaknya suatu

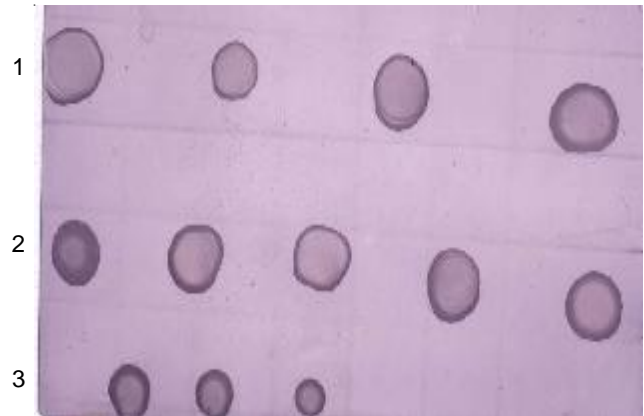
varietas padi terhadap *Xoo*. Ketebalan warna yang dihasilkan menunjukkan banyaknya Ag yang berikatan dengan PAb.

Hasil pengujian terhadap contoh padi terinfeksi HDB yang diperoleh dari berbagai lokasi di Jawa dan Lampung menunjukkan bahwa PAb-*Xoo* efektif dalam mendeteksi keberadaan patogen tersebut (Gambar 4b). Hasil pengujian terhadap isolat *Xoo* yang berasal dari berbagai lokasi di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Lampung disajikan pada Tabel 3. Hasil pengujian ini mendukung hasil penelitian sebelumnya, di mana contoh *Xoo* juga dapat terdeteksi menggunakan ELISA tidak langsung (Quimio 1989).

NCM-ELISA memberikan solusi lebih baik dalam hal waktu dan ketepatan deteksi. Hasil deteksi menggunakan NCM-ELISA, secara kualitatif dapat diketahui dari berubahnya warna membran menjadi ungu dalam waktu relatif cepat (<24 jam). NCM-ELISA adalah salah satu metode uji berdasarkan reaksi enzimatik menggunakan antibodi pada membran nitroselulosa di mana hasilnya lebih sensitif, lebih mudah dan cepat daripada DAS-ELISA (*Double-Antibody Sandwich ELISA*). NCM-ELISA mempunyai beberapa keuntungan, antara lain membran nitroselulosa dan contoh uji dapat disimpan sampai beberapa minggu sebelum uji dilanjutkan (Suryadi *et al.* 2003). Selain itu, membran juga dapat dikirimkan ke laboratorium lain yang membutuhkan uji sejenis. Penggunaan NCM-ELISA saat ini antara lain telah diterapkan untuk deteksi bakteri pada padi maupun virus tanaman kentang (Suryadi *et al.* 2003; Fuentes 1993). Apabila ditujukan untuk penjarangan galur, penelitian masih perlu dilanjutkan dengan pengujian tanaman pada fase generatif di lapang. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa aplikasi PAb yang diperoleh dari isolat lokal *Xoo* (strain 4) asal Sukamandi dapat digunakan sebagai sumber PAb untuk mendeteksi



Gambar 4a. Hasil deteksi *Xoo* pada benih padi galur hibrida melalui penumbuhan benih (*growing on test*). Baris 1 + = Kontrol positif (*Xoo*) dan - =kontrol negatif (buffer), Baris 2,3,4. (E3, E5, E 6) = benih padi yang dikecambahkan masing-masing selama 7, 14, dan 21 hari.



Gambar 4b. Contoh hasil deteksi padi terinfeksi HDB asal Jatim dan Lampung yang dideteksi dengan PAb *Xoo*. Baris 1 = contoh padi asal Lampung, Baris 2 = contoh padi asal Jatim, Baris 3 = kontrol positif, dan negatif.

Tabel 3. Hasil deteksi *Xoo* dengan PAb-*Xoo* dan NCM-ELISA pada contoh isolat yang diisolasi dari berbagai lokasi di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Lampung.

Contoh isolat/ kode isolat	Asal inang	Asal lokasi	Reaksi terhadap PAb <i>Xoo</i>
Xoo1	Ciherang	Ciranjang/Jabar	++
Xoo2	Cimelati	Ciranjang/Jabar	++
Xoo3	Sintanur	Muara,Bogor/Jabar	++
Xoo4	Way Apo Buru	Ciranjang/Jabar	++
Xoo5	IR64	Ciranjang/Jabar	++
Xoo6	Ciherang	Ciranjang/Jabar	++
Xoo7	Ciherang	Sukamandi/Jabar	++
Xoo8	Widas	Sukamandi/Jabar	++
Xoo9	BP 140	Sukamandi/Jabar	++
Xoo10	Way Apo Buru	Sukamandi/Jabar	++
Xoo11	padi hibrida	Sukamandi/Jabar	++
Xoo12	IR42	Pagaden/Jabar	++
Xoo13	IR64	Pagaden/Jabar	++
Xoo14	Memberamo	Pagaden/Jabar	++
Xoo15	padi lokal	Pagaden/Jabar	++
Xoo16	ketan lokal	Cisalak/Jabar	++
Xoo17	IR64	Cisalak/Jabar	++
Xoo18	Ciherang	Batang/Jateng	++
Xoo19	Fatmawati	Batang/Jateng	++
Xoo20	Sadang	Batang Jateng	++
JT 3 (Xoo 21)	IRBB2	Madiun/Jatim	++
JT4 (Xoo 22)	IRBB5	Madiun/Jatim	++
JT6 (Xoo 23)	IRBB3	Madiun/Jatim	++
JT7 (Xoo 24)	IRBB5	Madiun/Jatim	++
JT8 (Xoo 25)	IRBB5	Madiun/Jatim	++
JT9 (Xoo 26)	IRBB6	Madiun/Jatim	++
JT10 (Xoo 27)	Tetep	Madiun/Jatim	++
L2 (Xoo 28)	IR64	Bakahueni/Lampung	++
L3 (Xoo 29)	IR64	Bakahueni/Lampung	++
L4 (Xoo 30)	Padi ketan	Metro/Lampung	++
L10 (Xoo 31)	Ciherang	Pringsewu/Lampung	++
L14 (Xoo 32)	Widas	Pringsewu/Lampung	++
L17 (Xoo 33)	IR64	Bandar Lampung/Lampung	++
L25 (Xoo 34)	Padi lokal	Bandar Lampung/Lampung	++

++ = positif menunjukkan *Xoo*

keberadaan *Xoo* pada benih padi. Sampai sejauh ini, dari berbagai laporan uji serologi terhadap *Xoo* menggunakan PAb yang disiapkan dari sel yang dipanaskan, glikoprotein maupun ekstraseluler polisakarida tidak bersifat spesifik terhadap strain patogen (Benedict *et al.* 1989). Untuk aplikasi yang lebih efektif, pengembangan PAb perlu terus dilanjutkan.

### KESIMPULAN

1. PAb yang diperoleh dari strain 4 asal Sukamandi menunjukkan reaksi positif pada semua contoh Ag *Xoo* yang diuji. Titer tertinggi antibodi diperoleh pada nilai 2048, dengan rata-rata kandungan kemurnian protein ( $OD_{280/260}$ ) berkisar antara  $1,23 \pm 0,14$  sampai  $1,55 \pm 0,25$ .
2. Tingkat pengenceran optimum PAb *Xoo* adalah 1 : 800. Konsentrasi terendah hasil deteksi terhadap Ag *Xoo* adalah  $10^4$  sel/ml dan teknik penyiapan Ag yang cepat adalah dengan penggerusan benih dan menggunakan buffer ekstraksi TBS.
3. Tidak terlihat reaksi silang dengan Ag bakteri lain seperti *RS*, *PSG* dan *XCG*.
4. PAb *Xoo* mampu mendeteksi keberadaan bakteri pada contoh kasar (sel utuh yang diperlakukan dengan pemanasan), maupun contoh biakan murni yang difiksasi dengan glutaraldehyde atau formalin. PAb *Xoo* yang digunakan menunjukkan reaksi positif terhadap contoh dari beberapa benih padi baik galur hibrida, padi lokal, maupun biakan murni *Xoo* yang diperoleh dari berbagai lokasi di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Lampung.

## UCAPAN TERIMA KASIH

1  
Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr Wawan dan Endang W. yang telah membantu dalam penyediaan dan pembuatan antiserum Xoo, dan Sdr Ani Sumiati atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

3

## DAFTAR PUSTAKA

4

- Ashura IK, RB. Magala, and CN. Mortensen. 1999. Isolation and characterization of seed-borne pathogenic bacteria from rice (*Oryza sativa* L.) in Tanzania. Tanzania. J. Agric. Sc. Vol 2 (1):71-80.
- Ball, E.M., R.O. Hampton, S.H. De Boer, and N.W. Schaad. 1990. Polyclonal antibody. p.33-54. In: R.O. Hampton, E.M. Ball, S.H. De Boer (Eds.). Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. The American Phytopathol. Soc., St. Paul, Minn. 389p.
- Benedict, A.A., AM.Alvarez, J. Berestecky, W. Imanaka, CY. Mizumoto, LW. Polard, TW. Mew, and CF. Gonzalez. 1989. Pathovar-specific monoclonal antibodies for *X. campestris* pv *oryzicola*. Phytopathol. 79:322-328.
- Choi, JE, N. Matsuyama, and S. Wakimoto. 1980. Serological specificity of *X. campestris* pv *oryzae*. Annual Phytopathol. Soc.Jpn. 46:455-463.
- Cottyn, B; van Outry; MF Cerez; MT De Cleene; M. Swing and TW Mew. 1996. Bacterial diseases of rice associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice seed in the Phillipines. Plant Dis. 80:438-444.
- Di, M; Y. Huazhi; NW Schaad and DA Roth. 1991. Selective recovery of *Xanthomonas* spp from rice seed. Phytopathol. 81:1358-1363.
- Eamchit, S and S.H Ou. 1970. Some studies on the transmission of bacterial blight of rice through seed. The Philippines Agric. Vol (LIV):33-45.
- Fuentes, S. 1993. Detection of sweet potato viruses using NCM-ELISA techniques. Int. Potato center (CIP), Lima, Peru (mimeograph).
- George, M.L.C., Bustaman, M., Cruz W.T., Leach, J.E., and Nelson, R.J. 1996. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Southeast Asia detected using PCR-based DNA fingerprint. Phytopathol. 87:302-309.
- Gonzalez,CF; GW Xu; HL Li and JW. Cooper. 1991. *Leersia hexandra* an alternative host for *X. campestris* pv. *oryzae* in Texas. Plant Dis. 75:159-162.
- Goto, M. 1970. Application of fluorescence antibody method for the study of ecology of bacterial leaf blight of rice. IRRRI unpubl report. 16p.
- Goto, M. 1992. Fundamental of bacterial plant pathology. Academic Press Inc., London. 342 pp.
- Hifni, H. R., S. Mihardja, E. Sutarno, Yusida, dan M.K. Kardin. 1996. Penyakit hawar daun bakteri pada padi sawah: masalah dan pemecahannya. Bul. AgroBio. 1(1): 18-23.
- Kaufmann, H., A. Reddy S. Hsieh, and S. Merca. 1973. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *X. oryzae*. Plant Dis. Repr. 57:537-441
- Lazarovits, G., D. Zutra, and M. Bar-Joseph. 1989. Enzyme linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (dot-ELISA) in serodiagnoses of plant pathogenic bacteria. Can. J. Microbiol. 33:98-103.
- Leach, LE; FF White, ML. Rhoads, and H. Leung. 1990. A repetitive DNA sequence differentiates *X. campestris* pv *oryzae* from other pathovars of *X. campestris*. Mol. Plant-Microbe Interact. 3:238-246.
- Lee S, Y. Di, C.S. Rong and X.X. Xea. 1982. Indirect fluorescent antibody staining (IFAS) for detection of rice leaf blight bacteria (*X. campestris* pv *oryzae*) (Uyeda et Ishiyama) Dowson. Chinese Acad of Agric. Sciences. Beijing China. 12 p.
- Mew, T.W. 1987. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. Ann.Rev.Phytopathol.(25):359-382.
- Mortensen CN. 1986. Seed bacteriology laboratory guide. Danida, Copenhagen. 100 pp.
- Priou, S. 1998. Manual for detection of *R. solanacearum* using the NCM-ELISA technique. CIP Lima Peru (mimeograph).
- Quimio, A.J 1989. Serology of *X. campestris* pv. *oryzae* p: 19-30. In : Proc. International workshop on bacterial blight of rice. IRRRI, P.O. Box 933 Manila, Philippines
- Smith R., A.P. Jones, J.G. Elphinstone, and SMD. Forde. 1995. Production of antibodies *P. solanacearum* the causative agent of bacterial wilt. Food and Agric. Immunol. 7:67-69.
- Suryadi. Y dan M. Machmud. 1987. Patotipe bakteri *X. campestris* pv *oryzae* di Jawa Barat pada MT 1985/1986 dan ketahanan varietas padi terhadap patotipe III, V, VI dan VIII. p: 165-169. Dalam Sastrahidayat et al. (Eds). Proc. PFI VII, Surabaya.
- Suryadi. Y dan M. Machmud. 1990. Pengamatan skaning electron mikroskop infeksi *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* pada daun padi. p: 37-47. Dalam: Hasil penelitian pertanian dengan aplikasi laboratorium II. Djoko S.D et al. (Eds). Proyek Pembangunan Penelitian Pertanian/NAR II. Badan Litbang Pertanian.
- Suryadi, Y., I. Manzila, M. Machmud, dan H. Jumanto. 2003. Pengembangan uji deteksi patogen dengan NCM-ELISA. Makalah disampaikan dalam Kongres XVII dan Seminar Ilmiah Nasional PFI. Bandung. 4 pp.
- Sutaryo, B. dan Suparyono. 1997. Penampilan beberapa padi hibrida di beberapa agroekosistem yang berbeda: hasil dan reaksinya terhadap hawar daun bakteri. p: 10-15. Dalam: Prosiding Kongres Nasional XIV dan Seminar Ilmiah PFI, Palembang.
- Triny, S.Kadir. 2000. Penyakit hawar daun bakteri. Dalam: Tonggak kemajuan teknologi produksi tanaman pangan. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Wang, F, C.Y. Lin, DX.Young, XG, Lou, YS Zhi, and XW, Ying. 1980. Using reverse indirect hemagglutination test in the detection of bacterial leaf blight pathogen. Chin. Agric. Sci.2:72-78.
- Widiarta, I.N. 2003. Laporan PTT. Balitpa (Unpublished).