

Deteksi Gen Ketahanan Hawar Daun Bakteri Xa21 pada Padi (*Oryza Sativa* L.) Hitam dan Merah Lokal Indonesia

Detection of Bacterial Leaf Blight Resistance Genes Xa21 in Local Cultivars of Black and Red Rice in Indonesia (*Oryza sativa* L.)

Andi Setiawan¹, Alfino Sebastian² dan Yekti Asih Purwestri^{1,2*}

¹⁾ Laboratorium Biokimia, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada
Jl. Teknika Selatan, Senolowo, Sinduadi, Mlati, Kabupaten Sleman, Yogyakarta 55281

²⁾ Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada
Barek, Jalan Teknika Utara, Kocoran, Caturtunggal, Kec. Depok,
Kabupaten Sleman, Yogyakarta 55281

^{*} Penulis untuk korespondensi E-mail: yekti@ugm.ac.id

Diajukan: 1 Juli 2018 **/Diterima:** 13 April 2021 **/Dipublikasi:** 25 Mei 2021

ABSTRACT

Pigmented rice become popular consumed by the public as a functional food. However, there are factors limiting pigmented rice production, namely bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo). The use of resistant varieties that have the Xa resistance gene is considered effective in overcoming the problem of decreasing rice yields. This Xa gene consists of several genes, one of which is a Xa21 gene. This study aims to determine the presence of the Xa21 bacterial leaf blight resistance gene in black rice cultivars Sembada Hitam, Cempo Ireng, Melik and Hitam Toraja and red rice cultivars of Aek sibondang, Merah Sumbawa, Segreng, and Pari Eja in Indonesia. The research methods included isolating the rice genome, checking the results of DNA isolation with agarose gel electro-foresis (0.8%), measuring the concentration and purity of DNA, amplification of DNA using specific primers Xa21, and data analysis. The results of this study detected the presence of Xa21 gene in all cultivars of black and red rice with resistant properties.

Keywords: black rice; BLB; red rice; Xa21 gene

INTISARI

Beras berpigmen mulai populer dikonsumsi oleh masyarakat sebagai bahan pangan fungsional. Tetapi, terdapat faktor pembatas produksi beras berpigmen yaitu penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo). Penggunaan varietas tahan yang memiliki gen ketahanan Xa dinilai efektif untuk menanggulangi masalah penurunan hasil padi. Gen Xa ini antara lain terdiri dari gen Xa21. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan gen ketahanan hawar daun bakteri Xa21 pada padi hitam kultivar Sembada Hitam, Cempo Ireng, Melik dan Hitam Toraja serta padi merah kultivar Aek sibondang, Merah Sumbawa, Segreng, dan Pari Eja di Indonesia. Metode penelitian meliputi isolasi genom padi, pengecekan hasil isolasi DNA dengan elektroforesis gel agarosa (0,8%), pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA, amplifikasi DNA primer pTA248, dan analisis

data. Hasil penelitian ini mendeteksi keberadaan gen *Xa21* pada semua kultivar padi hitam dan merah tersebut dengan dengan sifat tahan.

Kata kunci: gen *Xa21*; HDB; padi hitam; padi merah

PENDAHULUAN

Beras adalah makanan sereal yang menjadi makanan pokok di sebagian negara Asia. Beras yang paling umum dikonsumsi oleh manusia adalah beras putih (sekitar 85%), dan sisanya adalah beras berpigmen. Beras berpigmen terutama beras hitam, beras merah dan beras ungu gelap. Beras ini berisi berbagai senyawa metabolit seperti *flavon*, *tanin*, *fenolat*, *sterol*, *tocols*, *γ-oryzanol*s, asam amino, dan minyak esensial. *Antosianin*, sekelompok *flavonoid* ungu kemerahan yang larut dalam air, dianggap sebagai komponen fungsional utama beras berpigmen (Deng *et al.*, 2013).

Kebutuhan beras di Indonesia secara nasional tergolong tinggi, jika dilihat dari perhitungan angka kasar jumlah total penduduk dengan kebutuhan konsumsi beras per kapita per tahun. Berdasarkan data sensus penduduk 2020, penduduk Indonesia berjumlah 270,20 juta jiwa, sedangkan kebutuhan konsumsi beras per kapita adalah 114,8 kg per tahun (Badan Pusat Statistik, 2020). Dari data ini dapat diperoleh gambaran jumlah kebutuhan beras nasional per tahun yaitu sebesar 29,57 ton dan kelompok padi-padian masih menjadi sumber kalori utama penduduk Indonesia yaitu sebesar 38,42 persen dari total konsumsi. Namun terdapat faktor pembatas produksi padi yang bisa menurunkan produksi hasil panen dalam jumlah besar yaitu penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*).

Penurunan produktivitas padi akibat serangan penyakit ini umumnya berkisar antara 15–23% (Kadir, 2009).

Pergiliran varietas tahan perlu dirancang secara cermat untuk mengantisipasi perubahan strain *Xoo* dosdan agar ketahanan varietas dapat berfungsi dengan baik dan bertahan lebih lama (Ogawa 1993). Salah satu upaya yang dinilai efektif untuk mencegah penurunan hasil padi akibat serangan *Xoo* adalah dengan menanam varietas tahan yang mengandung gen ketahanan yaitu gen *Xa* karena bersifat ekonomis dan ramah lingkungan (Rao *et al.*, 2003). Ketahanan varietas tanaman padi dipengaruhi oleh interaksi antara gen *Xa* dengan gen virulensi yang dimiliki oleh *Xoo* (Yamasaki *et al.*, 2006). Sejauh ini terdapat 39 gen *Xa* yang telah diidentifikasi dari padi spesies liar dan padi budidaya (Khan *et al.*, 2014 dalam Dossa *et al.*, 2015). Beberapa gen *Xa* yang telah diidentifikasi antara lain adalah *Xa21*. Masing-masing gen *Xa* menghasilkan ketahanan yang berbeda terhadap masing-masing patotipe *Xoo*. Pada penelitian yang dilakukan oleh Prasetya (2014), gen *Xa21* memberikan respon tahan terhadap patogen ras III dan VIII, dan memberikan respon agak tahan terhadap patogen ras IV.

Di Indonesia terdapat banyak kultivar lokal padi hitam dan padi merah yang belum diketahui keberadaan gen *Xa21* dan status ketahanannya. Pada penelitian yang dilakukan oleh Swamy *et al.* (2006), menyatakan bahwa

gen *Xa21* merupakan gen yang paling efektif terhadap resistensi Xoo. Studi yang dilakukan oleh Saumi (2017) juga mengungkapkan bahwa padi hitam kultivar Cempo Ireng dan Melik terdeteksi memiliki gen ketahanan hawar daun *Xa21* dengan status ketahanan yang belum diketahui. Sementara itu, belum ada penelitian yang melaporkan keberadaan gen ketahanan hawar daun bakteri pada kultivar padi hitam dan padi merah lokal lainnya.

Berkaitan dengan masalah tersebut, studi ini dilakukan untuk mendeteksi keberadaan gen ketahanan terhadap hawar daun bakteri yaitu gen *Xa21*, serta status ketahanannya pada kultivar padi lokal berpigmen di Indonesia. Penelitian dilakukan dengan mengelompokkan pita DNA hasil PCR gen *Xa21*, yang selanjutnya dikonstruksi sebuah dendrogram dengan menggunakan metode pengaklasteran *Simple matching coefficient* untuk menentukan tingkat kekerabatan gen *Xa21* dari berbagai kultivar padi lokal berpigmen di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Perkecambahan dan Penanaman Benih

Benih padi disterilkan dengan larutan natrium hipoklorit 5,2% selama 3 menit, dicuci tiga kali dengan akuades selama 5 menit, dan direndam dalam akuades selama 1 hari. Benih kemudian dibiarkan berkecambah, dan benih dibiarkan tumbuh pada media tanah sawah. Daun padi berumur empat minggu dipanen untuk dilakukan isolasi DNA.

Isolasi DNA

Sampel berupa daun padi 20 mg digerus menggunakan nitrogen cair kemudian dilakukan ekstraksi DNA dengan menggunakan metode

DNA easy-kit (Qiagen). Sampel DNA kemudian disimpan di suhu -20°C .

Pengamatan hasil Isolasi DNA dengan elektroforesis gel agarose

Sebanyak 5 μL sampel DNA dicampur dengan larutan 2 μL *loading dye* di-*running* menggunakan Gel agarosa 0,8% selama 30 menit pada voltase 100 V menggunakan alat elektroforesis (*Mupid-exU*). Selanjutnya agarose hasil elektroforesis divisualisasikan dengan UV-transilluminator (*MicroDOC UVT254*).

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA

DNA total yang telah berhasil diekstraksi kemudian diuji secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer nanodrop (*MN-913A Maestro Nano Pro*), pada panjang gelombang λ 230 nm, λ 260 nm, dan λ 280 nm (Surzycki, 2000).

Amplifikasi Gen *Xa21*

Amplifikasi gen *Xa21* dilakukan dengan metode PCR (*BioRad-T100 Thermal Cycler*). Sebanyak 10 μL dalam PCR tube dengan komposisi: 1 μL DNA template, 1 μL masing-masing primer gen *pTA248* (Forward: 5'-AGACGCGGAAGGGTG GTTCCCGGA-3' dan reverse: 5'-AGACGCGG TAATCGAAGATGAA-3') 10 nM, 5 μL *Bioline MIX PCR Kit*, dan 2 μL NFW (*Nuclease Free Water*). Program PCR yang digunakan adalah pre denaturasi 95°C selama 1 menit, kemudian diikuti dengan 30 kali siklus denaturasi 95°C selama 1 menit, annealing 65°C selama 30 detik, extension 72°C selama 1 menit, dan final extension 72°C selama 10 menit. Setelah proses PCR selesai, produk PCR diruning dengan elektroforesis gel agarosa 2%. Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan UV-

Transilluminator dan didokumentasikan dengan gel doc camera (*MicroDOC UVT254*).

Analisis Kluster dan Konstruksi Dendogram

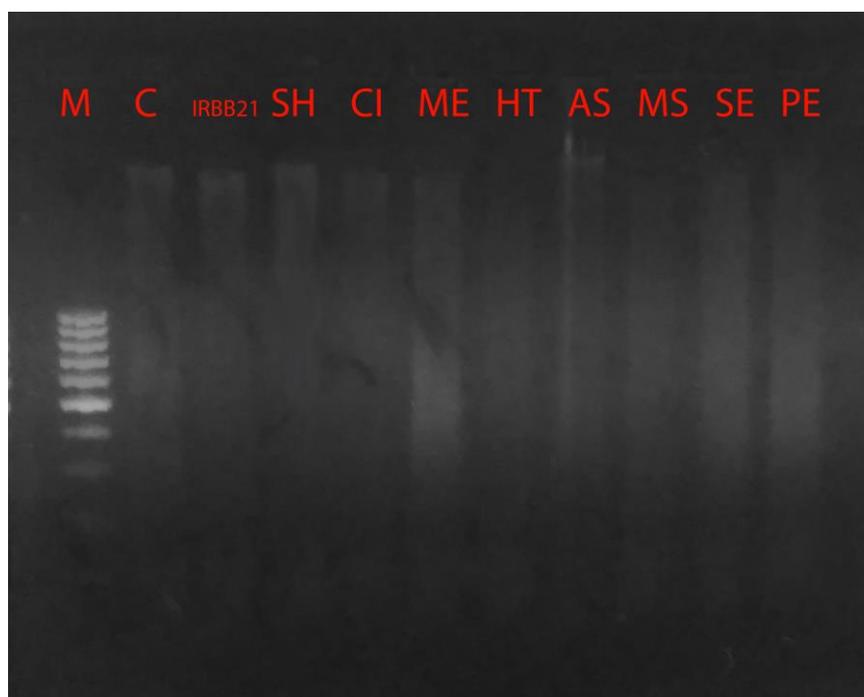
Analisis data dilakukan dengan membandingkan produk PCR hasil elektroforesis gel agarosa 2% dengan ukuran pita DNA standar yang digunakan (100bp). Penentuan ukuran pita DNA dihitung dengan menggunakan persamaan regresi antara log ukuran pita DNA standar (Y) dengan nilai Rf (X) dari tiap-tiap pita DNA tanaman padi yang digunakan. Dari ukuran pita yang bervariasi dikelompokkan ke dalam 3 jenis, yang selanjutnya dilakukan analisis pengklasiteran berdasarkan Simple matching coefficient dengan program *ClustalX ver. 1.8*. Kemudian dari pengklasteran tersebut dibuat clustering matriks similaritas, dan selanjutnya dibuat dendrogram dari clustering tersebut menggunakan aplikasi *MEGA Ver. 7.0*.

Ekstraksi DNA merupakan langkah awal prosedur kerja dalam genetika molekular untuk mendapatkan DNA dari suatu organisme tanpa debris sel. Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi DNA yang kemudian dilanjutkan dengan deteksi gen *Xa21* untuk mengetahui potensi ketahanan padi lokal berpigmen terhadap penyakit hawar daun.

Hasil Kualitatif dan Kuantitatif Isolasi DNA Daun Padi

DNA yang telah diperoleh dari proses ekstraksi DNA diuji kualitasnya secara kualitatif dengan metode elektroforesis menggunakan media gel agarose 0,8%. Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul bermuatan di dalam medan listrik. Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul (Titrawani, 1996)

HASIL DAN PEMBAHASAN



Keterangan: M = Marker 100 bp, C = Ciherang, SH = Sembada Hitam, CI= Cempo Ireng, ME = Melik, AS = Aek Sibondang, MS = Merah Sumbawa, SE = Segreng, dan PE = Pari Eja.

Gambar 1. Elektroforegram isolasi genom padi. Seluruh sampel menunjukkan band yang relatif sama yang mengindikasikan keberhasilan dalam mengisolasi DNA Genom.

Prinsip pergerakan fragmen DNA berdasarkan pada muatan negatif molekul DNA yang berpindah melalui gel agarosa menuju muatan positif. Gel agarosa yang memiliki tekstur *semisolid* memiliki pori-pori yang dapat menghalangi perpindahan fragmen DNA. Ukuran fragmen DNA yang lebih besar bermigrasi lebih lambat karena memiliki gesekan yang lebih besar dengan agarose menyebabkan migrasi melalui pori menjadi tidak seefektif fragmen DNA yang berukuran kecil (Sambrook & Russell, 2001). Hasil isolasi genom padi disajikan dalam bentuk elektro-foregram (gambar 1). Marker yang digunakan yaitu DNA ladder 100 bp.

Proses ekstraksi DNA telah berhasil mengisolasi DNA genom dari daun padi. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pita DNA genom padi pada seluruh sumuran gel agarosa 0,8% dengan ukuran yang sama untuk seluruh kultivar padi. Pita DNA yang tebal dan mengumpul

(tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh. Sedangkan, pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga DNA genom terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang dapat terjadi pada proses pemipetan, disentrifus, atau bahkan temperatur yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu (Irmawati, 2003). Selain itu menyatakan bahwa adanya smear menunjukkan masih terdapat RNA yang mengkontaminasi isolat DNA. Adanya RNA dapat terjadi karena pada metode isolasi DNA yang dilakukan tidak digunakan RNase yang berfungsi untuk menghilangkan kontaminan RNA (Farrel, 2010).

Tabel 1. Pengukuran DNA padi secara kuantitatif

Sampel DNA	Konsentrasi DNA(ng/μl)	Kemurnian DNA
		(A260/A280)
Ciherang	438,44	2,153
IRBB21	582,18	1,898
Sembada Hitam	404,04	2,010
Cempo Ireng	379,51	2,086
Melik	555,48	1,987
Hitam Toraja	463,57	2,054
Aek Sibondang	402,18	2,127
Merah Sumbawa	235,21	1,975
Segreng	378,93	1,980
Pari Eja	278,44	1,821

Uji kuantitatif DNA genom dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer nano-drop untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA genom padi hasil isolasi. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, konsentrasi dan kemurnian DNA genom yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 1.

Kemurnian DNA berguna untuk melihat ada tidaknya kontaminan DNA yang berupa RNA dan protein. Pengukuran kemurnian

dengan menggunakan spektrofotometer dapat ditentukan dengan cara menghitung rasio antara nilai 260 nm dan 280 nm pada sampel DNA. Nilai 260 nm merupakan nilai maksimal DNA dapat menyerap cahaya, nilai tersebut dapat digunakan untuk memperkirakan konsentrasi DNA, sedangkan nilai 280 nm merupakan nilai maksimal residu protein dapat menyerap cahaya.



Keterangan:

M = Marker 100 bp, C = Ciharang, SH = Sembada Hitam, CI= Cempo Ireng, ME = Melik, AS = Aek Sibondang, MS = Merah Sumbawa, SE = Segreng, dan PE = Pari Eja.

Gambar 2. Elektroforegram hasil amplifikasi gen *Xa21*. Terdapat 3 kelompok ukuran band yaitu ~1440 bp, ~969 bp, dan ~872 bp.

Berdasarkan hasil pengukuran spektrofotometri menunjukkan tingkat kemurnian sampel DNA, masing-masing sampel berkisar antara 1,821 hingga 2,153. Hasil ekstraksi dengan rasio 1,8 sampai 2,0 merupakan DNA dengan kemurnian yang tinggi dan tidak terkontaminasi dengan residu protein. Kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan dalam analisis molekuler. Hasil yang menunjukkan nilai kemurnian di bawah 1,8

menunjukkan masih adanya kontaminan protein, sedangkan hasil ekstraksi dengan kemurnian di atas 2,0 menunjukkan adanya kontaminan senyawa berat molekul kecil misalnya RNA, sehingga diperlukannya adanya purifikasi dengan RNase. DNA yang tidak murni disebabkan juga oleh adanya sisa-sisa etanol pada saat pengeringan yang tidak menyeluruh. Faktor lain yang menyebabkan DNA tidak murni adalah adanya sisa kandungan metabolit sekunder

pada organ tanaman yang diekstrak Sambrook & Russel (2001).

Konsentrasi yang didapatkan pada tahap ekstraksi memiliki berkisar antara 235,21 ng/ μ L hingga 582,18 ng/ μ L, tiap kultivar setidaknya memerlukan konsentrasi di atas 40 ng/ μ L cukup untuk digunakan dalam tahap amplifikasi DNA menggunakan penanda molekuler SCAR berda-

sarkan protokol Priya *et al.*, (2016) kisaran konsentrasi DNA yang bervariasi ini disebabkan oleh perbedaan kualitas daun yang tersedia untuk diekstrak DNANYa, selain itu DNA genom yang diekstrak tidak semua dapat diambil karena banyak hasil penggerusan yang tidak terpindahkan ke dalam microtube.

Tabel 2. Kelompok ukuran pita hasil amplifikasi gen *Xa21*

Kelompok	Ukuran band (bp)	Kultivar padi
A	~1440	IRBB21 Segreng
B	~969	Sembada Hitam Cempo Ireng Melik Hitam Toraja Aek Sibondang Pari Eja
C	~872	Ciherang Merah Sumbawa Pari Eja

Deteksi Gen *Xa21*

Deteksi gen ketahanan terhadap hawar daun bakteri yaitu *Xa21* pada 4 kultivar lokal padi hitam Sembada Hitam, Cempo Ireng, Melik, dan Hitam Toraja, serta 4 kultivar lokal padi merah yaitu Aek Sibondang, Merah Sumbawa, Segreng, dan Pari Eja, serta 2 kultivar padi putih yaitu Ciherang dan IRBB21 menggunakan metode PCR dengan primer pTA248.

Hasil amplifikasi DNA untuk mendeteksi gen *Xa21* pada tiap kultivar padi disajikan dalam bentuk elektroforegram (Gambar 2). Elektroforegram hasil amplifikasi gen *Xa21* menunjukkan bahwa semua sampel padi teramplifikasi

dengan ukuran pita yang bervariasi. Berdasarkan perhitungan fragmen pita dengan menggunakan kurva regresi linear diperoleh variasi ukuran pita DNA yang teramplifikasi dengan primer pTA248, yang dalam variasi tersebut dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok ukuran pita. Kelompok ukuran pita A yaitu dengan ukuran pita berkisar 1440 bp, kelompok ukuran pita B dengan ukuran pita berkisar 969 bp, serta kelompok ukuran pita C dengan ukuran pita berkisar 872 bp. Dengan pengelompokkan tersebut dapat disusun seperti tabel 2.

Primer *pTA248* merupakan penanda STS berbasis PCR untuk penandaan gen *Xa21*. Primer *pTA248* menguatkan fragmen ~ 0.9 kb pada fragmen yang tahan (resisten) dan 600-700 bp dalam genotip rentan (Sundaram *et al.*, 2011). Salah satu keunggulan marka STS yaitu bersifat kodominan (bisa dibedakan alel heterozigot dan homozigot). Sesuai dengan penelitian Sundaram *et al.* (2016), amplifikasi gen dominan *Xa21* menggunakan primer *pTA248* (tipe STS) yang dapat mengamplifikasi gen *Xa21* pada ukuran 950 bp sebagai penanda sifat resistant (tahan) dan ukuran 660 bp sebagai penanda sifat *susceptible* (rentan).

Dalam penelitian ini, hasil amplifikasi gen *Xa21* dengan menggunakan primer *pTA248* menunjukkan adanya variasi ukuran pita yang mendekati ukuran penanda sifat tahan (950bp). Variasi ukuran pita tersebut yang dikelompokkan menjadi tiga kelompok ukuran pita A, B dan C, seperti terlihat pada tabel 4. Kelompok ukuran pita A yang teramplifikasi pada ukuran pita sekitar 1440 bp terdeteksi pada padi kultivar IRBB21 dan Segreng. Kelompok ukuran pita B yang teramplifikasi pada ukuran pita sekitar 969 bp terdeteksi pada padi kultivar Sembada Hitam, Cempo Ireng, Melik, Hitam Toraja, Aek Sibondang, dan Pari Eja. Sedangkan kelompok ukuran pita C yang teramplifikasi pada ukuran pita sekitar 872 bp terdeteksi pada padi kultivar Ciharang, Merah Sumbawa, serta Pari Eja

Pengelompokan ukuran pita dilakukan karena adanya variasi ukuran pita pada kesepuluh sampel yang diujikan. Dan variasi ukuran pita yang muncul keseluruhannya terdapat pada ukuran pita untuk penanda sifat tahan yaitu 950 bp. Sehingga, hal ini

menunjukkan bahwa pada keseluruhan sampel uji terdapat gen ketahanan hawar daun bakteri *Xa21* dengan sifat tahan. Pengelompokan ukuran pita yang terdiri dari tiga kelompok menunjukkan bahwa dalam penelitian ini, gen ketahanan hawar daun bakteri *Xa21* dengan sifat tahan yang terdiri atas 3 jenis.

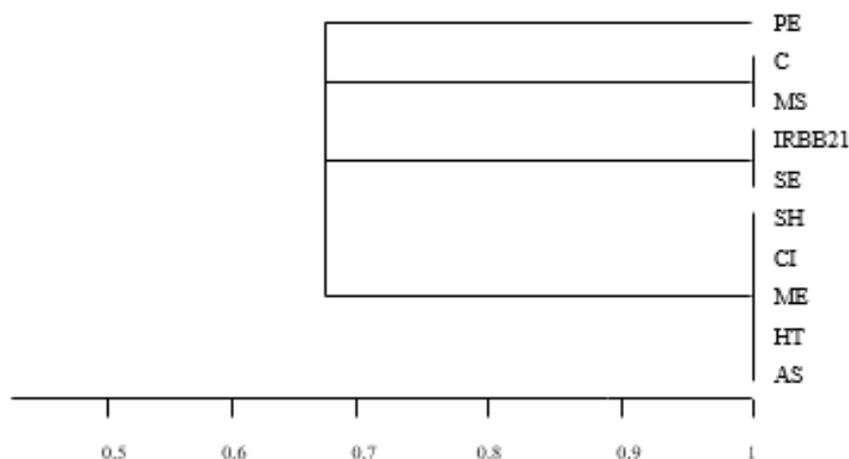
Berdasarkan pengelompokan yang terdiri dari 3 jenis kelompok pada sepuluh kultivar padi, disusun ke dalam tabel $n \times t$. Selanjutnya dilakukan penyusunan matriks similaritas berdasarkan *Simple matching coefficient*, yang disusun berdasarkan tabel $n \times t$ tersebut. Penggunaan *Simple matching coefficient* untuk menentukan nilai pada matriks similaritas ini digunakan karena pada *Simple matching coefficient* berdasarkan pertimbangan pada sifat *double negative*, sehingga hasilnya lebih akurat dibandingkan dengan metode lain.

Clustering analysis didapatkan dengan metode penghitungan algoritma pengklasteran. Algoritma pengklasteran yang digunakan adalah *average linkage*, yaitu nilai penyatuan dua strain atau lebih berada pada nilai rata-ratanya. Dari penghitungan dengan menggunakan *average linkage* didapatkan pada level tertentu akan terjadi peleburan strain yang diidentifikasi. Dari analisis pengklasteran didapatkan *clustering matriks similaritas*, yang selanjutnya dari *clustering matriks similaritas* tersebut didapatkan dendrogram. Dendrogram seperti pada gambar 7 merupakan hasil dari *clustering matriks similaritas*, yang menunjukkan tingkat kekerabatan dai kultivar padi yang diujikan.

Dendrogram pada gambar 3 menunjukkan bahwa padi kultivar 'Ciharang' memiliki kekerabatan dengan kultivar 'Merah Sumbawa',

kemudian padi IRBB21 memiliki kekerabatan dengan kultivar 'Segreng', serta 5 kultivar padi yaitu 'Sembada Hitam', 'Cempo Ireng', 'Melik', 'Hitam Toraja', dan 'Aek Sibondang' juga memiliki kekerabatan yang dekat. Sedangkan padi kultivar 'Pari Eja' memiliki kekerabatan yang agak jauh dengan kesemua kultivar dalam

penelitian ini, hal ini juga terlihat dari hasil amplifikasi yang adanya kemunculan 2 pita pada kultivar ini. Kekerabatan yang ditunjukkan dalam dendrogram pada gambar 3 merupakan kekerabatan berdasarkan keberadaan gen ketahanan *Xa21* dengan sifat tahan.



Keterangan:

C = Ciherang, SH = Sembada Hitam, CI= Cempo Ireng, ME = Melik, AS = Aek Sibondang, MS = Merah Sumbawa, SE = Segreng, dan PE = Pari Eja.

Gambar 3. Dendrogram hasil analisis pengklasteran. Terdapat 3 kelompok utama, yaitu kelompok A, B, C yang mengindikasikan kelompok jenis ketahanan yang berbeda-beda.

Gen *Xa21* merupakan gen yang dipindahkan dari spesies liar *Oryza longistaminata* ke IR24, menghasilkan garis isogenik dekat, yaitu IRBB21. Dalam tes untuk ketahanan penyakit, IRBB21 telah dilaporkan resisten terhadap banyak strain *Xoo* dari Filipina dan India (Swamy *et al.*, 2006). Dalam penelitian ini digunakan padi IRBB21 sebagai kontrol positif untuk deteksi gen *Xa21*. Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.* (1994) bahwa IRBB21 memiliki gen *Xa21* yang bersifat tahan. Pada penelitian ini, IRBB21 dikelompokkan ke dalam kelompok ukuran pita

A yaitu dengan ukuran pita sekitar 1440 bp. Dengan demikian dalam penelitian ini IRBB21 mempunyai gen ketahanan hawar daun *Xa21* dengan sifat tahan jenis A atau jenis pertama.

Kultivar padi Segreng yang digunakan dalam penelitian ini merupakan padi merah yang berasal dari daerah Gunung Kidul, Yogyakarta. Kultivar Segreng merupakan padi gogo unggul lokal dari Gunung Kidul. Status ketahanan padi kultivar ini terhadap hawar daun bakteri belum diketahui, keberadaan gen ketahanannya juga belum diketahui. Pada penelitian ini, hasil amplifikasi terhadap padi kultivar Segreng

masuk ke kelompok ukuran pita A, bersamaan dengan hasil IRBB21. Dengan demikian dapat diketahui padi kultivar Segreng memiliki gen *Xa21* dengan sifat tahan seperti IRBB21 yaitu jenis A atau jenis pertama.

Pada penelitian ini, padi kultivar Sembada Hitam, Cempo Ireng, dan Hitam Toraja, Melik, dan Aek Sibondang teramplifikasi dengan ukuran pita yang masuk dalam kelompok ukuran pita B yaitu dengan ukuran pita sekitar 969 bp. Dari penelitian yang dilakukan oleh Saumi (2017) yang juga melakukan pendeteksian gen ketahanan hawar daun *Xa21*, didapatkan hasil bahwa padi kultivar Cempo Ireng dan Melik terdeteksi memiliki gen ketahanan terhadap hawar daun bakteri *Xa21*, namun dengan status yang belum diketahui. Sesuai dengan penelitian tersebut, dalam penelitian ini kedua kultivar tersebut juga terdeteksi gen ketahanan hawar daun bakteri *Xa21* dengan sifat tahan. Dengan demikian kelima padi kultivar tersebut memiliki gen ketahanan hawar daun bakteri *Xa21* dengan sifat tahan jenis B atau jenis kedua.

Ciherang merupakan varietas padi yang tahan terhadap wereng coklat biotipe 2 dan agak tahan biotipe 3. Padi Ciherang baik ditanam di lahan sawah irigasi dataran rendah sampai 5000 m dpl. Wening *et al.* (2016) mengatakan bahwa Ciherang memiliki ketahanan terhadap hawar daun bakteri strain III dan IV. Pada penelitian ini digunakan kultivar local Ciherang yaitu dari Sleman sebagai pembanding. Padi kultivar Merah Subawa merupakan padi merah yang berasal dari daerah Sumbawa, Nusa Tenggara Barat. Belum ada penelitian mengenai kultivaar padi tersebut. Hasil amplifikasi didapatkan ukuran pita yang menunjukkan padi kultivar

Ciherang dan Merah Sumbawa masuk ke kelompok ukuran pita C, yaitu dengan ukuran pita sekitar 872 bp. Dengan demikian padi kultivar Ciherang dan Merah Subawa tersebut memiliki gen ketahanan hawar daun bakteri *Xa21* yang bersifat tahan jenis C atau jenis ketiga.

'Pari Eja' merupakan kultivar padi merah yang berasal dari daerah Kalimantan. Status ketahanan terhadap hawar daun bakteri pada padi kultivar ini belum diketahui, hal ini karena belum banyak penelitian mengenai kultivar padi ini. Pada penelitian ini, didapatkan bahwa hasil amplifikasi terdapat dua ukuran pita yang berbeda. Hasil tersebut membuat padi kultivar Pari Eja ini dapat dikelompokkan ke dalam kelompok ukuran pita B dan juga C. Dengan demikian padi kultivar Pari Eja diduga memiliki 2 jenis gen ketahanan hawar daun bakteri *Xa21* dengan sifat tahan yaitu jenis B dan C atau jenis kedua dan ketiga.

Adanya variasi ukuran pita dari gen *Xa21* yang terdeteksi di sepuluh tanaman padi yang digunakan diduga dikarenakan adanya polimorfisme pada gen ini. Hal ini didukung dengan primer yang digunakan bertipe STS yang mampu mendeteksi polimorfisme dan bersifat kodominan. Selain itu, adanya polimorfisme pada pada gen *Xa21* didukung dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Swamy *et al.*, (2006) bahwa hasil amplifikasi gen *Xa21* dengan menggunakan marker pTA248 menampilkan adanya polimorfisme. Namun, dalam penelitian ini tidak dilakukan pengecekan polimorfisme sehingga untuk mengetahui polimorfisme pada gen *Xa21*

perlu dilakukan sekuensing atau penentuan urutan nukleotida penyusunnya.

Kombinasi beberapa gen ketahanan *Xa* dalam satu kultivar padi akan meningkatkan ketahanan padi terhadap *Xoo* sebagaimana Nafisah *et al.*, (2007) menyebutkan tanaman padi yang memiliki lebih banyak gen *Xa* di dalam satu tanaman memiliki ketahanan yang lebih tinggi, sehingga tingkat ketahanan tanaman bisa lebih panjang. Selain itu, pada penelitian ini hanya dilakukan deteksi gen dalam 4 kultivar padi hitam dan 4 kultivar padi merah. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lanjut untuk melihat ekspresi gen *Xa* dan skrining untuk gen *Xa* lainnya.

KESIMPULAN

Kultivar padi yang diteliti memiliki gen ketahanan hawar daun bakteri (HDB) *Xa21* dengan sifat tahan (resisten), yang terdiri dari 3 kelompok ukuran gen ~1440 bp, ~969 bp dan ~872 bp. IRBB21 mempunyai gen ketahanan hawar daun *Xa21* dengan sifat tahan jenis A (~1440 bp) atau jenis pertama. Kultivar Sembada Hitam, Cempo Ireng, Hitam Toraj, Melik, dan Aek Sibondang teramplifikasi dengan ukuran pita yang masuk dalam kelompok ukuran pita B (~969 bp). Kultivar Ciherang dan Merah Subawa memiliki gen ketahanan hawar daun bakteri *Xa21* yang bersifat tahan jenis C (~872 bp) atau jenis ketiga. Kultivar Pari Eja dikelompokkan ke dalam kelompok ukuran pita B dan juga C, sehingga kultivar Pari Eja diduga memiliki 2 jenis gen ketahanan hawar daun bakteri *Xa21* dengan sifat tahan yaitu jenis B dan C atau jenis kedua dan ketiga. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mendeteksi gen *Xa* lainnya pada semua kultivar padi lokal

berpigmen tersebut. Selain itu, perlu dilakukan sekuensing untuk mengetahui polimorfisme pada gen *Xa21*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada teman-teman di Laboratorium Rekayasa Genetika PAU UGM yang telah banyak membantu penulis dari awal penelitan sampai penelitian selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistika. Data sensus penduduk Tahun 2020. www.bps.go.id. Diakses pada 10 Maret 2021.
- Deng, G.F., X.R. Xu, Y. Zhang, Li, R.Y. Gan, & H.B. Li. 2013. Phenolic compounds and bioactivities of pigmented rice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53:296–306.
- Dossa, G.S., A. Spark, C.V. Cruz, and R. Olivia. 2015. Decision tools for bacterial blight resistance gene deployment in rice-based agricultural ecosystems. *Frontiers in Plant Science*. 6(305):1–5.
- Farrel, R. E. 2010. *RNA Methodologies*. Academic Press. London.
- Irmawati. 2003. *Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok Hatchery*. Thesis. Bogor: IPB.
- Kadir, T.S. 2009. Menangkal HDB dengan menggilir varietas. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 31(5):1–3.

- Khan, M.A., M. Naeem, and M. Iqbal. 2014. Breeding approaches for bacterial leaf blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.) current status and future directions. *European Journal Plant Pathology*. 139:27–37.
- Nafisah, A.A., B. Daradjat, Suprihatno, dan T.S. Kadir. 2007. Ketahanan padi terhadap hawar daun bakteri. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 26(2):100–105.
- Ogawa, T. 1993. Methods and strategy for monitoring race distribution and identification of resistance genes to bacterial leaf blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) in rice. *JARQ*. 27: 71–80.
- Prasetya, O. W. 2014. Identifikasi Marka Gen Ketahanan Hawar Daun Bakteri Pada Galur Padi Introduksi dan Galur Dihaploid. *Tesis*. Program Studi Biologi Tumbuhan. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Priya, P. R., Selastin Antony, R., Gopaldaswamy, G. et al. 2016. Development of sequence-characterized amplified region (SCAR) markers as a quality standard of inoculants based on *Azospirillum*. *Arch Microbiol*, 198:257–267.
- Rao, K.K., K.K. Jena, and M.L. Narasu. 2003. Molecular Tagging of a New Bacterial Blight Resistance Gene in Rice Using RAPD and SSR Markers. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. Laboratory Pr. New York.
- Saumi, R. 2017. *Deteksi Gen Ketahanan Hawar Daun Bakteri Xa7 Dan Xa21 Pada Tiga Kultivar Lokal Padi Hitam (Oryza Sativa L.) di Yogyakarta*. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Sundaram, R.M., Laha, G.S., Viraktamath, B.C., Sujatha, K., Natarajkumar, P., Hari, Y., Srinivasa Rao, K., Reddy, C.S., Balachandran, S.M., Madhav, M.S., Hajira, S.K., Rani N.S., Vishnupriya, M.R and Sonti, R.V. 2011. *Marker Assisted Breeding For Development Of Bacterial Blight Resistant Rice*. In: K. Muralidharan and E.A. Siddiq (eds.) *Genomics and Crop Improvement: Relevance and Reservations*, Institute of Biotechnology, Acharya NG Ranga Agricultural University, Hyderabad 500 030 India (pp: 154–182).
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlay. Berlin Heidelberg. Germany.
- Swamy, P., Panchbhai, A. N., Dodiya, P., Naik, V., Panchbhai, S. D., Zehr, U. B., Char, B. R. 2006. Evaluation of bacterial blight resistance in rice lines carrying multiple resistance genes and Xa21 transgenic lines. *Current Science*. 90(6):818–824.
- Titrawani. 1996. *Biodiversiti Kodok Genus Rana Ditinjau dari Morfologi, Kariotip dan Pola Protein di Kodya Sawahlunto*. Program

Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
Bogor.

Wang G., Mackill DJ, Bonman JM, Mccouch SR
and Champoux MC. 1994. RFLP
mapping of genes conferring complete
and partial resistance to blast in a durably
resistant rice cultivar. *Genetics*.
136:1421–1434.

Wening, R. H., & Susanto, U. 2016. Varietas
Unggul Padi Tahan Hawar Daun Bakteri:
Perakitan dan Penyebaran di Sentra
Produksi Developed Bacterial Leaf Blight
Resistant Rice Variety : Its Breeding and
Adoption in the Production Center Areas.
Iptek Tanaman Pangan, 11(2):119–126.

Yamasaki, R.A.D, N. Murata, and T. Suwa.
2006. Studies on the culture of
Xanthomonas oryzae. *Joernal Bacteriol*,
42:946–949.