

**KARAKTERISASI MORFOFISIOLOGI DAN MOLEKULER  
BAKTERI PENYEBAB PENYAKIT BUSUK BULIR PADA  
TANAMAN PADI**

*MORPHOPHYSIOLOGICAL AND MOLECULER  
CHARACTERIZATION OF BACTERIAL GRAIN ROT ON RICE*

**IKHWANA AFLAHA**  
**P4100216009**



**SEKOLAH PASCASARJANA  
PROGRAM MAGISTER ILMU HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2018**

**KARAKTERISASI MORFOFISIOLOGI DAN MOLEKULER BAKTERI  
PENYEBAB PENYAKIT BUSUK BULIR PADA TANAMAN PADI**

**TESIS**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister**

**Program Studi  
Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan**

**Disusun dan Diajukan oleh :**

**IKHWANA AFLAHA  
Nomor Pokok P4100216009**

**Kepada**

**SEKOLAH PASCA SARJANA  
PROGRAM MAGISTER ILMU HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2018**

**TESIS**

**KARAKTERISASI MORFOFISIOLOGI DAN MOLEKULER BAKTERI  
PENYEBAB PENYAKIT BUSUK BULIR PADA TANAMAN PADI**

Disusun dan diajukan oleh

**IKHWANA AFLAHA**

**Nomor Pokok P4100216009**

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis  
pada tanggal 27 Desember 2018  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasehat,



Prof. Dr. Ir. Baharuddin, Dipl. Ing. Agr  
Ketua




Dr. Ir. Uhtung Surapati, M.Sc  
Anggota



Ketua Program Studi Magister  
Hama dan Penyakit Tumbuhan,

Prof. Dr. Ir. Nur Amia, Dipl. Ing. Agr



Dekan Fakultas Pertanian  
Universitas Hasanuddin,

Prof. Dr. Ir. Baharuddin, Dipl. Ing. Agr.

## **PERNYATAAN KEASLIAN TESIS**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ikhwana Aflaha

NIM : P4100216009

Program Studi : Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah hasil karya orang lain maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Desember 2018

Yang menyatakan

**Ikhwana Aflaha**

## ABSTRAK

**IKHWANA AFLAHA** (P4100216009). *Karakterisasi Morfofisiologi dan Molekuler Bakteri Penyebab Penyakit Busuk Bulir Pada Tanaman Padi* (dibimbing oleh Baharuddin dan Untung Surapati)

Penyakit busuk bulir (*Bacterial Grain Rot*) yang disebabkan oleh bakteri *Burkholderia glumae* menjadi ancaman yang serius bagi petani padi di Indonesia. Penelitian ini ditujukan untuk mengidentifikasi secara morfologi, fisiologi maupun molekuler isolat-isolat bakteri penyebab penyakit busuk bulir yang diperoleh dari beberapa lokasi pertanaman padi di Sulawesi Selatan. Karakterisasi morfologi dilakukan dengan pengamatan makroskopis dari koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media King's B meliputi warna, bentuk, tepi, dan elevasi koloni. Karakterisasi fisiologi dilakukan dengan serangkaian uji yang dapat menunjukkan karakter khas dari *B. glumae*. Hasil karakterisasi morfofisiologi kemudian dikonfirmasi dengan analisa molekuler menggunakan primer spesifik *B. glumae* dan dilanjutkan dengan sekuensing. Data hasil sekuensing diolah menggunakan program BLAST dan dibandingkan dengan data pada NCBI untuk analisa filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 21 isolat yang diduga *B. glumae* menunjukkan warna koloni kuning, putih kekuningan, putih krem, dan putih keabuan, dengan bentuk koloni umumnya yang bulat, tepi halus, dan elevasi cembung. Seluruh isolat-isolat yang diuji bereaksi positif pada KOH 3%, katalase, pigmen kuning toxoflavin, pencairan gelatin, dan uji pektinase pada bawang, sedangkan hasil negatif terlihat pada uji pembentukan pigmen fluorescens, koloni kuning pada media YDC, arginin dehidrolase, dan produksi levan. Hasil yang bervariasi terdapat pada uji oksidase fermentase, oksidase kovaks, dan uji hipersensitif pada daun tembakau. Analisa molekuler menggunakan primer 1418S dan 1418A menghasilkan pita DNA pada ukuran  $\pm 571$  bp pada semua isolat yang diuji. Sekuensing 6 isolat yang mewakili lokasi dan varietas padi menunjukkan tingkat kemiripan sebesar 98-99% dengan isolat *Burkholderia glumae* yang telah terdaftar di GeneBank.

**Kata Kunci** : *Burkholderia glumae*, hawar malai, PCR, sekuensing

## ABSTRACT

IKHWANA AFLAHA (P4100216009). *Morphophysiological and Molecular Characterization of Bacterial Grain rot on Rice* (supervised by Baharuddin and Untung Surapati)

Bacterial grain rot disease caused by *Burkholderia glumae* has become a serious threat to rice farmers in Indonesia. The study was aimed to identify bacterial isolates obtained from rice grains collected from several locations of rice plantations in South Sulawesi using morphological, physiological, and molecular characterization. Morphological characterization was carried out by macroscopic observation of bacterial colonies grown on King's B media including colony's color, shape, edge and elevation. The characterization of physiological characters was carried out by a series of physiological tests that provide typical characteristics of *B. glumae*. The results of morphophysiological characterization were then confirmed by molecular analysis, including sequencing. The results showed that all of 21 isolates suspected of *B. glumae* showed yellow colony, yellowish white, creamy white and grayish white, with generally round, smooth edges and convex elevation. All of the isolates tested reacted positively to KOH 3%, catalase, toxoflavin yellow pigment, melting gelatin, and pectinase test on onions, while negative results were seen in pigment fluorescence test, yellow colonies on YDC media, arginine dehydrolase, and levan production. Variable results were found in the oxidative-fermentative, Kovacs oxidase tests, and hypersensitivity tests on tobacco leaves. Molecular analysis using 1418S and 1418A primers produced DNA bands with a size of 571 bp. Sequencing results on 6 isolate samples representing locations and rice variety showed a genetic similarity of 98-99% with standard *Burkholderia glumae* isolate that registered at GeneBank.

**Keyword** : *Burkholderia glumae*, panicle blight, Polymerase Chain Reaction, sequencing

## KATA PENGANTAR



### ***Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh***

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas Berkah, Rahmat dan Karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan Tesis ini. Tak lupa pula penulis kirimkan shalawat dan salam kepada suri tauladan kita Nabi Muhammad SAW semoga senantiasa tercurah. Aamiin.

Terselesainya Tesis ini tidak terlepas dari bantuan moril maupun material serta kerjasama dari berbagai pihak, oleh karena itu dari lubuk hati yang paling dalam penulis menyampaikan terima kasih yang tiada terhingga dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. Kedua Orang Tua tercinta, Ayahanda H. Dg. Manangkasi dan Ibunda Hj. St. Aminah yang telah memberikan doa, pengorbanan, cinta, dan kasih sayang kepada penulis yang tak ternilai harganya, sehingga penulis tetap semangat mewujudkan harapan yang dititipkan, semoga ketulusan hati dalam mendidik mendapat balasan pahala dan limpahan rahmat Allah SWT serta kepada kakak-kakakku atas arahan dan motivasinya dalam setiap langkah.
2. Bapak Prof. Dr. Agr. Sc. Ir. Baharuddin selaku Pembimbing I dan Dr. Ir. Untung Surapati T, M.Sc selaku Pembimbing II atas segala keikhlasan, kesabaran dan ketulusannya mengarahkan, memberikan bimbingan, bantuan, motivasi, dan saran kepada penulis mulai dari penyusunan rencana penelitian hingga penyusunan Tesis ini.
3. Ibu Dr.Ir. Melina, M.P. selaku penguji bersama Bapak Dr. Ir. Tamrin Abdullah, M.S., dan Ibu Prof. Dr. Ir. Nurariaty Agus, M.S. atas saran dan masukannya mulai dari Seminar Proposal hingga Ujian Akhir serta seluruh Bapak dan Ibu Dosen Pengajar yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat kepada penulis.
4. Ibu Prof. Dr. Ir Nur Amin, Dipl. Ing. Agr selaku Ketua Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan serta Ibu Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M.Sc selaku Ketua Jurusan Hama dan Penyakit

Tumbuhan atas saran, masukan dan motivasinya kepada penulis selama perkuliahan dan penelitian.

5. Para Pegawai dan Staf Laboratorium Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Bapak Kamaruddin, Bapak Ardan, Ibu Asriani Ahmad, Ibu Rahmatiah, SH., Ibu Nirwana Rahman, SE., Staf Laboratorium di Pusat Penelitian & Pengembangan Bioteknologi, Bapak Ahmad Yani, SP. M.P, dan Ibu Mustika, S.Si, M.Si., Staf Laboratorium Penelitian RS Unhas Bapak Zulkifli, S.Si, M.Kes, serta Ibu Damraeni, S.P., M.Si dari Laboratorium BBKP Makassar yang telah banyak membantu penulis sehingga bisa menyelesaikan penelitian ini.
6. Saudara-saudaraku Sri Sukmawati, S.P., M.P, Nur Hardina, S.P., M.Si., Rahma, S.P., M.Si., Fatmawati, S.P., M.Si., Nur Afni Andi Hasan, S.P., Dhia Rezki Amaliah, S.P., Iwe Cahyati, S.P., Nur Mujahidin, S.P., dan Jazman Chairul, S.P atas bantuan, saran, dan semangatnya kepada penulis, serta teman-teman seangkatan IHPT 2016 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu dan terkhusus kepada (alm) Arindra CK (IHPT 2016) terima kasih atas bantuan dan saran-sarannya selama kuliah hingga penelitian. Semoga Allah Subhanawataala memberikan tempat yang terbaik di sisi-Nya. Aamiin.

Banyak kendala yang dihadapi penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini, tetapi semua merupakan suatu proses pembelajaran yang sangat berguna sebagai modal di masa yang akan datang. Akhirnya dengan segala kerendahan hati penulis sekali lagi mengucapkan terima kasih semoga apa yang penulis sajikan dapat memberikan manfaat bagi pembaca, Aamiin.

***Wassalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh***

Makassar, Desember 2018

**Penulis**



## DAFTAR ISI

Halaman Judul .....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan dan Kegunaan .....	5
1.3 Rumusan Masalah.....	5
1.4 Hipotesis.....	5
1.5 Kerangka Konsep Penelitian.....	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	8
2.1 Penyakit Busuk Bulir Bakteri ( <i>Burkholderia glumae</i> ).....	8
2.1.1 Karakteristik <i>B. glumae</i> .....	11
2.1.2 Proses Infeksi dan Cara Bertahan Bakteri <i>B. glumae</i> .....	13
2.1.3 Faktor Virulensi.....	15
2.2 Teknik Identifikasi Molekuler <i>Burkholderia glumae</i> .....	20
BAB III. METODE PENELITIAN.....	26
3.1 Tempat dan Waktu .....	26
3.2 Metode Pelaksanaan .....	26
3.2.1 Pengambilan Sampel.....	26
3.2.2 Isolasi dan Identifikasi Isolat <i>B. glumae</i> .....	26
3.2.3 Karakterisasi Morfologi dan Fisiologi.....	27
3.3 Karakterisasi Molekuler <i>B. glumae</i> .....	31

2.3.1 Ekstraksi DNA.....	31
2.3.2 Amplifikasi dan Elektroforesis .....	31
2.3.3 Kajian Filogeni Isolat-Isolat <i>B. glumae</i> .....	32
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>34</b>
4.1 Hasil .....	34
4.1.1 Karakteristik Morfologi dan Fisiologi Bakteri Penyebab Busuk Bulir Padi.....	35
4.1.2 Karakteristik Molekuler Bakteri <i>B. glumae</i> .....	43
4.1.3 Kajian Filogeni Isolat-Isolat <i>B. glumae</i> .....	44
4.2 Pembahasan .....	48
4.2.1 Gejala Penyakit Busuk Bulir Padi.....	48
4.2.2 Karakter Morfologi <i>B. glumae</i> .....	50
4.2.3 Karakter Fisiologi <i>B. glumae</i> .....	51
4.2.4 Karakteristik Molekuler dan Filogenetik Isolat bakteri <i>B. glumae</i> .....	58
<b>BAB V. PENUTUP .....</b>	<b>60</b>
5.1 Kesimpulan.....	60
5.2 Saran.....	61
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>62</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>68</b>

## DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1	Komposisi reagen untuk proses PCR	31
2	Tipe strain Bakteri <i>B. glumae</i> yang terdaftar pada NCBI	33
3	Daftar Isolat-Isolat Bakteri yang telah diisolasi beserta Karakteristik Morfologinya	37
4	Karakteristik Fisiologi Isolat-Isolat Bakteri <i>B. glumae</i>	40
5	Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat <i>B. glumae</i> asal Kabupaten Maros (MrBtm2.2).	44
6	Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat <i>B. glumae</i> asal Kabupaten Pangkep (PKLB1).	45
7	Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat <i>B. glumae</i> asal Kabupaten Barru (BrMks2).	45
8	Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat <i>B. glumae</i> asal Kabupaten Bone (PPBS01).	46
9	Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat <i>B. glumae</i> asal Kabupaten Sidrap (SHB01).	46
10	Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat <i>B. glumae</i> asal Kabupaten Luwu (SK02K).	47

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1	Kerangka Konsep Penelitian	7
2	a) Gejala awal Penyakit Busuk Bulir Bakteri, b) malai tetap hijau selama infeksi awal, c <sub>1,2</sub> ) selubung lesi daun bendera	11
3	Bentuk morfologi dan pigmentasi <i>B. glumae</i> pada media a) King's B, b) CPG, c) bentuk koloni pada media S-PG	13
4	Plumula (daun embrio) bagian yang diinfeksi pada benih dan kenampakan bulir yang terinfeksi yang dilihat menggunakan mikroskop elektron.	15
5	Aktivitas Antifungal dari <i>B. glumae</i> terhadap Jamur <i>Rhizoctonia solani</i> setelah 48 jam inkubasi pada suhu 25°C	17
6	Karakterisasi dari koloni bakteri berdasarkan morfologi	27
7	Gejala Penyakit Busuk Bulir Padi di lapangan yang disebabkan oleh Bakteri <i>B. glumae</i> .	34
8	Isolat hasil isolasi dari sampel biji, Koloni <i>Burkholderia glumae</i> yang tumbuh pada media King's B: <b>a.</b> CHBL03 (warna koloni kuning), <b>b.</b> BrGKi2 (warna koloni putih kekuningan), <b>c.</b> CSB11 (warna koloni putih krem), <b>d.</b> CSB05K (warna koloni putih keabuan).	36

9	Karakter morfologi isolat-isolat bakteri yang pada umumnya berbentuk bulat, tepi halus, dan cembung.	36
10	Hasil Amplifikasi DNA bakteri menggunakan primer spesifik 1418S dan 1418A menunjukkan pita pada ukuran $\pm 571$ bp. Marker 100bp.	43
11	Amplifikasi DNA bakteri dengan menggunakan primer spesifik 1418S dan 1418A yang menghasilkan pada ukuran $\pm 571$ bp.	43
12	Hubungan kekerabatan Isolat <i>B. glumae</i> yang diuji.	47

## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1	Komposisi Media King's B	68
2	Komposisi Media Hugh and Leifson	68
3	Komposisi Media <i>Yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub></i> (YDC)	68
4	Komposisi media Arginin dehidrolase	69
5	Komposisi Media Gelatin Liquefaction	69
6	Isolat-Isolat Bakteri <i>B. glumae</i> yang telah diisolasi	70
7	Uji KOH 3% dan Katalase pada bakteri <i>B. glumae</i>	74
8	Uji Pigmen fluorescens pada bakteri <i>B. glumae</i>	74
9	Hasil uji Oksidase/Fermentasi pada bakteri <i>B. glumae</i>	75
10	Pembentukan Koloni Kuning pada Media YDC	75
11	Uji arginin dehidrolase untuk <i>B. glumae</i>	75
12	Hasil uji oksidase kovaks untuk <i>B. glumae</i>	76
13	Hasil Uji Hipersensitif pada bakteri <i>B. glumae</i>	76
14	Hasil Uji Hipersensitif pada bakteri <i>B. glumae</i>	76

# **BAB I. PENDAHULUAN**

## **1.1 Latar Belakang**

Padi (*Oryza sativa*) merupakan tanaman pangan yang sangat penting karena beras masih digunakan sebagai makanan pokok bagi sebagian besar penduduk dunia termasuk di Indonesia. Padi merupakan komoditas strategis di Indonesia karena mempunyai pengaruh yang besar terhadap kestabilan ekonomi dan politik (Purnamaningsih, 2006). Upaya peningkatan produksi beras nasional melalui efisiensi produksi saat ini menjadi alternatif yang penting, mengingat alternatif melalui jalur ekstensifikasi melalui perluasan areal tampaknya semakin sulit ditempuh.

Produksi padi nasional di Indonesia pada tahun 2016 mencapai 79.355 juta ton, dengan luas panen 15.156 juta Ha dan produktivitas 52,36 Ku/Ha. Dibanding Tahun 2015, terjadi peningkatan produksi 5,24 persen, luas panen sebesar 7,35 persen tetapi produktivitas mengalami penurunan 1,96 persen (BPS, 2017). Di Provinsi Sulawesi Selatan, berdasarkan Angka Ramalan II (Aram II), produksi gabah kering giling (GKG) pada tahun 2017 diperkirakan 6.016 juta ton, meningkat 5,05 persen dari tahun sebelumnya (BPS Sulsel, 2017).

Peningkatan produksi padi yang terus dilakukan pemerintah tidak serta merta berjalan lancar dan bebas dari berbagai kendala. Salah satu kendala yang dihadapi adalah serangan hama dan penyakit tanaman. Akhir-akhir ini di Indonesia terdapat jenis penyakit baru yang disebabkan

oleh bakteri *Burkholderia glumae* yang menyebabkan penyakit Busuk Bulir Bakteri atau disebut Bacterial Grain Rot. *B. glumae* termasuk OPTK A2 Golongan 1 yang berarti OPTK tersebut telah dilaporkan keberadaannya di Indonesia namun hanya terbatas pada daerah tertentu dan tidak dapat dibebaskan dari media pembawa serta sedang dilakukan tindakan pengendalian (Baharuddin *et al.*, 2017).

Penyakit busuk bulir pada tanaman padi pertama kali dilaporkan di Jepang pada tahun 1950 dan sejak saat itu menjadi salah satu penyakit penting pada tanaman padi di dunia (Zhou-qi *et al.*, 2016). *B. glumae* yang merupakan salah satu bakteri patogen tular benih yang paling parah di banyak daerah penghasil beras. Di Indonesia sendiri, keberadaan penyakit ini sudah pernah ada sejak tahun 1987 seperti yang disampaikan dalam *press release* Kementerian Pertanian, namun setelah itu belum dilaporkan kembali adanya kerusakan yang parah akibat penyakit ini hingga kemudian keberadaan penyakit ini mulai dilaporkan kembali sejak tahun 2015 di beberapa wilayah di Indonesia. termasuk di Sulawesi Selatan, Indonesia. Kehilangan hasil mulai 15% yang umum terjadi hingga kerugian mencapai 80% yang telah tercatat dan merupakan infeksi terparah (Fang *et al.*, 2009). Berdasarkan Permentan No. 51 Tahun 2015, diketahui *B. glumae* telah ditemukan pada pertanaman padi di pulau Jawa, Sumatera, dan Kalimantan. Hasil pemantauan Balai Besar Karantina Pertanian (BBKP) Makassar sejak tahun 2016, *B. glumae* telah menyebar pada Sembilan kabupaten di Sulawesi Selatan antara lain



Gowa, Takalar, Jeneponto, Bulukumba, Sinjai, Bone, Maros, Pangkep, dan Selayar. Menurut Wamishe (2014), gejala penyakit ini lebih sering ditemukan pada bulir padi, sehingga lebih dikenal dengan nama busuk bulir (*grain rot*) di beberapa wilayah Asia.

Gejala Penyakit busuk bulir seperti lesi kecil (1 sampai 5 mm) dengan margin coklat pada daun dan bulir, sehingga bulir yang terinfeksi menjadi hampa sebelum terisi penuh sehingga malai sering tetap tegak karena kehilangan berat bulir, rachis malai tetap hijau, margin coklat kemerahan bisa terbentuk pada selubung daun bendera individu dari anakan yang terinfeksi (Sayler *et al.*, 2006). Dalam kondisi lingkungan yang sesuai, wabah penyakit BGR dapat menyebar dan meningkat sangat pesat.

*B. glumae* perlu diwaspadai mengingat bakteri ini masih relatif sulit dikendalikan karena menyerang tanaman pada fase generatif dan juga patogennya yang beragam serta memiliki sifat genetik yang mudah mengalami mutasi. Lebih dari 400 strain dari *B. glumae* telah diidentifikasi di daerah produksi padi di Amerika Serikat. Beberapa strain virulen tinggi dapat menyebabkan penurunan hasil 50% sampai 75%. Karki *et al.* (2012) melaporkan bahwa strain avirulen diisolasi dari biji-bijian padi yang terinfeksi di malai dan selubung lesi tidak menghasilkan toxoflavin dan tidak menginduksi gejala yang jelas atau penurunan hasil yang signifikan. Namun, dapat menghasilkan senyawa antijamur terhadap beberapa jamur, seperti *Magnaporthe grisea* dan *Rhizoctonia solani*. *B. glumae*

dapat bersama menyerang dengan bakteri patogen lainnya (seperti *B. gladioli*) pada jaringan yang sama pada padi.

Identifikasi akhir *B. glumae* harus dikonfirmasi dengan dua atau lebih metode identifikasi untuk memastikan bahwa bakteri telah diidentifikasi secara akurat (Nandakumar *et al.*, 2009). Banyak metode biokimia, fisiologis, dan patologis telah digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi bakteri patogen tanaman (Schaad *et al.*, 2001). Metode ini tidak untuk mengidentifikasi patogen pada tanaman secara langsung tapi membutuhkan kultur murni. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk deteksi bakteri patogen adalah dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Salah satu faktor penting yang mempengaruhi kualitas deteksi molekuler berbasis PCR ialah pemilihan primer yang tepat (Rychlic, 1995). Primer PCR merupakan oligonukleotida yang berperan sebagai inisiasi amplifikasi molekul DNA. Keberadaan primer PCR tersebut, maka gen target akan teramplifikasi sepanjang reaksi PCR berlangsung. Pengurutan DNA adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuens-nya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui.

Berdasarkan uraian tersebut maka perlu dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi dan mengetahui keragaman genetik dari isolat *B. glumae* yang menyerang tanaman Padi.

## **1.2 Tujuan dan Kegunaan**

Penelitian ini ditujukan untuk mengidentifikasi secara morfologi, fisiologi maupun molekuler isolat-isolat bakteri penyebab penyakit busuk bulir yang diperoleh dari beberapa lokasi pertanaman padi di Sulawesi Selatan.

Kegunaan dari penelitian ini yaitu diharapkan dapat menjadi sebuah acuan atau rujukan untuk mengidentifikasi *B. glumae*, baik secara Morfologi, Fisiologi, maupun Molekuler.

## **1.3 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana Karakter Morfologi dan Fisiologi Bakteri Penyebab Busuk Bulir Padi?
2. Bagaimana Karakter Molekuler Bakteri Penyebab Busuk Bulir Padi?
3. Bagaimana Hubungan Kekerbatan dari Isolat-Isolat Bakteri *B. glumae* berdasarkan hasil sekuensing?

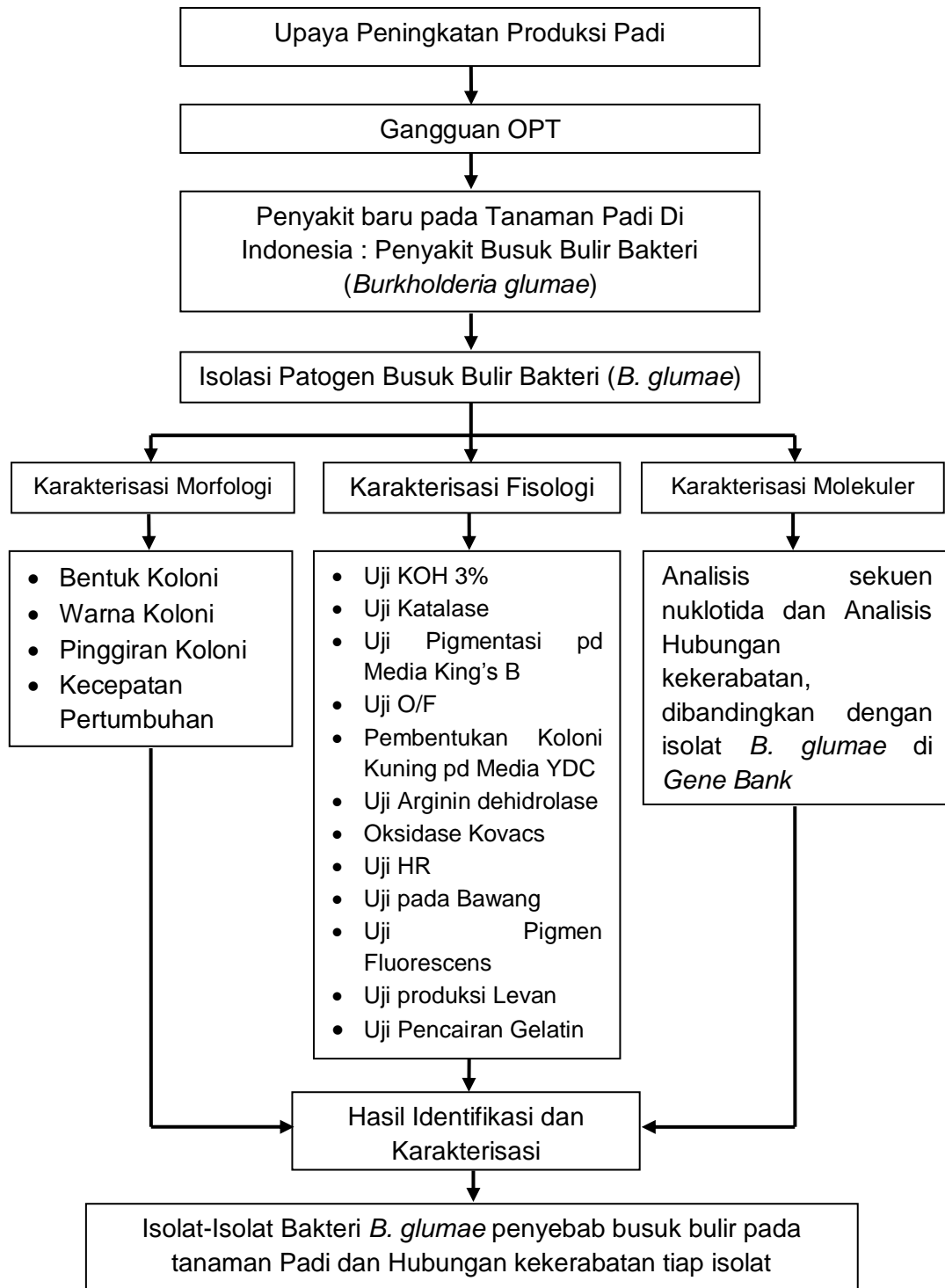
## **1.4 Hipotesis**

1. Terdapat persamaan dan perbedaan karakteristik dilihat dari karakter morfologi dan fisiologi dari isolat-isolat bakteri penyebab busuk bulir padi yang diperoleh dari beberapa daerah.

2. Terdapat hubungan kekerabatan antara isolat-isolat bakteri *B. glumae* berdasarkan hasil sekuensing.

## 1.5 Kerangka Konsep Penelitian

Secara skematis kerangka konsep penelitian yang akan dilakukan yaitu sebagai berikut :



Gambar 1 . Kerangka Konsep Penelitian

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Penyakit Busuk Bulir Bakteri (*Burkholderia glumae*)

Busuk Bulir pada Padi merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Burkholderia glumae* yang pertama kali dilaporkan di Kyusu oleh Goto dan Ohata (1956) sebagai patogen penting pada padi di Jepang. Namun telah menjadi penyakit utama di berbagai negara seperti USA bagian Selatan, Kolombia, Panama dan Venezuela. Selain penyakit busuk bulir (Grain Rot), bakteri ini juga dapat menyebabkan penyakit lain seperti busuk pelepah (*sheath rot*) dan busuk bibit (*seedling rot*) (Ham *et al.*, 2011), atau seringkali juga disebut sebagai hawar malai (*panicle blight*) (Nandakumar *et al.*, 2009).

Penyakit BGR menyebabkan kehilangan hasil hingga lebih dari 40% pada pertanaman padi di Panama tahun 2005, sedang di USA menyebabkan penurunan hasil 50% sampai 75%. Selain di Jepang, penyakit ini juga menjadi masalah yang serius di negara-negara produsen padi di Asia seperti Korea, Taiwan, Cina, Vietnam, dan Philippina (Cottyn *et al.*, 1996). Sedangkan di Indonesia hingga tahun 2016, belum ditemukan laporan tentang keberadaan yang serius tentang penyakit BGR di lapang, walau beberapa artikel luar negeri telah melaporkan keberadaan penyakit BGR di Indonesia (Tshushima, 1996). Walau telah ditetapkan sebagai OPTK A2 Golongan 1, namun belum ada data yang kongkrit tentang tingkat serangan dan dampak dari penyakit tersebut

terhadap produksi karena sering disalahtafsirkan dengan keberadaan OPT lainnya seperti: Penggerek batang, Walang sangit dan busuk leher. Apabila tidak dilakukan pengamatan lebih seksama, maka penyakit ini akan sangat merugikan dan sulit untuk dikendalikan. Konsekuensi agronomi langsung peristiwa semacam itu dengan penurunan berat pada hasil panen dan stabilitas produksi. BGR merupakan masalah penyakit yang tidak hanya karena menyebabkan kerusakan ekonomi tapi juga karena metode pengendalian efektif yang belum ditemukan (Karki *et al.*, 2012).

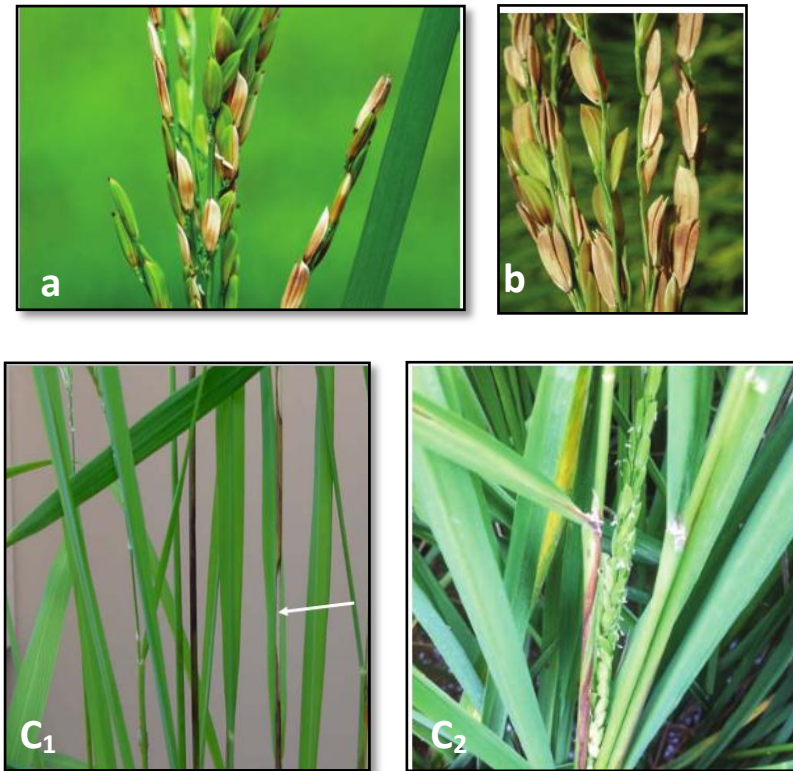
Penyakit bakteri padi ini relatif sulit dikendalikan karena patogen yang beragam dan sifat genetiknya mudah mengalami mutasi, terutama virulensinya terhadap varietas padi. *B. glumae* diketahui menghasilkan toxoflavin fitoksin, yang penting untuk virulensinya. Strain yang kekurangan produksi toksin menjadi avirulen (Ura *et al.*, 1996 dan Sato *et al.*, 1989). Saat ini teknik baku untuk peramalan penyakit bakteri, khususnya untuk daerah tropik, belum tersedia sehingga penentuan saat pengendalian yang tepat juga belum dapat dilakukan. Pengendalian utama penyakit padi yang disebabkan oleh bakteri adalah dengan penggunaan benih bebas patogen, praktik budidaya yang tepat, dan kultivar yang tahan. Cara atau teknik pengendalian tersebut mempunyai beberapa kelebihan antara lain murah, mudah dan aman (Sinaga, 2002).

Penyakit ini telah menjadi masalah sporadis penting di area produksi padi. Penyakit yang agak mirip disebut "ear blight", Pecky rice,

atau perubahan pada warna bulir kemudian dikaitkan dengan agen kausal jamur. Masalah ini ditandai dengan perubahan warna dari bulir dan cabang malai, biasanya dengan lesi yang berbeda (Ou, 1985; Lee, 1992).

Gejala yang ditimbulkan termasuk kecil yakni 1 sampai 5 mm lesi/tanaman dengan margin coklat pada daun dan bulir, mengakibatkan aborsi dari kernel yang terinfeksi sebelum mengisi lengkap. Bakteri cepat menggandakan pada permukaan malai dan menginfeksi bunga hanya setelah munculnya (Miller *et al.*, 2009). Bunga yang terinfeksi menunjukkan basis abu-abu atau coklat gelap, tetapi rachis dari malai tetap hijau. Sebuah selubung lesi menonjol dengan panjang beberapa sentimeter dengan pusat dan margin coklat kemerahan bisa terbentuk pada selubung daun bendera individu anakan yang terinfeksi. Malai sering tetap tegak, karena kehilangan berat bulir padi, dan tidak merunduk. Shahjahan *et al.* (2000) melaporkan bahwa perubahan warna bulir dan batang hijau merupakan karakteristik diagnostik BGR yang paling penting.





Gambar 2. a) Gejala awal Penyakit Busuk Bulir Bakteri, b) malai tetap hijau selama infeksi awal, c<sub>1,2</sub>) selubung lesi pada daun bendera (Sumber : Wamische *et al.*, 2015).

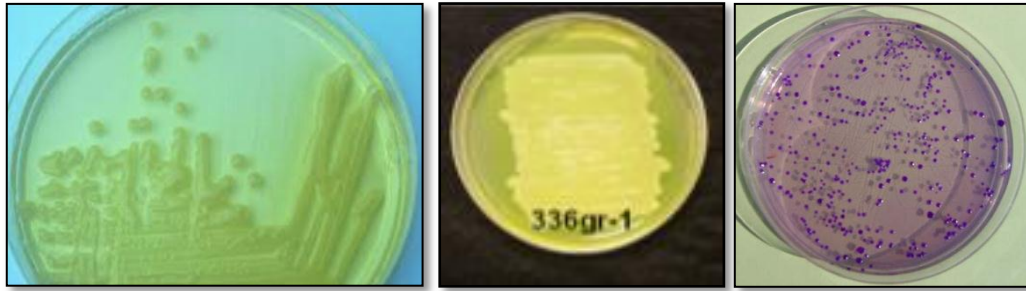
### 2.1.1 Karakteristik *B. glumae*

Pada tahun 1967, Kurita pertama kali memberi nama bakteri patogen yang menyebabkan busuk bulir beras sebagai *Pseudomonas glumae*. Sejak tahun 1992, berdasarkan urutan 16S rRNA, DNA-DNA homologi, lipid seluler dan komposisi asam lemak, dan karakteristik fenotipik, bakteri nonfluorescent pada *Pseudomonas* yang diklasifikasikan sebagai genus *Burkholderia* dan lain-lain. Oleh karena itu, *Pseudomonas glumae* diganti sebagai *Burkholderia glumae* pada tahun 1992 (Yabuuchi *et al.*, 1992).

Klasifikasi dari *B. glumae* menurut Kurita and Tabei (1967) dan Urakami *et al.* 1994.

Kingdom : Bacteria  
Filum : Proteobacteria  
Kelas : Beta Proteobacteria  
Ordo : Burkholderiales  
Famili : Burkholderiaceae  
Genus : Burkholderia  
Spesies : *Burkholderia glumae*

*B. glumae* merupakan bakteri gram negatif, tidak memiliki fluorescent, berbentuk batang, dengan 1-3 flagela polar, dan berukuran 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  (Cho *et al.*, 2007). *B. glumae* memproduksi pigmen kuning-hijau yang larut dalam air di beberapa media. Koloni putih keabu-abuan atau kuning karena pigmen. Suhu pertumbuhan optimum adalah sekitar 30° C, tetapi dapat tumbuh bahkan pada 41° C (Saddler, 1994). Menurut Schaad *et al.* (2001), koloni *B. glumae* memiliki karakteristik yang khas bila ditumbuhkan pada media agar, yaitu bersifat *difussible non fluorescent*. Warna koloni dengan pigmen kuning kehijauan yang *diffusible*, mirip dengan koloni *Pseudomonas fluorescens*. Namun, pada koloni *P. fluorescens* yang ditumbuhkan pada media King's B akan menghasilkan warna berpendar (fluoresens) bila diamati di bawah sinar ultraviolet, sedangkan pada koloni *B. glumae* tidak menghasilkan pendar.



Gambar 3. Bentuk morfologi dan pigmentasi *B. glumae* pada media a) King's B, b) CPG, c) bentuk koloni pada media S-PG (Sumber : Groth, 2010; Karki *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2004)

### 2.1.2 Proses Infeksi dan Cara Bertahan Bakteri *B. glumae*

Suhu pertumbuhan optimum untuk *B. glumae* berkisar 30°C, namun dapat tumbuh hingga 41°C (Saddler, 1994) serta berkembang biak dalam ruang interseluler dari parenkim selama perkecambahan biji (Zhu *et al.*, 2010). *B. glumae* lebih menyukai kondisi malam yang hangat dengan kelembaban yg tinggi (Cha *et al.*, 2001). Perkembangbiakan bakteri ini di dalam plumula menghasilkan toksin toxoflavin yang menyebabkan terjadinya pembusukan pada bibit padi.

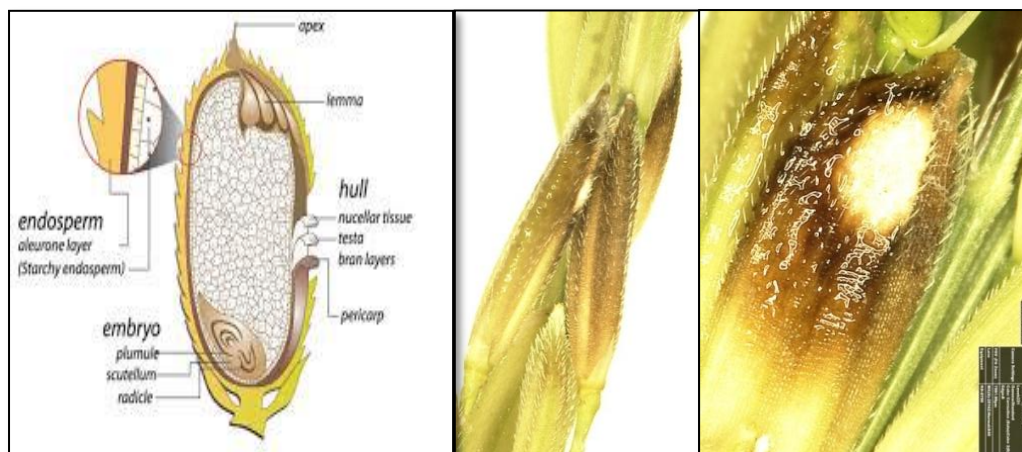
Bakteri patogen tanaman selalu ada di ekosistem tanaman dan biasanya ditemukan di udara, tanah, dan air. distribusi tanah patogen ini dipengaruhi oleh jenis tanah, nilai pH, budidaya tanaman, dan kondisi cuaca. Telah ditetapkan bahwa bakteri patogen ada pada filoplan tanaman padi selama musim tanam (Matsuda dan Sato, 1987) atau dalam biji padi yang disimpan pada suhu kamar selama musim dingin (Tsushima *et al.*, 1989), pada gulma di lapangan dan di jaringan padi dari tanaman yang sebelumnya terkubur dalam tanah (Sogou dan Tsuzaki, 1983). Penyakit ini dapat berkembang dari inokulum dalam biji terinfeksi dari

tahun sebelumnya, di dalam tanah, dan gulma di lapangan. Dalam proses infeksi, kerentanan inang, kepadatan inokulum, dan faktor iklim memainkan peran kunci (Tsushima, 1996). Tingkat infeksi patogen juga tergantung pada kepadatan inokulum. Infeksi meningkat secara proporsional seiring dengan volume lognormal kepadatan inokulum (Tsushima *et al.*, 1985). Berdasarkan percobaan,  $10^2$  sampai  $10^4$  cfu diusulkan sebagai kepadatan inokulum minimum saat penyemprotan di lapangan dan tidak kurang dari 1 cfu/ml adalah dosis yang sesuai untuk metode injeksi (Hikichi *et al.*, 1994). Benih yang terinfeksi adalah sumber utama inokulum, dan infeksi sekunder terjadi pada tahap pembungaan di bawah suhu tinggi dan tingkat kelembaban. Dalam kondisi lingkungan yang sesuai, wabah BGR dapat menyebar dan meningkat pesat. Luo *et al.* (2003) menemukan bahwa *B. glumae* dapat menyebabkan kehampaan pada gabah dan perubahan warna bulir. *B. glumae* juga telah ditemukan untuk bertanggung jawab atas penurunan berat gabah, pembungaan steril, penghambatan perkecambahan biji dan rebah di bibit padi (Jeong *et al.*, 2003).

Pada tahun 1995 dan 1998 ada insiden BGR di Louisiana serta daerah produksi padi di Southern lainnya. Rekor suhu tinggi dicatat selama musim ini, dengan suhu tinggi. tingkat kelembaban yang tinggi pada tahap berbunga dilaporkan menjadi sangat konduktif untuk infeksi gabah padi (Tsushima *et al.*, 1995). Periode paling rentan untuk infeksi pada saat muncul malai dan tahap pembungaan. Inokulasi selama

berbunga memberikan tingkat infeksi tertinggi floret dan produksi bulir yang sakit (Shahjahan *et al.*, 1998).

Patogen ini menginfeksi benih dan menyerang lemma dan paleae melalui stomata dan luka, dan berproliferasi dalam ruang-ruang antarparenkim selama perkecambahan biji (Zhu *et al.*, 2010). Keberadaan sel-sel patogen pada seludang daun bendera memainkan peran penting dalam infeksi awal dan merupakan sumber utama munculnya inokulum di malai (Tsushima *et al.*, 1996; Tabei *et al.*, 1995).



Gambar 4. Plumula (daun embrio) bagian yang diinfeksi pada benih dan kenampakan bulir yang terinfeksi yang dilihat menggunakan mikroskop elektron.

### 2.1.3 Faktor Virulensi

Patogenesis *B. glumae* adalah proses yang kompleks yang melibatkan beberapa faktor virulen. Studi genetika molekuler yang dilakukan oleh beberapa kelompok penelitian telah mengidentifikasi faktor-faktor penentu utama patogen *B. glumae*. Di antaranya, faktor yang paling penting adalah fitotoksin dan lipase.

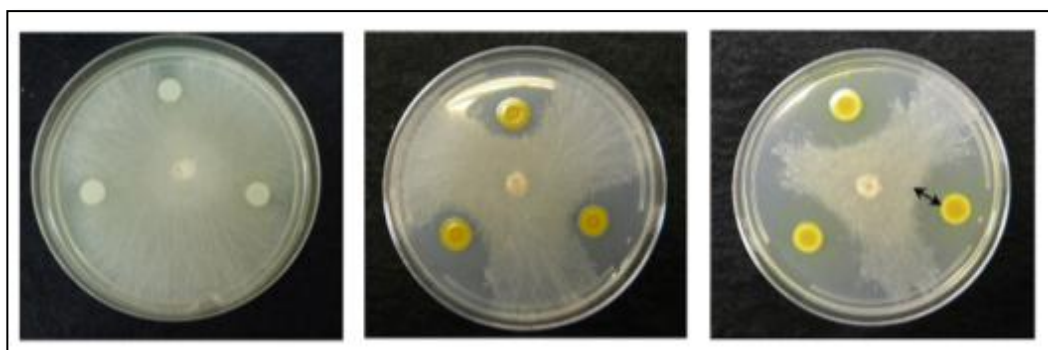
Faktor virulen tambahan yang dikenal berkontribusi pada virulensi pada *B. glumae* termasuk PehA dan PehB polygalacturonases (Degrassi *et al.*, 2008), katG katalase (Chun *et al.*, 2009) dan sistem sekresi Hrp tipe III (Hrp-T3SS) (Kang *et al.*, 2008). *Endopolygalacturonase* dan *exopolysaccharides* juga kandidat yang baik yang mungkin memiliki peran dalam patogenesis *B. glumae* (Jeong *et al.*, 2003).

- **Fitotoksin**

Fitotoksin paling penting yang dihasilkan oleh *B. glumae* adalah pigmen kuning cerah toxoflavin dan fervenulin yang isomerides (Kim *et al.*, 2004). Sampai saat ini, sebagian besar penelitian berfokus pada toxoflavin. Produksi toxoflavin tergantung pada suhu pertumbuhan dan mencapai tingkat maksimal pada suhu 37°C, dan tidak ada terdeteksi toxoflavin pada suhu 25°C hingga 28°C (Matsuda dan Sato, 1987). Toxoflavin dan fervenulin penting untuk patogenesis busuk bibit padi dan gandum yang mengakibatkan berkurangnya pertumbuhan daun dan akar pada bibit padi, dan juga menyebabkan gejala klorosis pada malai padi (Jeong *et al.*, 2003).

Jung *et al.* (2013) melaporkan bahwa toxoflavin dihasilkan oleh *B. glumae* tidak hanya bertanggung jawab untuk patogenesis BPB, tetapi juga dapat digunakan untuk mengendalikan beberapa penyakit jamur pada padi, seperti yang disebabkan oleh *Fusarium graminearum*. Selain itu, beberapa pigmen yang unik yang dihasilkan oleh *B. glumae* juga memiliki kapasitas menghambat pertumbuhan beberapa jamur patogen,

seperti *Collectotrichum orbiculare*, *Magnaporthe grisea*, dan *Rhizoctonia solani* karena dapat menghasilkan senyawa fungitoxic (Karki *et al.*, 2012), atau dapat bertindak sebagai pengambil oksigen reaktif yang dihasilkan dari oksidasi tanggapan sel inang (Zughaier *et al.*, 1999). Diketahui *B. glumae* dapat bersama menyerang dengan bakteri patogen lainnya (seperti *B. gladioli*) pada jaringan yang sama pada tanaman padi.



Gambar 5. Aktivitas Antifungal dari *B. glumae* terhadap Jamur *Rhizoctonia solani* setelah 48 jam inkubasi pada suhu 25<sup>0</sup>C (Sumber : Karki *et al.*, 2012)

Baru-baru ini, enzim yang berkaitan dengan biosintesis pigmen yang unik telah dilaporkan. Mereka terlibat dalam pertumbuhan, ketahanan UV dan virulensi *B. glumae* (Karki dan Ham, 2014). Penelitian ini telah memberikan beberapa petunjuk untuk mengambil keuntungan dari *B. glumae* sebagai agen yang berguna untuk kontrol biologis.

- **Lipase**

Lipase memiliki kapasitas tinggi untuk menghidrolisis berbagai trigliserida dan mensintesis *acylglycerol ester*. Lipase mikroba penting karena mereka unggul dalam sifat enzimatik, stabilitas, selektivitas dan spesifisitas substrat. Selama dekade terakhir, lipase yang dihasilkan oleh

*B. glumae* PG1 yang ditemukan untuk menjadi unggul dalam meningkatkan detergensi secara keseluruhan dan telah menjadi subyek penelitian yang paling intens. Urutan genom lengkap *B. glumae* PG1 telah dilaporkan (Voget *et al.*, 2015).

Lipase juga telah dilaporkan terlibat dalam patogenisitas *B. glumae*. Lipase virulen relatif yang paling penting adalah LipA, yang merupakan ekstraseluler lipase aktif (Frenken *et al.*, 1993). Lipase lain yang penting adalah LipB, yang terlibat dalam biosintesis LipA dan penting untuk memperoleh LipA aktif, dan memiliki pengaruh besar pada stabilitas protein untuk degradasi proteolitik (Frenken *et al.*, 1993; El Khattabi *et al.*, 2000). Ca<sup>2+</sup> berperan struktural aktif dalam menstabilkan lipase dari *B. glumae* dalam kondisi yang merugikan (Devescovi *et al.*, 2007).

- **Faktor virulensi lainnya**

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa toxoflavin dan lipase tidak cukup untuk menyebabkan busuk pada gandum. Sistem motilitas flagellar, sistem sekresi, dan QS pada bakteri tampaknya diperlukan untuk secara efisien menginfeksi jaringan tanaman. Gerakan didorong oleh flagella penting bagi bakteri patogen. Hal ini memungkinkan untuk tiba di lokasi infeksi pada inang potensial dan mendapatkan keuntungan selektif signifikan selama fase pembentukan awal infeksi (Davey dan O'Toole, 2000). Selain itu, fungsi flagellar yang terkoordinasi diatur dalam menanggapi faktor lingkungan tertentu (seperti QS, suhu, osmolaritas dan pH) dan protein regulasi global (seperti H-NS dan kompleks cAMP-CAP)



(Kim *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2014). Jenis sistem sekresi III (T3SS) memainkan peran sentral dalam virulensi patogen bakteri gram-negatif, tapi fungsi dan mekanisme yang mendasari T3SS di *B. glumae* kurang ditandai. Sebuah studi proteomik *B. glumae* telah mengungkapkan bahwa *B. glumae* T3SS tercakup dari 34 protein yang terakumulasi tergantung HrpB. Sebagian besar protein ini disekresi melalui tipe II sistem sekresi protein (T2SS) (Kang *et al.*, 2008). Kurang virulensi di T3SS kekurangan *B. glumae* mutan menunjukkan bahwa efektor dari T3SS diperlukan untuk *B. glumae* virulensi, dan bahkan tidak satupun yang telah dilaporkan pada *B. glumae*.

QS mungkin faktor lingkungan yang paling penting bagi *B. glumae* karena berbagai proses biologis bakteri dapat berada di bawah kendali regulon QS, khususnya sistem yang terlibat dalam produksi metabolit sekunder, virulensi, dan simbiosis. Biosintesis toxoflavin, produksi lipase dan sekresi, serta motilitas bakteri semuanya dikontrol oleh sistem QS (Devescovi *et al.*, 2007; Goo *et al.*, 2015). Hanya satu sistem QS yang ada pada *B. glumae*, dan terdiri dari LuxI-family acyl-homoserine lakton synthase (TofI), dan LuxR-family acyl-homoserine lakton reseptor TofR (Kim *et al.*, 2004).

An *et al.* (2014) menemukan bahwa QS dapat mengatur penurunan penyerapan glukosa, tingkat substrat, fosforilasi oksidatif dan biosintesis *denovo* nukleotida pada *B. glumae*, dan dapat berfungsi untuk memodulasi dan mengkoordinasikan pemanfaatan nutrisi dan

metabolisme utama homeostatis sel individual. Namun, QS hanyalah salah satu komponen dari hirarki peraturan yang sangat rumit yang memungkinkan bakteri untuk titrasi dan menanggapi sinyal eksternal. Tantangan saat ini adalah untuk menentukan posisi yang QS menempati dalam hirarki peraturan global dan untuk menjelaskan fungsi fisiologis dan evolusi yang benar.

Tipe III sistem sekresi pada *B. glumae* juga memiliki peran yang cukup besar dalam mekanisme patogenisitas. Protein efektor yang disekresikan melalui system ini dibutuhkan untuk menyebabkan virulensi pada *B. glumae*. Mutasi pada tipe III sistem sekresi menghasilkan fenotipe yang memiliki virulensi yang sangat rendah dibandingkan tetuanya (Kang *et al.*, 2008). Faktor virulensi yang lain yang berpotensi ikut berkontribusi dalam patogenisitas *B. glumae* adalah produksi ekstrapolisakarida (EPS) dan enzim poligalakturonase. EPS telah dibuktikan oleh Jeong *et al.* (2003) sebagai penyebab utama layu yang disebabkan oleh *B. glumae* pada tanaman cabai, tomat, terung, dan wijen. (Springman *et al.*, 2009).

## **2.2 Teknik Identifikasi Molekuler *Burkholderia glumae***

Evaluasi efektivitas berbagai metode penting untuk memilih kombinasi metode yang tepat untuk mengenali patogen. Sebuah skema identifikasi yang baik tidak hanya tergantung pada pengembangan tingkat penyelesaian yang memuaskan dari suatu metode, tetapi juga pada kelompok bakteri yang diteliti (Welch, 1991). Sulit untuk membedakan patogen yang erat terkait fisiologis dan taksonomi dengan gejala yang

mereka hasilkan dan pertumbuhannya pada media selektif. Sebuah media semi-selektif SP-G untuk *B. glumae* dikembangkan oleh Tsushima *et al.* (1986).

Identifikasi bakteri *B. glumae* berdasarkan morfologi koloni atau gejala penyakit tergolong sulit untuk membedakan spesies antara *Burkholderia* spp. Deteksi cepat dan identifikasi akurat dari patogen adalah langkah-langkah penting untuk mencegah patogen. Metode biokimia dan molekuler masih memiliki keuntungan yang kuat. Karakteristik biokimia Bakteri *B. glumae* memberikan hasil tes positif pada uji KOH, Pencairan gelatin, produksi levan dan pereduksi nitrat, sedangkan hasil tes negatif pada pengujian hidrolisis pati, reaksi oksidase, dan arginin dihidrolase (Cottyn *et al.*, 1996).

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan sekuen nukleotida tertentu secara *in vitro* menggunakan mesin PCR. Metode ini sekarang banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik karena metode tersebut sangat sensitif. Pada awalnya hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA tetapi sekarang digunakan pula untuk melipatgandakan molekul mRNA (Yuwono, 2006). Komponen utama dalam PCR adalah (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) *primer* oligonukleotida, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP),

terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4) enzim DNA polimerase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang penting yaitu senyawa bufer. Reaksi PCR dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan (suhu tinggi sekitar 95°C, waktu 1-2 menit, sehingga DNA rantai ganda terpisah menjadi rantai tunggal. Kemudian suhu diturunkan (sekitar 55°C) untuk penempelan *primer* (*annealing*) pada DNA cetakan rantai tunggal. *Primer* akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan pada sekuen yang komplementer dengan sekuen *primer*. Setelah itu suhu dinaikkan menjadi sekitar 72°C untuk proses polimerasi (pemanjangan rantai DNA yang akan digandakan). Setelah proses pemanjangan selesai, DNA akan didenaturasi lagi pada suhu tinggi (95°C). Proses tersebut diulangi lagi hingga 25-30 siklus sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul-molekul DNA rantai ganda baru yang sudah berlipatganda. Analisis sidik jari DNA dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya menggunakan metode PCR. Sidik jari DNA dengan metode PCR lebih mudah dilakukan karena tidak memerlukan enzim restriksi, tidak memerlukan hibridisasi dengan suatu pelacak tertentu, tidak memerlukan pemindahan fragmen-fragmen DNA dari gel ke suatu membran, dan dapat dilakukan terhadap sampel DNA dalam jumlah sedikit (Yuwono, 2006).

Saat ini dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA (*16S ribosomal Ribonucleic*

*acid*/Asam ribonukleat pengkode ribosom 16S, S menyatakan *Svedberg*, yaitu satuan ukuran ribosom). Sekuens DNA terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan primer *reverse* dan *forward* dan umumnya disebut sebagai sekuens konsensus (*consensus sequence*). Sekuens konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuens yang tersedia di database menggunakan software tertentu. Beberapa sistem dapat menentukan urutan nukleotida melalui pembacaan satu primer, namun pembacaan dengan dua primer memberikan hasil yang lebih akurat. Beberapa database yang dapat digunakan untuk membandingkan sekuens 16S rRNA antara lain GeneBank.

Gen 16S rRNA juga sering disebut sebagai 16S rDNA (16S *ribosomal deoxyribose nucleatic acid*), namun menurut konsensus dari *American Society for Microbiology* (ASM), istilah 16S rRNA dinilai lebih tepat. Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) adalah gen yang paling lestari (*conserved*). Porsi sekuens rDNA dari tiap organisme yang secara genetic berkorelasi umumnya adalah sama. Dengan demikian setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuens yang menjadi ciri khas organism tersebut. Daerah yang lestari ini juga yang menyebabkan gen ini dapat digunakan sebagai primer universal yang digunakan dalam PCR serta dapat ditentukan urutan nukleotidanya melalui sekuensing. Gen pengkode rRNA digunakan untuk menentukan

taksonomi, filogeni (hubungan evolusi) serta memperkirakan jarak keragaman antar spesies (*rates of species divergence*) bakteri.

Ribuan sekuens dari berbagai isolat klinis dan dari lingkungan telah terkumpul di satu database yaitu *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) serta Ribosomal Database Project. Database ini juga menyediakan aplikasi yang dapat digunakan untuk membandingkan sekuens yang diperoleh dengan sekuens yang telah terdaftar di database tersebut.

Sebuah penelitian memilih *B. glumae* dipilih untuk disekuensing seluruh genomnya karena tiga alasan utama. Pertama, bakteri penyebab busuk bulir menjadi lebih umum di sebagian besar negara-negara berkembang padi, termasuk Cina, Jepang, Vietnam, Filipina, dan India. Kedua, kami merasa bahwa ini adalah model pathosystem yang baik untuk memahami bagaimana bakteri patogen tanaman menginfeksi malai padi dan bunga. Akhirnya, karena spesies Burkholderia memiliki relung ekologi yang luas dan secara genetik sangat beragam, ada baiknya untuk menambahkan lebih banyak informasi genom ke genus ini (Kang *et al.*, 2008).

Keragaman genetika yang tinggi pada *B. glumae* ini menurut Seo *et al.* (2015) terjadi karena adanya penyesuaian genom (*genome rearrangement*) yang sangat cepat atau karena terjadi delesi sebagai tanggapan terhadap inangnya. Menurut Lee *et al.* (2015), berdasarkan perbandingan ukuran genom dari tiga strain *B. glumae* yang telah

dianalisis sekuen genomnya, strain LMG 2196 memiliki ukuran yang lebih kecil 1 MB dibandingkan strain BGR1 dan PG1 sehingga memungkinkan strain LMG 2196 dapat bereproduksi lebih cepat dibandingkan dua strain lainnya. Selain itu perbedaan virulensi juga tergantung dari ada tidaknya plasmid yang dimiliki oleh strain *B. glumae*. Sebagai contoh strain BGR1 memiliki dua kromosom dan empat plasmid (7.2 MB), strain PG1 hanya memiliki dua kromosom tanpa plasmid (7.8 MB), dan strain LMG 2169 memiliki dua kromosom dan dua plasmid (6.8 MB).

## **BAB III. METODE PENELITIAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pusat Kegiatan Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi Universitas Hasanuddin, Laboratorium Penelitian Rumah Sakit Universitas Hasanuddin, Laboratorium Balai Besar Karantina Pertanian Makassar, serta di Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar yang berlangsung pada bulan Agustus 2017 sampai Oktober 2018.

### **2.2 Metode Pelaksanaan**

#### **3.2.1 Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dilakukan di beberapa lokasi pertanaman padi yang meliputi Maros, Pangkep, Barru, Bone, dan Luwu Timur, dengan sistem pengambilan *purposive sampling* yakni pengambilan sampel dengan cara menetapkan ciri-ciri khusus yang sesuai dengan tujuan penelitian dalam hal ini adalah tanaman yang memiliki gejala busuk bulir di lapangan. Sampel diambil dari bulir tanaman padi yang terserang.

#### **3.2.2 Isolasi dan Identifikasi Isolat *B. glumae***

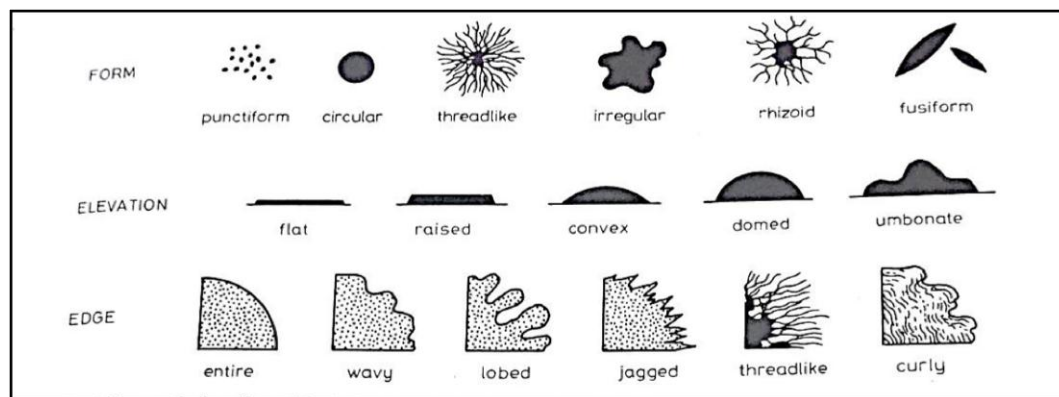
Bulir padi yang menunjukkan gejala penyakit dikumpulkan. Sampel bulir yang terinfeksi sebanyak 20 butir disterilisasi dengan larutan natrium hipoklorit 1% selama 2 menit dan berturut-turut dicuci tiga kali dengan air steril masing-masing selama 30 detik. Bulir-bulir tersebut lalu digerus dan



ditambahkan aquades 1-2 ml lalu diratakan menggunakan spatula pada media King's B dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  (ISTA, 2000). Koloni yang tumbuh kemudian dimurnikan pada media King's B.

### 3.2.3 Karakterisasi Morfologi dan Fisiologi

Bakteri yang diperoleh dari hasil pemurnian kemudian diamati karakter morfologi dan fisiologinya. Pengamatan morfologi meliputi pengamatan terhadap bentuk koloni bakteri, warna koloni, bentuk elevasi koloni, dan tepian koloni (Gambar 6).



Gambar 6. Karakterisasi dari koloni bakteri berdasarkan morfologi (Mazzucchi, 1977; Klement *et al.*, 1990).

Pengujian fisiologi bakteri meliputi :

#### 1. Uji KOH 3%

Seluruh Isolat bakteri diuji menggunakan larutan KOH 3% untuk melihat reaksi gramnya. Isolat bakteri diuji pada kaca preparat dengan meneteskan 1-2 tetes larutan KOH 3% lalu campurkan bakteri menggunakan jarum ose. Gram negatif jika campuran menjadi berlendir, dan gram positif jika tidak berlendir (Schaad *et al.*, 2001).

## **2. Uji Katalase**

Uji katalase menggunakan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pengujian dilakukan pada kaca preparat lalu diberi bakteri menggunakan jarum ose kemudian ditetaskan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada bakteri tersebut. Apabila terbentuk gelembung udara maka reaksi katalase positif, dan reaksi negatif apabila tidak terbentuk gelembung udara.

## **3. Pigmentasi Bakteri pada Media King's B**

Isolat yang diperoleh di subkultur pada media King's B (Lampiran 1) dan diinkubasi selama 2 hari pada suhu 37°C. Pengujian ini bertujuan untuk melihat pigment kuning toxoflavin yang dihasilkan oleh bakteri *B. glumae* (Karki *et al.*, 2012)

## **4. Uji Pembentukan Pigment Fluorescens**

Seluruh isolat dilihat dibawah sinar Fluorescens. Jika menghasilkan warna hijau berpendar maka hasilnya positif, jika tidak maka hasilnya negatif yang artinya bakteri tersebut tidak menghasilkan pigment fluorescens.

## **5. Uji Oksidasi/Fermentatif (O/F)**

Pengujian O/F ini untuk mengetahui apakah bakteri *B. glumae* dapat hidup pada kondisi anaerob. Uji menggunakan media berdasarkan formula Hugh dan Leifson (Lampiran 2) pH media 7,1. Pengujian dilakukan pada tabung rekasi yang diisi 5 ml media O/F lalu disterilisasi pada suhu 120°C selama 20 menit. Kemudian siapkan glukosa 10% dan

isterilisasi dengan filtrasi. Selanjutnya tambahkan 0,5 ml glukosa dalam masing-masing tabung. Inokulasi masing-masing isolat bakteri ke dalam 2 tabung reaksi Medium O/F salah satu tabung ditutup dengan vaselin/agar sekitar 5 mm sehingga oksigen tidak akan masuk dan reaksi yang signifikan akan dapat diamati. Perubahan warna biru ke kuning pada kedua tabung menunjukkan reaksi positif untuk pertumbuhan anaerob (fermentasi) (Schaad *et al.*, 2001).

## **6. Pembentukan Koloni Kuning pada media YDC**

Seluruh isolat disubkultur pada media YDC (Lampiran 3) dalam cawan petri lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari. Apabila menghasilkan koloni kuning menunjukkan hasil positif, dan jika tidak maka hasilnya negatif pembentukan koloni kuning.

## **7. Pengujian Arginin dehidrolase**

Masing-masing 4 ml media Arginin dehidrolase (Lampiran 4), pH 6 dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu di autoklaf. Pengujian dilakukan dalam tabung reaksi yang diisi media Arginin lalu diinokulasikan isolat bakteri kemudian ditutup menggunakan vaselin/agar. Inkubasi pada suhu 28°C selama 3 hari. Jika perubahan warna media pink menjadi merah maka hasilnya positif (Schaad *et al.*, 2001).

## **8. Produksi Levan**

Menggoreskan isolat bakteri pada media NA dengan menambahkan 5% sukrosa. Lendir putih, membentuk koloni cembung setelah 3-5 hari inkubasi mengindikasikan reaksi positif.

## **9. Oksidase Kovacs**

Menggosokkan secara berulang isolat bakteri pada kertas saring yang telah ditetesi larutan *sodium tetrametil-p-feniltediamin dihydrochloride*. Reaksi menunjukkan oksidase positif jika warna ungu berkembang dalam 10 detik, dan negatif jika tidak ada warna yang berkembang setelah 60 detik.

## **10. Uji Hipersensitif (HR)**

Pengujian dilakukan pada daun tembakau dengan infiltrasi menggunakan isolat bakteri dengan konsentrasi  $10^8$  cfu/ml. Pengamatan dilakukan pada 48 jam setelah infiltrasi. Apabila terbentuk gejala nekrotik maka hasilnya adalah positif hipersensitif.

## **11. Pengujian pada Bawang**

Sebanyak 5 ml suspensi bakteri dengan konsentrasi  $5 \times 10^5$  CFU dalam 10mM  $MgSO_4$  diaplikasikan pada 2 mm luka pada permukaan bagian dalam bawang yang dibuat dengan ujung mikropipet. Skala bawang bulat diinokulasi dengan bakteri lalu diinkubasi pada suhu  $30^\circ C$  selama 48 jam (Karki *et al*, 2012). Hasil yang positif menunjukkan adanya maserasi pada lapisan bawang.

## 12. Uji Pencairan Gelatin

Menginokulasikan bakteri pada media gelatin agar (Lampiran 5) dan diinkubasi selama 3 hari. Basahi permukaan dengan 5-10 ml larutan *acid mercuric chloride*. Area yang bening menunjukkan bakteri mampu menghidrolisis gelatin (reaksi positif).

## 2.3 Karakterisasi Molekuler *B. glumae*

### 2.3.1 Ekstraksi DNA

Metode Ekstraksi DNA bakteri yang digunakan sebagai template PCR mengikuti protokol sesuai dengan yang tertera pada kit ekstraksi gSYNC™ DNA Extraction.

### 2.3.2 Amplifikasi dan Elektroforesis

Diagnosa PCR untuk seluruh isolat bakteri dilakukan dengan menggunakan primer spesifik *B. glumae* 1418S : 5'-GCG ATA TGG CAA GAC GCA AA-3' dan 1418A : 5'-AGT CAT ACC CTT TGT CAG CGT-3' untuk daerah 16S-23S rDNA dengan produk amplifikasi ± 571 pasang basa (Nandakumar *et al.*, 2009). Komposisi PCR dengan reaksi 25 µl :

Tabel 1. Komposisi reagen untuk proses PCR

No.	Komponen	Volume (1 sampel)
1	Dream Taq Green PCR Master Mix	12,50 µl
2	Primer Forward	1,00 µl
3	Primer Reverse	1,00 µl
4	Water, nuclease-free	8,50 µl
5	Template DNA	2,00 µl

Amplifikasi DNA berlangsung dengan tahapan sebagai berikut. Tahap denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, diikuti 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 51,3°C selama 30 detik, dan extension 72°C selama 1 menit. Kemudian dilanjutkan dengan final extension pada suhu 72°C selama 7 menit (Karantina Soekarno Hatta, 2016).

Visualisasi DNA hasil PCR dilakukan dengan memasukkan 6 µl DNA hasil amplifikasi ditambah 2 µl *loading buffer* ke dalam lubang 1,5% gel agarosa dalam bufer TAE 1× (0.04 M Tris acetate, 0.01 M EDTA) dan dielektroforesis pada voltase 90 V selama 45 menit (Joko *et al.*, 2012; 2014). Pita DNA divisualisasikan menggunakan UV transilluminator. Pita DNA yang terbentuk pada hasil elektroforesis dengan marker uji 100 bp tersebut diamati dan dipotret dengan menggunakan kamera digital.

### **2.3.3 Kajian Filogeni Isolat-Isolat *B. glumae***

DNA bakteri hasil PCR diurutkan basanya. Sebanyak 6 dari 21 isolat hasil elektroforesis digunakan untuk sekuensing. Enam isolat tersebut terdiri dari isolat-isolat perwakilan dari tiap daerah. Sekuensing hasil amplifikasi dilakukan dengan menggunakan jasa komersial di Singapura. Hasil sekuensing selanjutnya digunakan sebagai bahan analisis identifikasi spesies *B. glumae* hasil isolasi. Setelah itu, dilakukan analisis tingkat kesamaan genetik *B. glumae* dengan yang ada di GeneBank. Hasil peruntukan basa DNA bakteri dikonfirmasi menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *The National*

Centre for Biotechnological Information (NCBI)

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Runutan nukleotida yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan penyejajaran berganda *Crustal W* pada perangkat lunak Bioedit *Sequence Alignment Editor* v 7.1.7.0. hubungan kekerabatan antarisolat dikonstruksi menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* v 6.06 (MEGA6) dengan pendekatan *maximum likelihood* dengan bootstrap 1000 kali ulangan.

Tabel 2. Tipe strain Bakteri *B. glumae* yang terdaftar pada NCBI

<b>Nama Ilmiah</b>	<b>Tipe Strain</b>
<i>Burkholderia glumae</i> (Kurita and Tabei 1967) Urakami et al. 1994	<i>B. glumae</i> ATCC:33617
	<i>B. glumae</i> CCUG:20835
	<i>B. glumae</i> CFBP:4900
	<i>B. glumae</i> : CIP:106418
	<i>B. glumae</i> : DSM:9512
	<i>B. glumae</i> : ICMP:3655
	<i>B. glumae</i> : BCCM/LMG:2196
	<i>B. glumae</i> : NCPPB:2981
	<i>B. glumae</i> : NIAES:1169

## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil

Lokasi pengambilan sampel yakni Maros, Barru, Pangkep (zona pantai barat), Bone (zona pantai timur) dan Luwu Timur (zona pantai peralihan). Musim hujan di wilayah sektor barat berlangsung bulan Oktober sampai dengan Maret, sedangkan Musim hujan di wilayah sektor timur berlangsung bulan April hingga September.

Pengambilan sampel untuk daerah pantai barat dilakukan pada musim penanaman gadu, yakni untuk daerah Maros pada bulan Mei, Barru, dan Pangkep pada bulan Juli, sedangkan untuk daerah pantai timur pada musim penanaman rendengan yaitu di Bone pada bulan Agustus, serta di daerah pantai peralihan Luwu Timur pada bulan November.

Pengambilan sampel dilakukan dengan melihat gejala penyakit busuk bulir yang ada di lokasi, gejalanya berupa bulir yang mengalami pencoklatan dimulai dari pangkal bulir dan gejala yang parah menyebabkan bulir menjadi hampa tetapi rachis malai tetap hijau.



Gambar 7. Gejala Penyakit Busuk Bulir Padi di lapangan yang disebabkan oleh Bakteri *B. glumae*.



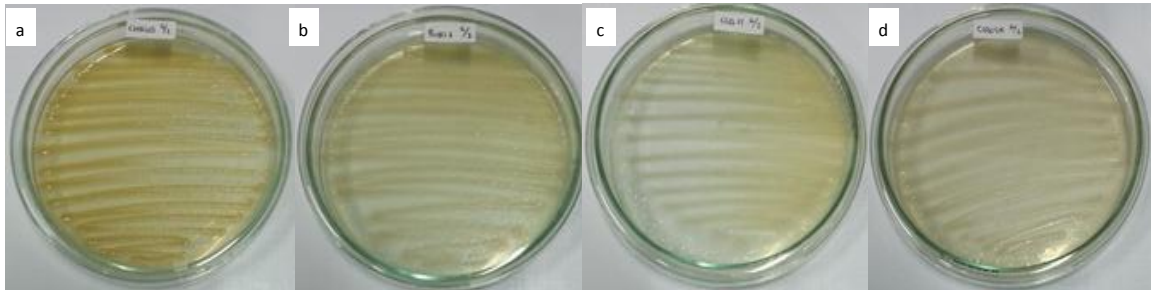
## **4.1.1 Karakteristik Morfologi dan Fisiologi Bakteri Penyebab Busuk**

### **Bulir Padi**

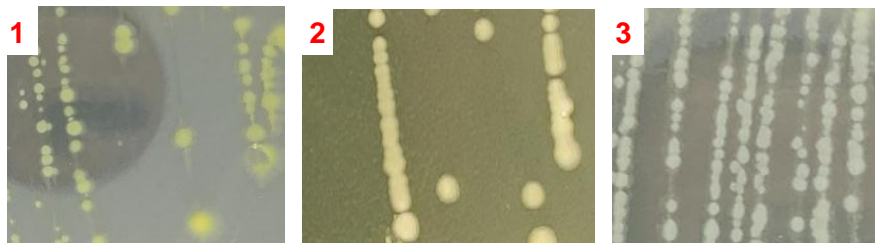
#### **4.1.1.1 Morfologi**

Hasil isolasi terhadap bakteri penyebab busuk bulir padi pada 5 lokasi pengambilan sampel bulir padi bergejala diperoleh 20 isolat yang memiliki kemiripan karakter morfologi dengan *B. glumae*, yakni 13 isolat dari Kabupaten Maros, 1 isolat dari Kota Pangkep, 4 isolat dari Kabupaten Barru, 1 isolat dari Kabupaten Luwu Utara, dan 1 isolat dari Kabupaten Bone, serta 1 isolat yang diperoleh dari Sidrap (Penelitian Rita Harnita tahun 2017) yang juga akan dikarakterisasi secara morfologi dan fisiologi serta dijadikan kontrol positif dalam identifikasi secara molekuler. Sehingga total isolat adalah 21 isolat. Karakterisasi morfologi lebih mengarah berdasarkan bentuk koloni, warna koloni, tepian koloni, dan elevasinya. Dari 21 isolat yang telah dikarakterisasi, maka dikelompokkan berdasarkan warna koloni yang terdiri dari 4 kelompok warna koloni (Gambar 8), yaitu 2 isolat berwarna kuning terang yakni isolat yang CHBL03 dan SHB01, 13 isolat berwarna putih kekuningan yakni isolat CSDa, MKBt01, MKBt03, PKLB1, BrMks2, MrBtm2.3, BrGKi2, SK02K, CHDa, MKB03B, MKBt05, MrBtm2.2, dan PPBS01, 4 isolat yang berwarna putih krem yakni isolat CSB11, BrMks1, BrGKa1.2, dan InpDa serta 2 isolat yang berwarna putih sampai putih keabuan yakni isolat CSB05K dan MKBt04, dengan bentuk koloni bulat utuh, tidak beraturan, dan bulat kecil, serta tepian koloni halus dan, bergelombang (Gambar 9),

serta bentuk elevasi koloni seluruh isolat adalah cembung. Seluruh isolat yang telah diisolasi tersaji dalam Tabel 4.



Gambar 8. Isolat hasil isolasi dari sampel biji, Koloni *Burkholderia glumae* yang tumbuh pada media King's B: **a.** CHBL03 (warna koloni kuning), **b.** BrGKi2 (warna koloni putih kekuningan), **c.** CSB11 (warna koloni putih krem), **d.** CSB05K (warna koloni putih keabuan).



Gambar 9. Karakter morfologi isolat-isolat bakteri yang pada umumnya berbentuk bulat, tepi halus, dan cembung.

Tabel 3. Daftar Isolat-Isolat Bakteri yang telah diisolasi beserta Karakteristik Morfologinya

No	Kode Isolat	Asal Daerah	Warna Koloni	Bentuk Koloni	Tepian Koloni	Elevasi
1	CHBL03	Lau, Maros	Kuning terang	Bulat utuh	Halus	Cembung
2	SHB01	Maritengngae, Sidrap	Kuning Terang	Bulat utuh	Halus	Cembung
3	CSDa	Lau, Maros	Putih Kekuningan	Bulat utuh	Halus	Cembung
4	MKBt01	Lau, Maros	Putih Kekuningan	Bulat utuh	Halus	Cembung
5	MKBt03	Lau, Maros	Putih Kekuningan	Bulat utuh	Halus	Cembung
6	PKLB1	Labbakkang, Pangkep	Putih Kekuningan	Bulat utuh	Halus	Cembung
7	BrMks2	Mangkoso, Barru	Putih Kekuningan	Bulat utuh	Halus	Cembung
8	MrBtm2.3	Bantimurung, Maros	Putih Kekuningan	Bulat kecil	Halus	Cembung
9	BrGKi2	Garessi, Barru	Putih Kekuningan	Bulat kecil	Halus	Cembung
10	SK02K	Mangkutana, Luwu	Putih Kekuningan	Bulat kecil	Halus	Cembung
11	CHDa	Lau, Maros	Putih Kekuningan	Bulat utuh	Halus	Cembung
12	MKB03B	Lau, Maros	Putih Kekuningan	Bulat utuh	Halus	Cembung
13	MKBt05	Lau, Maros	Putih Kekuningan	Bulat utuh	Halus	Cembung
14	MrBtm2.2	Bantimurung, Maros	Putih Kekuningan	Tidak beraturan	Bergelombang	Cembung
15	PPBS01	Barebbo, Bone	Putih Kekuningan	Tidak beraturan	Bergelombang	Cembung
16	CSB11	Lau, Maros	Putih Krem	Bulat kecil	Halus	Cembung
17	BrMks1	Mangkoso, Barru	Putih Krem	Bulat utuh	Halus	Cembung
18	BrGKa1.2	Garessi, Barru	Putih Krem	Bulat utuh	Halus	Cembung
19	InpDa	Lau, Maros	Putih Krem	Bulat utuh	Halus	Cembung
20	CSB05K	Lau, Maros	Putih Keabuan	Bulat utuh	Halus	Cembung
21	MKBt04	Lau, Maros	Putih Keabuan	Tidak beraturan	Bergelombang	Cembung

Berdasarkan tabel di atas maka terlihat bahwa isolat-isolat yang diperoleh memiliki perbedaan dan juga persamaan. Perbedaan karakter morfologi terlihat juga pada isolat-isolat yang diisolasi dari daerah yang sama. Selain itu pula, isolat yang diisolasi dari daerah yang berbeda ada yang memiliki karakter morfologi yang sama. Pengamatan tersebut dilakukan pada bakteri yang disubkultur pada media King's B.

#### **4.1.1.2 Fisiologi**

Uji Fisiologi dilakukan terhadap 21 isolat yang telah diperoleh, pengujian tersebut meliputi uji KOH 3%, Katalase, pigmentasi bakteri pada Media King's B, pembentukan pigment fluorescens, uji O/F (Oksidase/Fermentatif), pembentukan koloni kuning pada media YDC, arginin dehidrolase, produksi levan, oksidase kovacs, uji HR, uji pada bawang, dan pencairan gelatin.

Pengujian KOH 3% menunjukkan seluruh isolat bereaksi positif, baik terhadap KOH 3% karena menghasilkan lendir yang artinya bakteri tersebut tergolong bakteri gram negatif, begitu pula dengan uji katalase yang menunjukkan seluruh isolat bereaksi positif karena menghasilkan gelembung yang berarti bakteri tersebut dapat mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ . Pengujian pigmentasi untuk isolat-isolat bakteri *B. glumae* dibagi menjadi uji yaitu pigmentasi pada media King's B dengan hasil positif untuk isolat virulen dan negatif untuk isolat avirulen serta hasil negatif atau tidak menghasilkan pigment fluorescens. Hasil pengujian menunjukkan bahwa seluruh isolat menghasilkan pigmen kuning atau

yang disebut pigmen toxoflavin dengan tingkat pigmentasi yang berbeda-beda. Sedangkan untuk pigmen fluorescens menunjukkan seluruh isolat tidak menghasilkan pigmen fluorescens yang merupakan pigmen hijau yang berpendar jika dilihat dibawah sinar UV. Pengujian Oksidase/Fermentatif memiliki reaksi yang berbeda dari keseluruhan isolat uji, hasil uji menunjukkan ada isolat yang menghasilkan reaksi O/F +/+, +/- , dan -/-. Hasil uji pembentukan koloni kuning pada media YDC, arginin dehidrolase, dan produksi levan menunjukkan seluruh isolat memiliki reaksi negatif. Uji oksidase kovacs menunjukkan seluruh isolat bereaksi berbeda, yakni 7 isolat positif dan 14 isolat negatif. Sedangkan untuk uji pada bawang dan pencairan gelatin seluruh isolat bereaksi positif, dimana uji pada bawang menghasilkan maserasi pada area yang terkena suspensi bakteri dengan luas area maserasi yang berbeda, dan terbentuknya zona bening pada uji pencairan gelatin. Hasil Uji Hipersensitif pada daun tembakau menunjukkan 10 isolat positif sedangkan yang lainnya negatif. Seluruh hasil pengujian fisiologis bakteri tersaji dalam Tabel 5.

Tabel 4. Karakteristik Fisiologi Isolat-Isolat Bakteri *B. glumae*

No	Uji/Kode Isolat	CHBL03	SHB01	CSDa	MKBt01	MKBt03	PKLB1	BrMks2	Hasil Uji Pemanding (Cottyn <i>et al.</i> , 1996; Nandakumar, 2009;; Karki <i>et al.</i> , 2012; Deepali & Karuna, 2015)
1	KOH 3%	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Pigmen Toxoflavin	+	+	+	+	+	+	+	+ dan/atau -
4	Pigmen Fluorescens	-	-	-	-	-	-	-	-
5	O/F	+/+	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/-
6	Koloni Kuning YDC	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Arginin dehidrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Produksi levan	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Oksidase kovacs	-	-	-	-	-	+	-	ND
10	HR	+	-	-	+	-	+	-	+ dan/atau -
11	Uji pada Bawang	+	+	+	+	+	+	+	+ dan/atau -
12	Pencairan Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+

\*ND:tidak dapat ditentukan

Tabel 4 (Lanjutan). Karakteristik Fisiologi Isolat-Isolat Bakteri *B. glumae*

No	Uji/Kode Isolat	MrBtm2.3	BrGKi2	SK02K	CHDa	MKB03B	MKBt05	MrBtm2.2	Hasil Uji Pemanding (Cottyn <i>et al.</i> , 1996; Nandakumar, 2009;; Karki <i>et al.</i> , 2012; Deepal & Karuna, 2015)
1	KOH 3%	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Pigmen Toxoflavin	+	+	+	+	+	+	+	+ dan/atau -
4	Pigmen Fluorescens	-	-	-	-	-	-	-	-
5	O/F	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-	+/+	+/+	+/-
6	Koloni Kuning YDC	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Arginin dehidrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Produksi levan	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Oksidase kovacs	+	-	+	-	+	-	-	ND
10	HR	+	+	+	+	-	-	+	+ dan/atau -
11	Uji pada Bawang	+	+	+	+	+	+	+	+ dan/atau -
12	Pencairan Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+

\*ND:tidak dapat ditentukan

Tabel 4 (Lanjutan). Karakteristik Fisiologi Isolat-Isolat Bakteri *B. glumae*

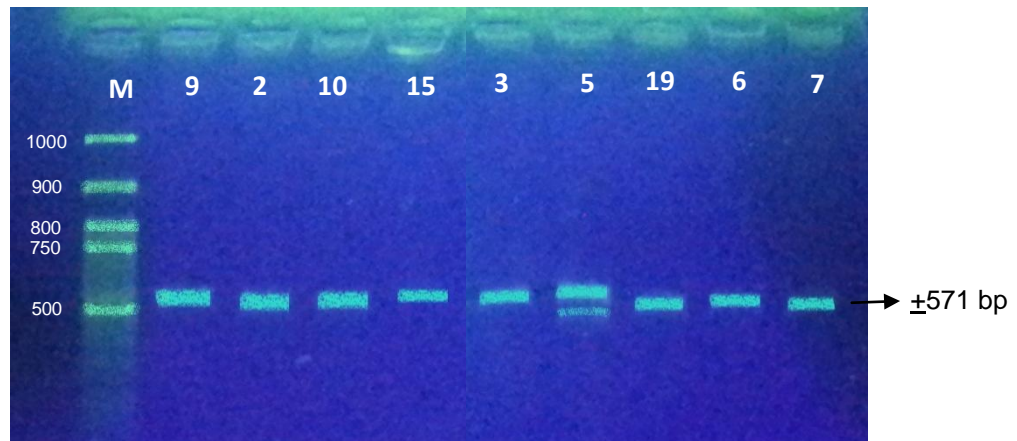
No	Uji/Kode Isolat	PPBS01	CSB11	BrMks1	BrGKa1.2	InpDa	CSB05K	MKBt04	Hasil Uji Pemanding (Cottyn <i>et al.</i> , 1996; Nandakumar, 2009;; Karki <i>et al.</i> , 2012; Deepali & Karuna, 2015)
1	KOH 3%	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Pigmen Toxoflavin	+	+	+	+	+	+	+	+ dan/atau -
4	Pigmen Fluorescens	-	-	-	-	-	-	-	-
5	O/F	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-
6	Koloni Kuning YDC	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Arginin dehidrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Produksi levan	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Oksidase kovacs	-	+	-	+	-	+	-	ND
10	HR	-	-	-	+	+	-	-	+ dan/atau -
11	Uji pada Bawang	+	+	+	+	+	+	+	+ dan/atau -
12	Pencairan Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+

\*ND:tidak dapat ditentukan

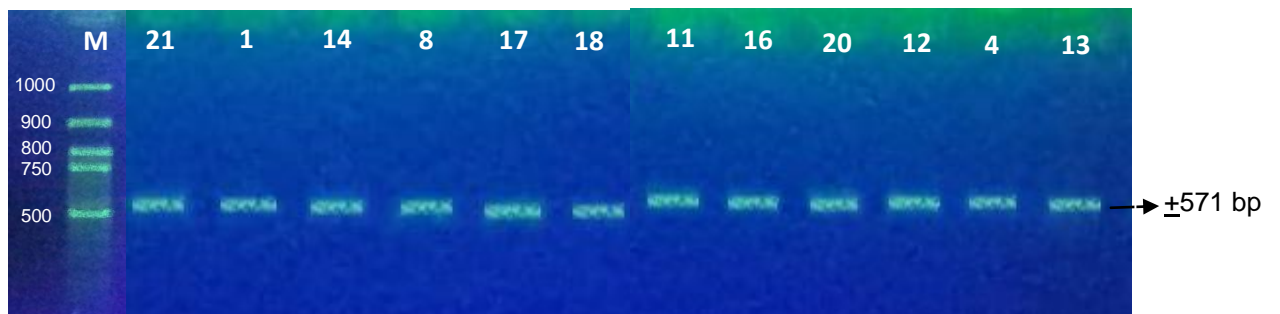


#### 4.1.2 Karakteristik Molekuler Bakteri *B. glumae*

Sebanyak 21 isolat *B. glumae* hasil isolasi dan karakterisasi morfologi dan fisiologi diidentifikasi lebih lanjut secara molekuler dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Identifikasi isolat *B. glumae* secara molekuler menggunakan pasangan primer spesifik 1418S dan 1418A dengan target  $\pm 571$  bp. Hasil amplifikasi dan elektroforesis memperlihatkan bahwa semua isolat uji menghasilkan pita berukuran  $\pm 571$  bp (Gambar 10 dan 11).



Gambar 10. Hasil Amplifikasi DNA bakteri menggunakan primer spesifik 1418S dan 1418A menunjukkan pita pada ukuran  $\pm 571$  bp. Marker 100bp.



Gambar 11. Amplifikasi DNA bakteri dengan menggunakan primer spesifik 1418S dan 1418A yang menghasilkan pada ukuran  $\pm 571$ bp.

Gambar 10 merupakan hasil amplifikasi isolat-isolat yang berasal dari daerah Maros, daerah Pangkep, daerah Barru, daerah Sidrap, daerah Luwu, dan daerah Bone. Gambar 11 merupakan hasil amplifikasi isolat-isolat yang seluruhnya berasal dari daerah Maros dan Barru. Seluruh hasil amplifikasi DNA tersebut menunjukkan pita DNA pada ukuran  $\pm 571$  bp yang berarti isolat tersebut merupakan bakteri *B. glumae*.

#### 4.1.3 Kajian Filogeni Isolat-Isolat *B. glumae*

Sebanyak 6 Isolat Bakteri *B. glumae* yang diambil dari perwakilan masing-masing daerah pengambilan sampel yang telah diurutkan basa DNANYA kemudian dilakukan uji BLAST dari NCBI dengan hasil yang menunjukkan bahwa isolat *B. glumae* yang ditemukan memiliki nilai homologi 98-99% dengan *Burkholderia glumae* LMG 2196 = ATCC 33617 yang ada di Genbank.

Tabel 5. Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat *B. glumae* asal Kabupaten Maros (MrBtm2.2).

Isolat	No. Akses	Query Cover (%)	Homologi (%)
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 (Amerika)	CP009435.1	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 plasmid pBIN 2 (Amerika)	CP009432.1	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 (Korea)	CP001503.2	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 plasmid bglu 1p (Korea)	CP001505.1	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> DNA insertion sequence IS1418 (Jepang)	AB010572.1	99	99

Tabel 6. Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat *B. glumae* asal Kabupaten Pangkep (PKLB1).

Isolat	No. Akses	Query Cover (%)	Homologi (%)
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 (Amerika)	CP009435.1	99	98
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 plasmid pBIN 2 (Amerika)	CP009432.1	99	98
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 (Korea)	CP001503.2	99	98
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 plasmid bglu 1p (Korea)	CP001505.1	99	97
<i>Burkholderia glumae</i> DNA insertion sequence IS1418 (Jepang)	AB010572.1	99	97

Tabel 7. Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat *B. glumae* asal Kabupaten Barru (BrMks2).

Isolat	No. Akses	Query Cover (%)	Homologi (%)
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 (Amerika)	CP009435.1	98	98
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 plasmid pBIN 2 (Amerika)	CP009432.1	98	98
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 (Korea)	CP001503.2	98	98
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 plasmid bglu 1p (Korea)	CP001505.1	98	98
<i>Burkholderia glumae</i> DNA insertion sequence IS1418 (Jepang)	AB010572.1	98	98

Tabel 8. Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat *B. glumae* asal Kabupaten Bone (PPBS01)

Isolat	No. Akses	Query Cover (%)	Homologi (%)
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 (Amerika)	CP009435.1	99	98
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 plasmid pBIN 2 (Amerika)	CP009432.1	99	98
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 (Korea)	CP001503.2	99	98
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 plasmid bglu 1p (Korea)	CP001505.1	99	98
<i>Burkholderia glumae</i> DNA insertion sequence IS1418 (Jepang)	AB010572.1	99	98

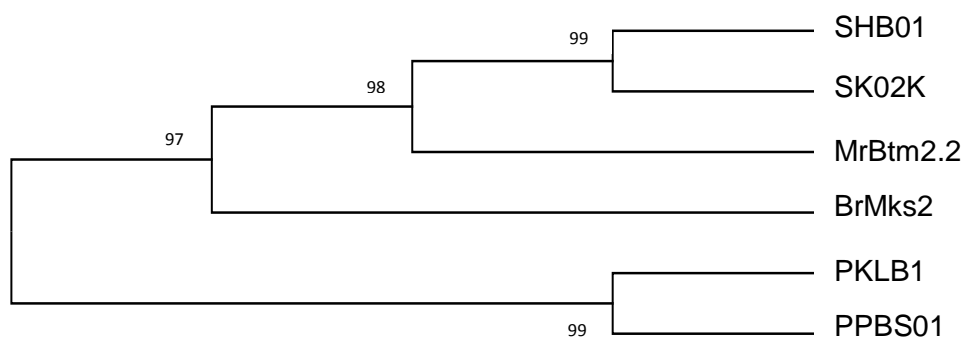
Tabel 9. Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat *B. glumae* asal Kabupaten Sidrap (SHB01).

Isolat	No. Akses	Query Cover (%)	Homologi (%)
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 (Amerika)	CP009435.1	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 plasmid pBIN 2 (Amerika)	CP009432.1	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 (Korea)	CP001503.2	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 plasmid bglu 1p (Korea)	CP001505.1	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> DNA insertion sequence IS1418 (Jepang)	AB010572.1	99	98

Tabel 10. Analisis BLAST pada NCBI untuk nukleotida isolat *B. glumae* asal Kabupaten Luwu (SK02K).

Isolat	No. Akses	Query Cover (%)	Homologi (%)
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 (Amerika)	CP009435.1	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 plasmid pBIN 2 (Amerika)	CP009432.1	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 (Korea)	CP001503.2	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 plasmid bglu 1p (Korea)	CP001505.1	99	99
<i>Burkholderia glumae</i> DNA insertion sequence IS1418 (Jepang)	AB010572.1	99	98

Kajian hubungan kekerabatan antar DNA bakteri *B. glumae* dilakukan menggunakan perangkat lunak MEGA6 (<http://www.megasoftware.net>). Hubungan kekerabatan antar DNA *B. glumae* disajikan pada gambar 12.



Gambar 12. Hubungan kekerabatan Isolat *B. glumae* yang diuji.

Uji filogenetik menunjukkan bahwa sekuen DNA *B. glumae* dari bulir tanaman padi bergejala dari 6 daerah pengambilan sampel

menunjukkan bahwa isolat SHB01 (Sidrap) memiliki hubungan dekat dengan isolat SK02K (Luwu), dan isolat PKLB1 (Pangkep) memiliki hubungan dekat dengan isolat PPBS01 (Bone) dengan tingkat kemiripan 99%.

## **4.2 Pembahasan**

### **4.2.1 Gejala Penyakit Busuk Bulir Padi**

Busuk Bulir Padi (*Bacterial Grain Rot*) merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Burkholderia glumae*. Bakteri ini dapat bertahan hidup hingga suhu 41°C (Saddler, 1994). *B. glumae* lebih menyukai kondisi malam yang hangat dengan kelembaban yg tinggi (Cha *et al.*, 2001). Gejala yang terlihat di lapangan menunjukkan bulir yang terinfeksi berwarna kecoklatan dan rachis malai terlihat tetap hijau. Hal ini sesuai dengan penelitian Shahjahan *et al.* (2000) yang melaporkan bahwa perubahan warna bulir dan batang hijau merupakan karakteristik diagnostik BGR yang paling penting. Luo *et al.* (2007) menemukan bahwa *B. glumae* dapat menyebabkan kehampaan pada gabah dan perubahan warna bulir. Gejala penyakit ini muncul pada saat tanaman memasuki fase berbunga dan bakteri cepat menggandakan pada permukaan malai (Miller *et al.*, 2009). Menurut Webster dan Gunnel (1992) bahwa biji yang terinfeksi akan menyusut dan pucat kehijauan, kemudian berkembang menjadi belang-belang kekuningan sampai coklat dan sampai kering. Bagian pangkal dari bulir yang mulai menunjukkan gejala awal dengan terbentuknya lesi coklat hingga coklat gelap. Lesi secara bertahap

menyebarkan ke bagian atas bulir dan lama kelamaan bulir yang tampak hijau menjadi pudar dan layu. Qi *et al.* (2016) mengemukakan bahwa warna bercak coklat pada bulir dan lesi pada daun bendera merupakan efek yang ditimbulkan oleh toxoflavin dan fervenulin yang diproduksi oleh *B. glumae*. Sejalan dengan Jeong *et al.* (2003) yang mengemukakan bahwa toxoflavin dan fervenulin merupakan senyawa esensial yang berperan terhadap patogenitas bibit dan akar padi sehingga berakibat menghambat pertumbuhan daun dan akar tanaman padi serta menyebabkan klorosis pada malai. Toxoflavin akan diproduksi oleh *B. glumae* pada suhu  $>30^{\circ}\text{C}$ . Karki *et al.* (2012) melakukan uji determinasi produksi toxoflavin dengan menumbuhkan pada media KB agar dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

*B. glumae* yang sebelumnya hanya merupakan patogen minor telah meningkat statusnya menjadi patogen utama pada padi, hal ini berkaitan dengan perubahan cuaca yang kondusif yaitu kondisi malam yang hangat dan kelembapan serta curah hujan yang tinggi selama musim tanam. Selain itu, penggunaan varietas hibrida yang memiliki potensi hasil tinggi tetapi kemungkinan lebih rentan terhadap penyakit turut menjadi salah satu penyebab terjadinya kemunculan penyakit baru (*emerging disease*) (Rita dkk., 2017).

Serangan *B. glumae* terdapat di semua lokasi pengambilan sampel yang ditunjukkan dengan adanya bercak coklat di pangkal bulir pada awal infeksi. Penyebaran penyakit ini dapat berkembang dari inokulum dalam

biji terinfeksi dari tahun sebelumnya, di dalam tanah, dan gulma di lapangan. Dalam proses infeksi, kerentanan inang, kepadatan inokulum, dan faktor iklim memainkan peran kunci (Tsushima, 1996).

#### **4.2.2 Karakter Morfologi *B. glumae***

Karakterisasi morfologi bertujuan untuk mengamati baik morfologi koloni maupun morfologi sel bakteri pada isolat bakteri yang telah lolos seleksi. Ketika ditumbuhkan dalam media yang bervariasi, mikroorganisme akan menunjukkan penampakan makroskopis yang berbeda-beda pada pertumbuhannya. Perbedaan ini disebut dengan karakteristik kultur, yang digunakan sebagai dasar untuk memisahkan mikroorganisme dalam kelompok taksonomik. Pada penelitian ini karakter morfologi yang dilihat ialah yang nampak langsung dari koloni yang ada pada media agar. Karakter morfologi dari isolat-isolat bakteri *B. glumae* yang diperoleh memiliki karakter yang berbeda. Perbedaan tersebut dapat hanya menunjukkan variasi fenotip dari masing-masing atau menunjukkan perbedaan tingkat virulensi tiap-tiap isolat (Tsushima *et al.*, 1986).

Pada proses purnian dan peremajaan, isolat bakteri dengan ciri morfologi yang sesuai ditumbuhkan pada media King's B, dan diinkubasi pada suhu 37°C. Morfologi koloni *B. glumae* yang tumbuh pada media King's B terdiri dari warna yang dibagi menjadi 4 kelompok yakni, kuning terang, putih kekuningan, putih krem, dan putih keabuan dengan bentuk bulat dan tidak beraturan, serta tepi koloni ada yang halus dan



bergelombang, dengan permukaan yang keseluruhan adalah cembung serta bersifat *diffusible non-fluorescent* (Tabel 4). Dari ciri morfologi koloni yang tumbuh pada media King's B, dapat terlihat perbedaan tingkat pigmen kuning yang dihasilkan, perbedaan tersebut mempengaruhi warna dari tiap-tiap isolat, warna kekuningan menunjukkan tingkat toxoflavin lebih tinggi dibandingkan yang berwarna putih krem dan putih keabuan. *B. glumae* memproduksi pigmen kuning-hijau yang larut dalam air di beberapa media. Koloni putih keabu-abuan atau kuning karena pigmen toxoflavin yang dihasilkan (Saddler, 1994; Cho *et al.*, 2007).

Menurut Schaad *et al.* (2001), koloni *B. glumae* memiliki karakteristik yang khas bila ditumbuhkan pada media agar, yaitu bersifat *difussible nonfluorescent*. Warna koloni dengan pigmen kuning kehijauan yang *diffusible*, mirip dengan koloni *Pseudomonas fluorescens*. Sedangkan ciri morfologi lainnya mengacu pada penelitian Tsushima (1996) yang menyatakan bahwa bentuk koloni *B. glumae* terbagi 2, yaitu tipe A bulat, halus, dan cembung pada isolat CHBL03, SHB01, CSDa, MKBt01, MKBt03, PKLB1, BrMks2, MrBtm2.3, BrGKi2, SK02K, CHDa, MKB03B, MKBt05, CSB11, BrMks1, BrGKa1.2, InpDa, CSB05K, serta tipe B dengan bentuk koloni beragam (tidak beraturan) pada isolat MrBtm2.2, PPBS01, dan MKBt04.

#### **4.2.3 Karakter Fisiologi *B. glumae***

Karakter Fisiologi bakteri dapat diketahui dengan melakukan serangkaian uji fisiologi. Pada penelitian ini 21 isolat bakteri yang

diperoleh menunjukkan hasil positif pada uji KOH yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut bakteri gram negatif. Deepali Singh and Karuna Vishunavat (2015) menyatakan bahwa uji fisiologis untuk bakteri *B. glumae* menunjukkan uji positif untuk kelarutan KOH.

Produksi katalase bisa diidentifikasi dengan menambahkan reagen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada suspensi bakteri. Seluruh isolat yang diperoleh menunjukkan katalase positif yakni menghasilkan gelembung udara pada pengujian yang berarti bakteri tersebut mampu memproduksi enzim katalase yang dapat mengubah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi air dan oksigen. Pembentukan gelembung udara pada uji katalase terlihat dengan jelas. Menurut Schaad *et al.* (2001) bahwa semua strain Burkholderia menghasilkan katalase positif.

Pigmen kuning dihasilkan oleh seluruh isolat bakteri yang terisolasi setelah inkubasi pada suhu 37°C akan tetapi dalam kadar yang berbeda. Zhou-qi *et al* (2016) menyatakan bahwa phytotoxins yang paling penting yang dihasilkan oleh *B. glumae* adalah pigmen kuning terang. Produksi toksin bergantung pada suhu pertumbuhan dan mencapai tingkat maksimal pada suhu 37°C, dan tidak ada toxoflavin yang terdeteksi dihasilkan pada suhu 25°C - 28°C. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jeong *et al.* (2003), pigmen kuning yang dihasilkan oleh koloni *B. glumae* merupakan toxoflavin yang berperan terhadap patogenisitas *B. glumae* dalam menginfeksi tanaman inang. *B. glumae* merupakan bakteri gram negatif, tidak memiliki fluorescent, berbentuk batang, dengan 1-3

flagela polar, dan berukuran 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  dan memproduksi pigmen kuning-hijau yang larut dalam air di beberapa media (Cho *et al.*, 2007).

Penelitian yang dilakukan oleh Nandakumar *et al.* (2009) terhadap 294 isolat *Burkholderia* memperlihatkan sebanyak 20 isolat *B. glumae* bersifat nonpatogenik. Isolat *Burkholderia* yang patogenik umumnya menghasilkan pigmen kuning yang diidentifikasi sebagai senyawa toxoflavin, sedangkan isolat nonpatogen tidak menghasilkan pigmen tersebut. *B. glumae* berkembang biak dalam ruang interseluler dari parenkim selama perkecambahan biji (Zhu *et al.*, 2010). *B. glumae* lebih menyukai kondisi malam yang hangat dengan kelembaban yang tinggi (Cha *et al.*, 2001). Perkembangbiakan bakteri ini di dalam plumula menghasilkan toksin toxoflavin yang menyebabkan terjadinya pembusukan pada bulir padi.

Pengujian pigmen fluorescens dilakukan untuk melihat kemampuan isolat bakteri menghasilkan pigmen fluorescens (pigmen hijau berpendar). Seluruh isolat bakteri tidak ada yang menghasilkan pigmen hijau berpendar setelah diamati di bawah sinar ultraviolet. Pigmen fluorescens dihasilkan pada koloni *P. fluorescens* yang ditumbuhkan pada media King's B sedangkan pada koloni *B. glumae* tidak menghasilkan pendar. Hal ini yang mendasari pengelompokan *B. glumae* yang awalnya termasuk genus *Pseudomonas* II dan kemudian bersama dengan *B. plantarii* pada tahun 1994 dimasukkan ke dalam genus *Burkholderia* yang anggotanya terdiri atas lebih dari 60 spesies. Secara genetika, *B. glumae*

terpisah dari kelompok *Burkholderia cepacia complex* (BCC) yang lebih memiliki kedekatan dengan patogen hewan seperti *B. mallei* dan *B. pseudomallei* (Weinberg *et al.*, 2007).

Bakteri *B. glumae* secara umum bersifat aerob yakni dapat hidup pada kondisi ada udara atau oksigen. Uji Of atau oksidasi/fermentatif menggunakan media uji O/F yang merupakan salah satu media yang digunakan untuk pengujian fisio-metabolisme suatu bakteri yaitu untuk mengetahui kemampuan memecah karbohidrat (glukosa) dalam suasana aerobik (oksidatif) atau anaerobik (fermentatif). Hasil pengujian O/F diperoleh 3 hasil yakni ++ pada isolat CHBL03, MKBt01, PKLB1, MrBtm2.3, BrGKi2, SK02K, MKBt05, MrBtm2.2, BrMks1, BrGKa1.2 dan MKBt04 yang menunjukkan adanya perubahan warna media menjadi kuning pada kedua tabung, hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri bersifat aerob fakultatif yakni kadang-kadang dapat bersifat anaerob. Hasil O/F +/- pada isolat CSDa, MKBt03, BrMks2, MKB03B, dan InpDa yang menunjukkan perubahan warna menjadi kuning hanya pada tabung yang ditutupi agar yang menunjukkan bahwa bakteri uji aerob terlihat, dan O/F -/- pada isolat SHB01, CHDa, PPBS01, CSB11, dan CSB05K yang menunjukkan tidak adanya perubahan warna pada kedua tabung uji yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak menghasilkan enzim yang dapat memfermentasi glukosa. Berdasarkan hasil yang diperoleh tersebut, maka untuk uji ini tidak dapat ditentukan hasilnya secara pasti seperti uji sebelumnya. Perubahan warna medium mejadi kuning disebabkan karena

terdapatnya *indicator bromtimol blue* (BTB) dalam medium. Dimana penambahan indikator BTB ke dalam medium yang mengalami fermentasi karbohidrat jadi asam dalam keadaan aerob, maka pH akan turun dan akhirnya indikator BTB ini akan berubah warna menjadi kuning.

Pengujian selanjutnya yaitu uji pembentukan koloni kuning pada media YDC, pengujian ini bertujuan untuk membedakan bakteri dari genus *Xanthomonas* spp, dan *Burkholderia* spp. yang merupakan patogen penting pada tanaman padi. Hasil menunjukkan bahwa seluruh isolat *B. glumae* tidak membentuk koloni kuning pada media YDC, berbeda dengan bakteri Xoo yang positif membentuk koloni kuning. Hal ini sesuai pada bagan “Differentiation of Commonly Isolate Genera” yang sering digunakan dalam mengidentifikasi spesies tertentu, menunjukkan bahwa bakteri *Burkholderia* spp. memberikan hasil negatif yakni tidak menghasilkan koloni kuning berlendir pada media YDC.

Uji arginin bertujuan untuk mengetahui apakah suatu bakteri mampu mengdehidrolase asam amino. Menurut Deepali Singh and KarunaVisnhunavat (2015) bahwa uji arginin dehidrolase pada bakteri *B. glumae* menunjukkan hasil negatif. Begitupula dengan uji Levan yang dimana bakteri *B. glumae* tidak membentuk koloni yang cembung dan berlendir pada media Levan. Seluruh isolat uji tidak ada yang menunjukkan positif uji arginin dehidrolase dan produksi levan, sehingga isolat-isolat tersebut menunjukkan karakter bakteri *B. glumae*.

Uji oksidase bertujuan untuk membedakan bakteri berdasarkan aktivitas sitokromoksidase. Enzim-enzim oksidase memainkan peran yang vital dalam pelaksanaan sistem transpor elektron pada respirasi aerob. Sitokrom oksidase mengkatalisis oksidase dari sitokrom yang tereduksi oleh oksigen molekular ( $O_2$ ), menghasilkan pembentukan  $H_2O$  atau  $H_2O_2$ . Uji oksidase merupakan alat untuk membedakan antara anggota-anggota dalam genus *Neisseria* dan *Pseudomonas*, yang merupakan oksidase positif, dan *Enterobacteriaceae* yang merupakan oksidase negatif. Kemampuan bakteri untuk menghasilkan sitokrom oksidase dapat ditunjukkan dengan penambahan pereaksi uji p-aminodimetilanilin oksalat, terhadap koloni-koloni yang ditumbuhkan pada suatu media agar. Pereaksi merah muda cerah ini berperan sebagai substrat buatan, memberikan elektron dan karenanya akan teroksidasi menjadi senyawa berwarna keunguan dan oksigen bebas. Dalam penelitian ini diperoleh 12 isolat bakteri yang menghasilkan oksidase negatif yaitu isolat CHBL03, SHB01, MKBt01, BrGKi2, MKBt05, MrBtm2.2, BrMks1, MKBt04, CSDa, MKBt03, BrMks2, CHDa, PPBS01, dan CSB05K. Menurut Deepali Singh and KarunaVisnhunavat (2015) bahwa bakteri *B. glumae* negatif pada uji oksidase.

Reaksi hipersensitif merupakan kematian sel yang cepat dan terlokalisasi. Hasil pengujian menunjukkan bahwa 11 isolat yang diuji dapat menghasilkan reaksi hipersensitif ketika diinfiltrasi ke dalam jaringan daun tembakau yang berarti isolat tersebut bersifat patogenik,

yakni isolat CHBL03, MKBt01, PKLB1, MrBtm2,3, BrGKi2, SK02K, CHDa, MrBtm2.2, CSB11, BrGKa1.2, dan InpDa.. Hal tersebut berarti bahwa reaksi dinyatakan positif karena terbentuk gejala nekrotik pada jaringan daun. Daun tembakau menjadi kecoklatan pada area masuknya bakteri yaitu dengan munculnya bercak kekuningan hingga coklat pada permukaan daun. Indrawati dan Wahyudi (2011) menyatakan bahwa reaksi hipersensitif muncul pada tanaman yang terinfeksi saat infiltrasi patogen dan bersamaan dengan itu merupakan usaha untuk menghambat pertumbuhan patogen. Sedangkan 10 isolat lainnya tidak menunjukkan gejala nekrotik pada daun tembakau, hal ini dapat terjadi jika bakteri yang diinokulasikan merupakan bakteri non patogen. Sehingga dapat dikatakan bahwa isolat-isolat bakteri yang telah diisolasi ada yang bersifat patogen dan ada pula yang bersifat non patogen.

Pembentukan maserasi pada bawang yang diinokulasi suspensi bakteri menandakan kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim pectinase yang dapat merusak dinding sel dari bawang. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh seluruh isolat bakteri dapat menyebabkan maserasi pada bawang walaupun dengan tingkat maserasi yang berbeda. Menurut Karki *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa terbentuknya maserasi pada bawang menunjukkan kemampuan bakteri dalam menimbulkan penyakit, menunjukkan tingkat virulensinya.

Uji Fisiologis yang terakhir adalah Uji gelatin. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui apakah suatu bakteri memiliki enzim

gelatinase yang mampu menghidrolisis gelatin atau tidak. Menurut Deepali Singh and KarunaVisnhunavat (2015) mengatakan bahwa bakteri *B. glumae* mampu menghidrolisis gelatin, yang ditandai dengan munculnya zona bening disekitar bakteri uji pada media gelatin yang diberi asam mercuric chlorida.

#### **4.2.4 Karakteristik Molekuler dan Filogenetik Isolat bakteri *B. glumae***

Pengurutan Basa DNA bakteri dilakukan terhadap semua isolat bakteri yang ditemukan. Schaad *et al.* (2015), mengemukakan bahwa primer 1418S dan 1418A adalah primer spesifik untuk *B. glumae* dengan panjang produk amplifikasi  $\pm 571$  bp. Seluruh isolat uji menunjukkan ukuran pita DNA  $\pm 571$  bp. Adanya perbedaan pada morfologi koloni *B. glumae* yang ditumbuhkan pada media agar dapat disebabkan oleh adanya faktor fenotipik serta tingkat produksi toxoflavin yang berbeda oleh masing-masing strain (Jeong *et al.*, 2003; Karki *et al.*, 2012) atau dapat juga karena faktor lingkungan yang berbeda sehingga fenotipiknya berbeda. Pada umumnya gejala perubahan warna (*discoloration*) pada biji padi dapat digunakan sebagai indikator adanya infeksi oleh bakteri patogen. Namun, *B. glumae* juga dapat dideteksi pada sampel yang tidak menghasilkan gejala (*Symptomless carrier*). Fory *et al.* (2013) melaporkan bahwa dari 14 sampel biji yang tidak bergejala, terdapat 3 sampel yang positif terinfeksi *B. glumae*. Teknik deteksi yang digunakan lebih banyak secara molekuler karena lebih cepat dan hasilnya lebih valid. Pengujian dengan PCR menggunakan primer spesifik telah banyak dilakukan.



Hubungan kekerabatan antarisolat *B. glumae* yang diperoleh dari tiap daerah menunjukkan tingkat kerabatan yang dekat yakni berkisar 97-99%. Isolat SHB01 (Sidrap) memiliki hubungan dekat dengan isolat SK02K (Luwu), dan isolat PKLB1 (Pangkep) memiliki hubungan dekat dengan isolat PPBS01 (Bone) dengan tingkat kemiripan 99%. Adapun tingkat kemiripan dengan isolat *B. glumae* LMG 2196 = ATCC 33617 yang terdaftar di GeneBank menunjukkan tingkat kemiripan 99% dengan isolat SHB01, SK02K, dan MrBtm2.2, tingkat kemiripan 98% dengan isolat BrMks2, PKLB1, dan PPBS01.

## BAB V. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut :

1. Isolat-isolat *B. glumae* yang diperoleh sebanyak 21 isolat memiliki karakteristik morfologi dengan warna kuning terang, putih kekuningan, putih krem, dan putih keabuan. Bentuk koloni pada umumnya berbentuk bulat dengan tepian halus, serta elevasi yang cembung.
2. Karakter fisiologis menunjukkan bahwa sebagian besar fisiologi bakteri *B. glumae* memiliki persamaan yakni dari kelarutan KOH, katalase, pembentukan pigmen toxoflavin, pigmen fluorescens, koloni kuning pada media YDC, arginin dehidrolase, produksi levan, pektinase pada bawang, dan pencairan gelatin. Sedangkan perbedaan fisiologisnya terletak pada kemampuan hidup bakteri secara aerob atau anaerob (uji O/F), oksidase kovaks, dan Hipersensitif pada tembakau.
3. Karakteristik molekuler seluruh isolat *B. glumae* menggunakan primer spesifik 1418S dan 1418A menunjukkan panjang produk amplifikasi +571bp.
4. Hubungan kekerabatan tiap isolat *B. glumae* dengan Isolat *B. glumae* pada GeneBank menunjukkan tingkat kemiripan sebesar 98-99%.

## **5.2 Saran**

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai karakter bakteri *B. glumae* yang virulen dan avirulen, tingkat virulensinya serta faktor-faktor yang mempengaruhi virulensi tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

- An J H, Goo E, Kim H, Seo Y S, Hwang I. 2014. Bacterial quorum sensing and metabolic slowing in a cooperative population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 14912–4917.
- Baharuddin, Harnita R, Faisal F, Yani A, Suparmi, Hamid H, Kuswinanti T, Jahuddin R. 2017. Keberadaan Penyakit Busuk Bulir (*Burkholderia glumae*) pada Tanaman Padi di Sulawesi Selatan. Simposium Nasional Fitopatologi. Bogor.
- BPS. 2017. Kementerian Pertanian RI. Sub sektor tanaman pangan. Produksi, luas panen, dan produktivitas padi di indonesia, 2013-2017. [www.pertanian.go.id/Data5tahun/TP-ARAM%20II%202017\(pdf\)/00-PadiNasional.pdf](http://www.pertanian.go.id/Data5tahun/TP-ARAM%20II%202017(pdf)/00-PadiNasional.pdf). Diakses pada tanggal 2 januari 2018 pukul 14.45 WITA
- Cha K H, Lee Y H, Ko S J, Park S K, Park I J. 2001. Influence of weather condition at heading period on the development of rice bacterial grain rot caused by *Burkholderia glumae* . *Res Plant Dis* , 7: 150–154.
- Cho H S, Park S Y, Ryu C M, Kim J F, Kim J G, Park S H. 2007. Interference of quorum sensing and virulence of the rice patogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. *Fems Microbiol Ecol* , 60: 14–23.
- Chun H, Choi O, Goo E, Kim N, Kim H, Kang Y, Kim J, Moon J S, Hwang I. 2009. The quorum sensing-dependent gene *katG* of *Burkholderia glumae* is important for protection from visible light. *J Bacteriol* , 191: 4152–4157.
- Cottyn B, Cerez M T, Van Outryve M F, Barroga J, Swings J, and Mew T W. 1996. Bacterial diseases of rice. I. Pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. *Plant Dis*. 80 (4): 429-437
- Davey M E and O'Toole G A. 2000. Microbial bio films: From ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* , 64(4): 847–867.
- Deepali S and Karuna V. 2015. Identification of a seed-borne rice bacterium, *Burkholderia glumae* using cultural, morphological and biochemical methods. *Journal OF Applied and Natural Science* 7 (2) : 562 – 566
- Degrassi G, Devescovi G, Kim J, Hwang I, Venturi V. 2008. Identification, characterization and regulation of two secreted polygalacturonases

- of the emerging rice pathogen *Burkholderia glumae*. *Fems Microbiol Ecol*, 65(2): 251–262.
- Devescovi G, Bigirimana J, Degrassi G, Cabrio L, LiPuma J J, Kim J, Hwang I, Venturi V. 2007. Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Appl Environ Microb*, 73(15): 4950–4958.
- El Khattabi M, Van Gelder P, Bitter W, and Tommassen J. 2000. Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. *J. of Biological Chemistry*. 275 (35): 26885-26891.
- Fang Y, Xu L H, Tian W X, Huai Y, Yu S H, Lou M M, Xie G L. 2009. Real-time fluorescence PCR method for detection of *Burkholderia glumae* from rice. *Rice Sci*, 16(2): 157–160.
- Frenken L G J, Bos J W, Visser C, Muller W, Tommassen J, Verrips C T. 1993. An accessory gene, *lipB*, required for the production of active *Pseudomonas-glumae* lipase. *Mol Microbiol*, 9(3):579–589.
- Fory PA, Triplett L, Ballen C, Abello J F, Duitama J, Aricapa M G, Prado G A, Correa F, Hamilton J, Leach J E, Tohme J, & Mosquera G M. 2013. Comparative Analysis of Two Emerging Rice Seed Bacterial Pathogens. *Phytopathology* 104: 436-444.
- Goo E, An J H, Kang Y, Hwang I. 2015. Control of bacterial metabolism by quorum sensing. *Trends Microbiol*, 23(9): 567–576.
- Goto K, Ohata K. 1956. New bacterial diseases of rice (brown stripe and grain rot). *Ann Phytopathol Soc Jpn*. 21:46–47
- Ham J H, Melanson R A, Rush M C. 2011. *Burkholderia glumae*: Next major pathogen of rice? *Mol Plant Pathol*. 12(4): 329–339.
- Hikichi Y, Okuno T, and Furusawa I. 1994. Susceptibility of rice spikelets to infection with *pseudomonas-glumae* and its population-dynamics. *J. of Pest. Sci*. 19 (1): 11-17.
- Hikichi Y and Egami H. 1995. Control systems for bacterial grain rot of rice with oxolinic acid and seed selection with salt solution. *Annals of the Phytopath. Soc. of Jap*. 61 (4): 405-409
- Jang M S, Goo E, An J H, Kim J, Hwang I. Quorum sensing controls flagellar morphogenesis in *Burkholderia glumae*. *PLoS One*. 2014; 9(1):e84831. doi: [10.1371/journal.pone.0084831](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084831) PMID: [24416296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24416296/)
- Jeong Y, Kim J, Kim S, Kang Y, Nagamatsu T, & Hwang I. 2003. Toxoflavin Produced by *Burkholderia glumae* Causing Rice Grain

Rot is Reponsible for Inducing Bacterial Wilt in Many Field Crops. *Plant Disease* 87: 890-895.

- Joko T, Subandi A, Kusumandari N, Wibowo A, & Priyatmojo A. 2014. Activities of Plant Cell Wall-Degrading Enzymes by Bacterial SO/Ft Rot O/F Orchid. *Archives O/F Phytopathology and Plant Protection* 47: 1239–1250.
- Joko T. 2017. *Burkholderia glumae* sebagai *Emerging Patogen*: Status, Potensi Kerusakan, dan Strategi Pengendalian. Simposium Nasional Fitopatologi 2017 “Kemunculan Penyakit Baru dan Impor Benih”. *Hlm.* 27-35
- Jung B, Lee S, Ha J, Park J C, Han S S, Hwang I, Lee Y W, Lee J.2013. Development Of a selective medium for the fungalpatogen *Fusarium graminearum* using toxoflavin produced bythe bacterial patogen *Burkholderia glumae*.*Plant Pathol J*,29(4): 446–450.
- Kang Y, Kim J, Kim S, Kim H, Lim J Y, Kim M, Kwak J, Moon JS, Hwang I. 2008. Proteomic analysis Of the proteins regulatedby HrpB from the plant patogenic bacterium *Burkholderiaglumae*. *Proteomics*, 8(1): 106–121.
- Karki K S, Bisnu K, Sherstha, Jae W H, Donald E , Inderjit K B, Milton C R, Rebecca A M, Beom S K, Jong H H. 2012. Diversities in Virulence, Antifungal Activity, Pigmentation, and DNA Fingerprint among Strain Of *Burkholderia glumae*. The Department Of Plant Pathology and Crop Physiology Louisiana State University.
- Karki H S, Ham J H. 2014.The roles Of the shikimate pathwaygenes, *aroA* and *aroB*, in virulence, growth and UV tolerance Of *Burkholderia glumae* strain 411gr-6.*Mol Plant Pathol*,15(9): 940–947.
- Kim J, Kim J G, Kang Y, Jang J Y, Jog G J, Lim J Y, Kim S, SugaH, Nagamatsu T, Hwang I. 2004. Quorum sensing and theLysR-tipe transcriptional activator ToxR regulate toxoflavinbiosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*.*MolMicrobiol*,54(4): 921–934.
- Klement Z, Rudolph K, Sands D C. 1990. Book: Methods in phytobacteriology
- Kurita T and Tabei H. 1967. On the patogenic bacterium of bacterial grain rot Of rice. *Ann. Phyto. Soc. Jap.* 33: 111.
- Lee H Y, Park J, Kim J, Park I, Seo Y S. 2015. Understanding Of the direction of evolution in *Burkholderia glumae* through comparative genomics. *Curr Genn.*

- Luo J Y, Xie G L, Li B Q, Xu L H. 2007. First report Of *Burkholderia glumae* isolatd from symptomless rice seeds in China. *Plant Dis.* 91(10):1363.
- Matsuda I. and Sato Z. 1987. Ecology of *P. glumae*, cause bacterial grain rot Of rice, from planting to the mature stage. *Ann. Phyto. Soc. Jap.* 53:122.
- Mavrodieva V, Levy L, and Gabriel D W. 2004. Improved sampling methods for realtime polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology* 94:61-68.
- Miller S A, Beed F D, and Harmon C L. 2009. Plant disease diagnostic capabilities and networks. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:15-38.
- Nandakumar R, Shahjahan A K M, Yuan X L, Dickstein E R, Groth D E. 2009 *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Dis* 93: 896–905.
- Ou S M. 1985. *Rice Disease*. 2<sup>nd</sup> . Ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 380p.
- Rita Harnita, Baharuddin, Rahmat Jahuddin. 2017. Diagnosa Bakteri *Burkholderia glumae* pada Benih Padi Hibrida Betina Asal Filipina. Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Fitopatologi Indonesia.
- Saddler G S. 1994. IMI descriptions of fungi and bacteria, Set 122, Nos 1211-1220. *Mycopathologia*, 128(1): 59–60.
- Sato Z, Koiso Y, Iwasaki S, Matsuda I, and Shirata A. 1989. Toxins produced by *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phyto. Soc. Jap.* 55: 353-356.
- Sayler R J, Cartwright R D, & Yang Y. 2006. Genetic Characterization and Real-Time PCR Detection Of *Burkholderia glumae* , a Newly Emerging Bacterial Patogen Of rice in the United States. *Plant Disease*, 90(5), 603–610. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0603>
- Schaad N W, Jones J B, Chun W. 2001. Laboratory guide for identification Of Plant pathogenic bacteria. 3rd Ed.: The American Society of Phytopathological Society Press.
- Seo Y S, Lim J Y, Park J, Kim S, Lee H H, Cheong H, Kim S M, Moon J S, Hwang I. 2015. Comparative genome analysis Of rice-pathogenic *Burkholderia* provides insight into capacity to adapt to different environments and hosts. *BMC Genom.* 16:349.

- Shahjahan A K M, Rush M C, Clark C E, and Groth D E. 1998. Bacterial sheath rot and panicle blight Of rice in Louisiana. Proc. 27 th RTWG. 27: 31-32
- Shahjahan A K M, Groth D E, Clark C, Linscombe S D, and Rush M C. 2000. Critical stage of infection and the effect O/F infected seeds on disease development and yield Of rice. Proc. 28 th RTWG. 28: 77.
- Shahjahan A K M, Rush M C, Groth D, and Clark C. 2000. Panicle Blight. Rice Journ. 15: 26-29.
- Shahjahan, A. K. M., D. E. Groth, C. A. Clark, S. D. Linscombe, and M. C. Rush. 2000c. Epidemiological studies on panicle blight Of rice: critical stage O/F infection and the effect of infected seeds on disease development and yield Of rice. Proc. 28 th RTWG. 28: 77.
- Sogou, K. and Y. Tsuzaki. 1983. Overwintering O/F grain rot bacterium *Pseudomonas glumae* and its infection to rice plant in the paddy field. Proc. Assoc. Plant Prot. Shikotu.18: 15-20.
- Springman AC, Jacobs JL, Somvanshi VS, Sundin GW, Mulks MH, Whittam TS, Viswanathan P, Gray RL, Lipuma JJ, Ciche TA. 2009. Genetic diversity and multihost patogenicity of clinical and environmental strains Of *Burkholderia cenocepacia*. *Appl Environ Microbiol.* 75:5250–5260
- Tsushima S, Wakimoto S. and Mogi S. 1986. Selective medium for detecting *Pseudomonas glumae* Jurita et Tabei, the causal bacterium of grain rot Of rice. Ann. Phytopath. Soc. Japn. 52: 253-259.
- Tsushima S, Naito H, & Koitabashi M. 1995. Change in Panicle Susceptibility Associated with Flowering Rate of Spikelets in Bacterial Grain Rot Of rice Caused by *Pseudomonas glumae*. *Annals Of the Phytopathological Society of Japan* 61:109-113.
- Tsushima S. 1996. Epidemiology of bacterial grain rots Of rice caused by *Pseudomonas glumae*. JARQ 30 (2): 85-89.
- Ura H, Iiyama K, Furuya N, and Matsuyama N. 1996. Properties Of the bacteria isolatd from rice plants with leaf-sheath browning and grain rot. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 62: 640
- Voget S, Knapp A, Poehlein A, Vollstedt C, Streit W, Daniel R, Jaeger K E. 2015. Complete genome sequence Of the lipaseproducing strain *Burkholderia glumae* PG1.J *Biotechnol*, 204:3–4.
- Indrawati, Gandjar Roosheroe dan Priyo Wahyudi. 2011. Mengenal Biodiversitas Mikroorganisme Indonesia untuk Kesejahteraan



Bangsa.

<https://books.google.co.id/books?id=ZIBADwAAQBAJ&pg=PA35&lpq=PA35&dq=wahyudi+dkk+2011&source=bl&ots=exYlpO/F2Gv&sig=04dVTXUrearvaBf0BeQHD3fXdBq&hl=id&sa=X&ved=2ahUKEwjOwNv5sJDfAhVlcCsKHbfQAx8Q6AEwBXoECAIQAQ#v=onepage&q=wahyudi%20dkk%202011&f=false> Diakses pada tanggal 8 Desember 2018 pukul 21.56 WITA

- Wamishe Y. 2015. Bacterial Panicle Blight Of rice in Arkansas. Agriculture and Natural Resources. Division of Agriculture, Research and Extension. University of Arkansas System. FSA7580-PD42015N
- Weinberg J B, Alexander B D, Majure J M, Williams L W, Kim J Y, Vandamme P, LiPuma J J. 2007. *Burkholderia glumae* infection in an infant with chronic granulomatous disease. *J Clin Microbiol.* 45(2):662–665.
- Welch D F. 1991. Applications O/F cellular fatty acid analysis. *Clinical Microb. Rev.* 4: 422-438.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, and Arakawa M. 1992. Proposal Of *Burkholderia gen. Nov.* and transfer O/F seven species Of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the tipe species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. *Microbiol. Immun.* 36:1251-1275.
- Yuwono T. 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Seri Pertanian. Gadjah Mada University Press. 66 hal.
- Zhou-qi C, Bo Z, Guan-lin X, Bin L, & Shi-wen H. 2016. Research Status and Prospect Of *Burkholderia glumae*, the Patogen Causing Bacterial Panicle Blight. *Rice Science*, 23(3), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.01.007>
- Zhu J G, Jin M O, Zhu S F, Zhao W J, Peng Z, Liu H X, Zhong W Y. 2010. Duplex PCR-DHPLC for detection Of *Burkholderia glumae*. *Acta Phytopathol Sin*, 40(5): 449–455.
- Zughaier S M, Ryley H C, Jackson S K. 1999. A melanin pigment purified from an epidemic strain Of *Burkholderia cepacia* attenuates monocyte respiratory burst activity by scavenging superoxide anion. *Infect Immun*, 67(2): 908–913.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Komposisi Media King's B

Protease Pepton #3 difco	20,0 g
MGSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,50 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,50 g
Glycerol	15,0 ml
Agar	15,0 g
Aquades	1000 ml

### Lampiran 2. Komposisi Media Hugh and Leifson

Peptone	2.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Dipotassium phosphate	0.3 g
Glucose (Dextrose)	10.0 g
Bromothymol blue	0.03 g
Agar	3.0 g
pH akhir (pada suhu 25°C)	7.1±0.2

Suspen 20,33 gram dalam 1000 ml air suling. Panaskan hingga mendidih untuk melarutkan media sepenuhnya. Masukkan ke tabung reaksi dalam rangkap dua untuk fermentasi aerobik dan anaerobik. Sterilkan dengan autoklaf pada tekanan 10 lbs (115 ° C) selama 20 menit. Dinginkan media tabung dalam posisi tegak.

### Lampiran 3. Komposisi Media *Yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub>* (YDC)

Teast extract	10,0 g
Dextrose (glucose)	20,0 g
Calcium carbonate, USP light	20,0 g
Powder Agar	15,0 g
Aquadestilata	1000 ml

Untuk memperoleh media berwarna putih susu, CaCO<sub>3</sub> harus digerus halus, bila tidak CaCO<sub>3</sub> akan mengendap di dasar. Autoklaf dextrose dalam 100 ml aquadestilata secara terpisah, campurkan ke basal media sebelum dituangkan ke dalam plate. Media yang telah diautoklaf harus didinginkan sampai 50°, kemudian sebelum dituangkan aduk media dengan memutar erlenmeyer dengan perlahan sehingga CaCO<sub>3</sub> melarut sempurna. Koloni *A. avenae* mudah dibedakan dengan bakteri plantpatogenik lainnya. Koloni konveks dengan diameter 2-3 mm setelah 2 hari pada 30-32 °C, berwarna beige gelap, dan menjadi sangat lengket setelah 3-4 hari.

#### **Lampiran 4. Komposisi media Arginin dehidrolase**

Stab inokulasi tabung mengandung media Thornley:

Peptone	1,0 g
NaCl	5,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
Agar	3,0 g
Phenol red	1,0 mg
Arginin HCl	10,0 g
Aquades	1000 ml
pH 7,2	

Campur dan larutkan dengan cara pemanasan (p H disesuaikan hingga mencapai 7,2). Kemudian larutan ini dibagikan ke dalam tabung uji masing-masing sebanyak 3 ml dan disterilisasi dengan menggunakan autoclave selama 15 menit.

#### **Lampiran 5. Komposisi Media Gelatin Liquefaction**

##### **Gelatin agar**

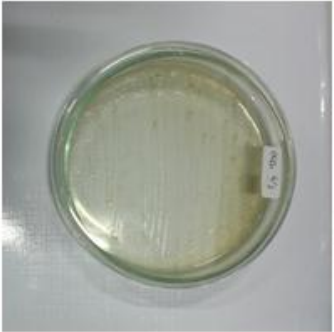

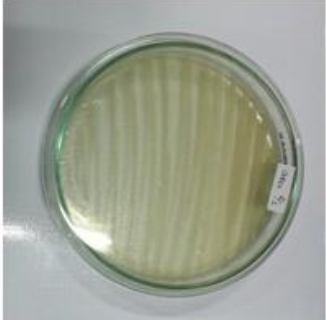

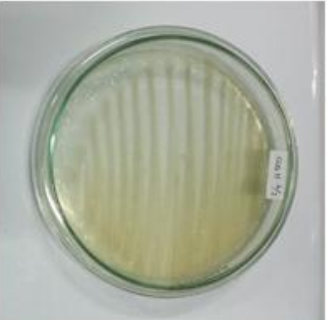
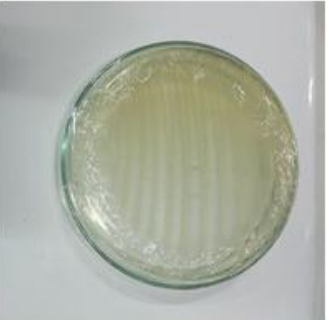
Gelatin	4 gr
Aquades	1000 ml
Nutrient agar	23 gr

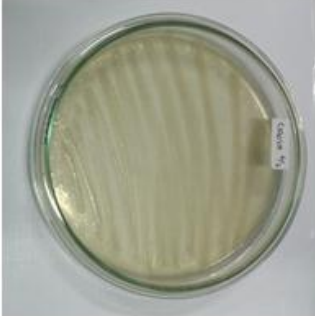
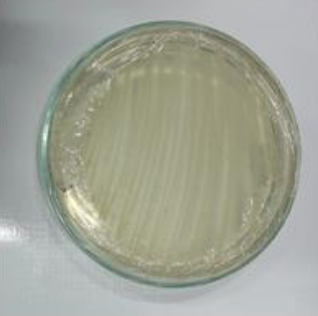


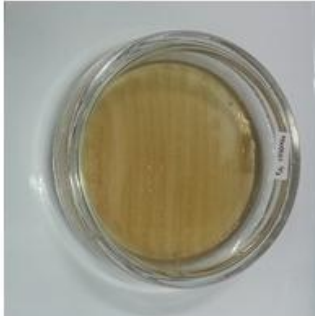
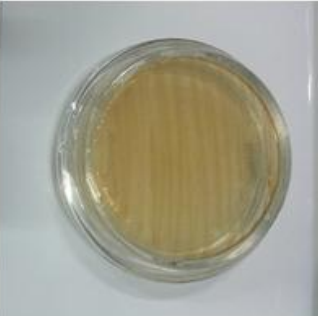
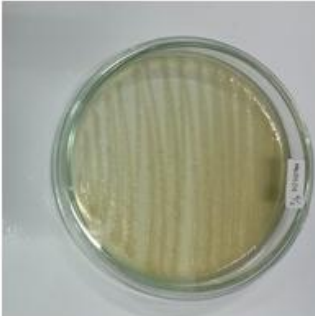
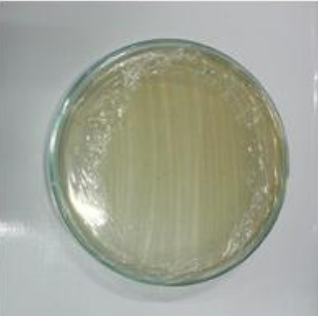
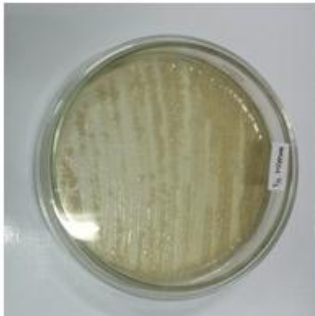
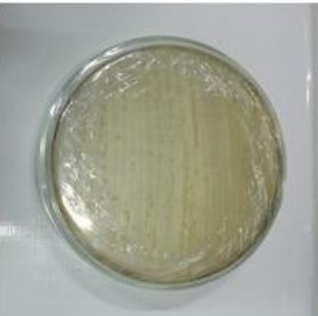
### Asam Mercuric clorida

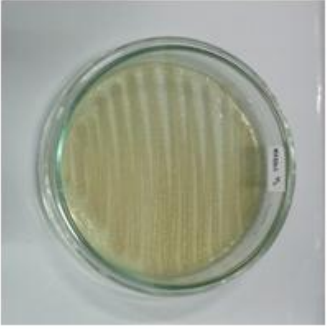
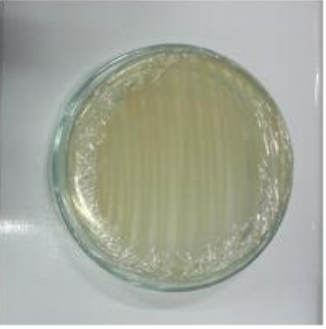
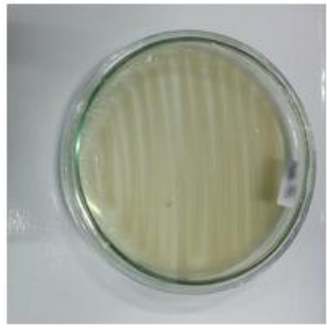
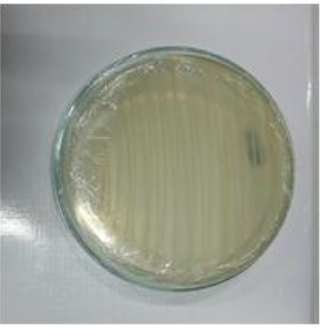

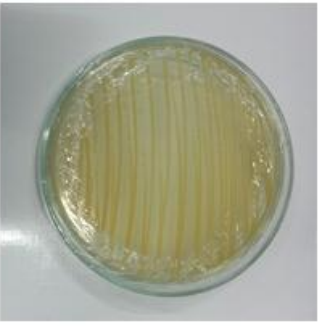

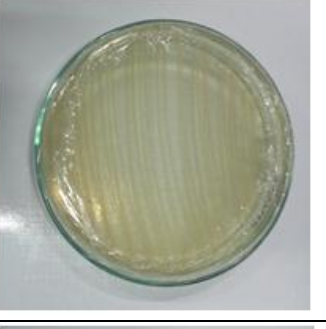
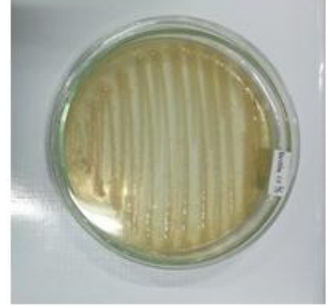
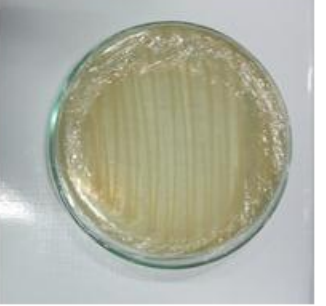
Campurkan 12 gr Asam Mercuric clorida dengan 80 ml aquades lalu tambahkan 16 ml HCl. Goyangkan hingga tercampur sempurna.

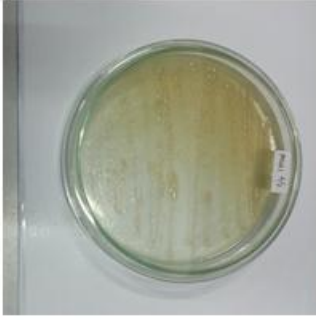

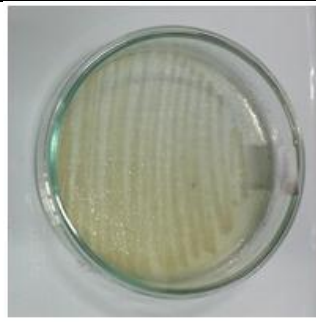
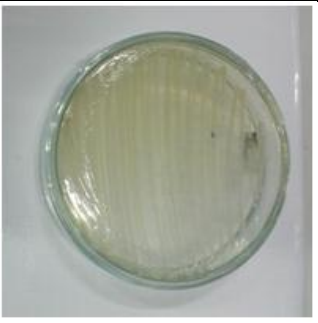
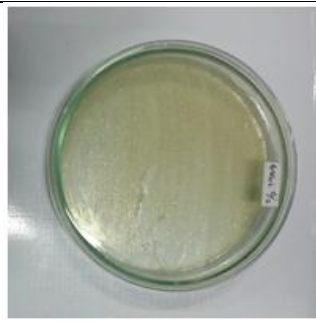

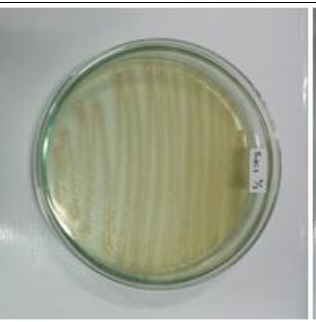
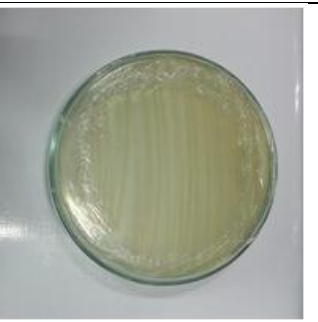
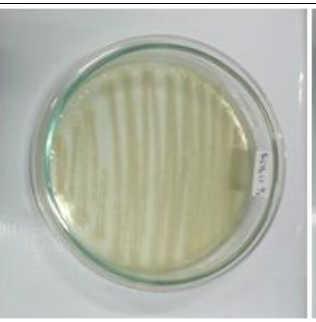
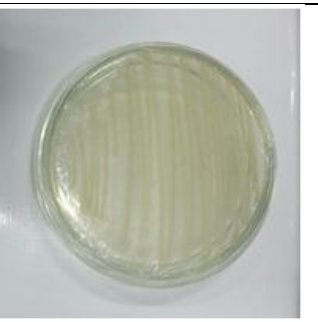
Inokulasikan media agar gelatin dengan bakteri uji lalu inkubasi selama 3 hari. Tuang perlahan permukaan dengan 10 ml larutan Asam Mercuric clorida.

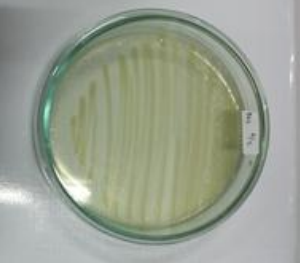



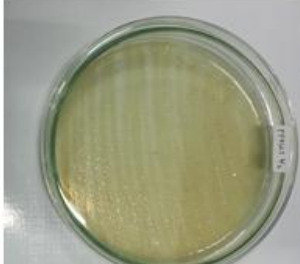

### Lampiran 6. Isolat-Isolat Bakteri *B. glumae* yang telah diisolasi

No.	Kode Isolat	Gambar Isolat	
1	CSDa		
2	CHDa		
3	CSB11		

4	CSB05K		
5	MKB03B		
6	MKBt01		
7	MKBt03		
8	MKBt04		

9	MKBT05		
10	InpDa		
11	CHBL03		
12	MrBtm2.2		
13	MrBtm2.3		

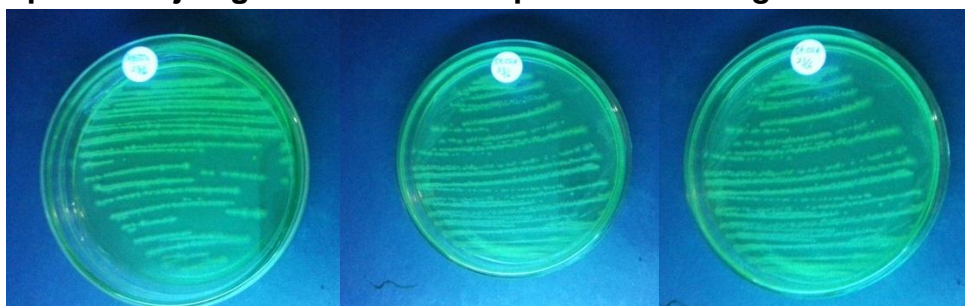
14	PKLB1		
15	BrMks1		
16	BrMks2		
17	BrGKi2		
18	BrGKa1.2		

19	SHB01		
20	SK02K		
21	PPBS01		

Lampiran 7. Uji KOH 3% dan Katalase pada bakteri *B. glumae*



Lampiran 8. Uji Pigmen fluorescens pada bakteri *B. glumae*

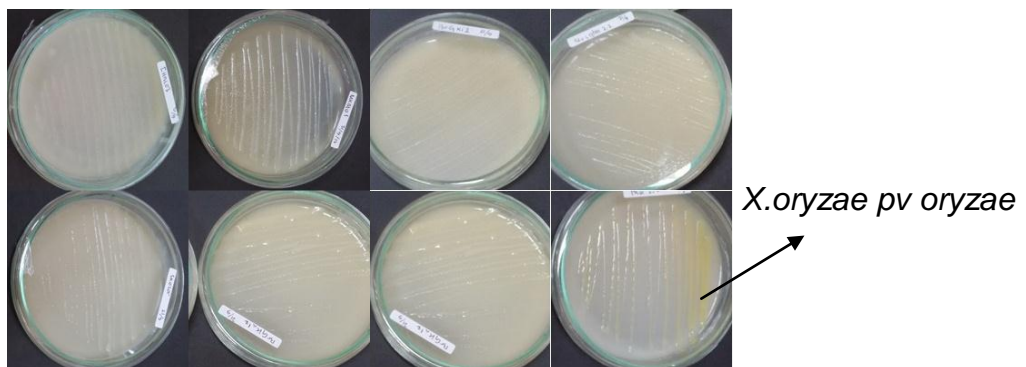




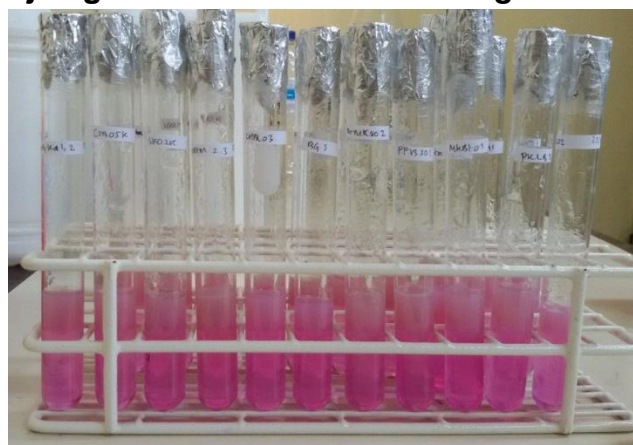
Lampiran 9. Hasil uji Oksidase/Fermentasi pada bakteri *B. glumae*



Lampiran 10. Pembentukan Koloni Kuning pada Media YDC



Lampiran 11. Uji arginin dehidrolase untuk *B. glumae*



Lampiran 12. Hasil uji oksidase kovaks untuk *B. glumae*



Lampiran 13. Hasil Uji Hipersensitif pada bakteri *B. glumae*



Lampiran 14. Hasil Uji Maserasi pada Bawang pada bakteri *B. glumae*

