

Pedoman Diagnosis

OPTK

Golongan Bakteri



DEPARTEMEN PERTANIAN
BADAN KARANTINA PERTANIAN
2008

KATA PENGANTAR

Seiring dengan semakin tingginya lalu lintas media pembawa baik yang masuk dari luar negeri (impor), keluar negeri (ekspor), maupun antar area (domestik) maka potensi pemasukan dan penyebaran OPT/OPTK golongan bakteri menjadi semakin besar.

Dalam upaya mencegah masuk dan tersebarnya OPT/OPTK golongan bakteri, dirasa perlu disusun pedoman diagnosis OPT/OPTK, mengacu pada International Standards for Phytosanitary Measure (ISPM) No.27 tentang Diagnose Protocol for Regulated Pests, untuk dapat dijadikan sebagai panduan dalam mendeteksi OPT/OPTK bakteri secara tepat dan akurat.

Dewasa ini, Badan Karantina Pertanian, belum memiliki pedoman tentang diagnosis OPT/OPTK dari golongan bakteri, sehingga pelaksanaan pengujian belum berjalan sempurna dan tidak seragam.

Tujuan dari penyusunan pedoman ini adalah menyeragamkan metode deteksi dan identifikasi OPT golongan bakteri di Unit Pelaksana Teknis lingkup Badan Karantina Pertanian, serta untuk memudahkan POPT dalam melaksanakan pengujian OPTK golongan bakteri.

Pedoman ini memuat petunjuk diagnosis penyakit yang disebabkan oleh bakteri; identifikasi genus bakteri patogen tanaman; dan metode identifikasi spesies.

Kepada semua pihak yang telah memberikan sumbangsih dalam penyusunan pedoman ini diucapkan terima kasih. Semoga bermanfaat.

Kepala Pusat Karantina
Tumbuhan,

Drs. Suwanda, ZA., M.Sc.
NIP. 19520506.197210.1.001

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR GAMBAR	iv
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan	1
1.3. Ruang Lingkup	2
1.4. Definisi	2
1.5. Dasar Hukum.....	3
II. DIAGNOSIS PENYAKIT DISEBABKAN OLEH BAKTERI	4
2.1. Diagnosis Penyakit Tumbuhan	4
2.2. Identifikasi Bakteri Penyebab Penyakit	6
2.3. Identifikasi Penyakit Baru	7
III. PREPARASI SAMPEL, EKSTRAKSI, DAN ISOLASI	10
3.1. Preparasi Sampel	10
3.1.1. Preparasi Sampel Media Pembawa Berupa Benih	10
3.1.2. Preparasi Sampel Benih yang Dikecambahkan	10
3.1.3. Preparasi Sampel Media Pembawa Berupa Tanaman/ Bagian Tanaman	12
3.2. Ekstraksi dan Isolasi Bakteri dari Sampel	12
3.2.1. Pencucian Benih	15
3.2.2. Penggerusan Benih	16
3.2.3. Inkubasi Benih Langsung pada Medium Agar	17
3.3. Ekstraksi Bakteri Patogen dari Kecambah	17
3.4. Ekstraksi dan Isolasi Bakteri Patogen dari Tanaman	18
IV. IDENTIFIKASI GENUS BAKTERI PATOGEN TANAMAN	20
4.1. Reaksi Gram	21
4.1.1. Pewarnaan Gram	21
4.1.2. Pengujian Reaksi dengan KOH	24
4.2. Pewarnaan Spora	25
4.3. Uji Oksidatif dan Fermentatif (OF)/Aerob atau Anaerob	25
4.4. Pertumbuhan pada Media DI (DIM)	27
4.5. Pertumbuhan pada Suhu 33° atau 41°, atau Suhu Tertentu Lainnya	28
4.6. Produksi Urease	28
4.7. Warna Koloni dan Konsistensi pada Agar YDC	29
4.8. Pigmen Flouresen dan Difusi Non Flouresen pada Agar KB.....	29

4.9. Uji Katalase	30
4.10. Uji Arginine dihydrolase	30
4.11. Pewarnaan Flagela	30
V. METODE IDENTIFIKASI SPESIES	34
5.1. Pengujian LOPA (Levan, Oksidase, Potato Soft Rot, Arginine dihydrolase, Tobacco hypersensitivity)	34
5.1.1. Levan	34
5.1.2. Oksidase	35
5.1.3. Pengujian Potato Soft Rot (busuk lunak pada kentang)	36
5.1.4. Arginine dehydrolase (Lelliot & Stade, 1987)	37
5.1.5. Uji Kesensitifan (Reaksi Hipersensitif)	37
5.2. Pengujian Secara BIOLOG	39
5.3. Metode Immuno Fluorescence (IF)	43
5.4. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	45
5.4.1. Prosedur Pengujian DAS-ELISA, Alkaline phosphatase label (PROTOKOL AGDIA)	46
5.4.2. Prosedur Pengujian DAS-ELISA, Peroksidase label (PROTOKOL AGDIA)	47
5.4.3. Prosedur Pengujian Indirect-ELISA, Alkaline phosphatase Label (PROTOKOL AGDIA)	48
5.4.4. Prosedur Pengujian Indirect-ELISA, Alkaline phosphatase (PROTOKOL ADGEN)	49
5.5. Metode Molekular	51
5.5.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)	52
5.6. Identifikasi Bakteri Dengan Sequencing Gen 16S r RNA	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN I	64
LAMPIRAN II	82
LAMPIRAN III	122

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Prosedur Postulat Koch untuk Identifikasi Bakteri Penyebab Brown Rot	8
Gambar 2.	Perkecambahan benih (<i>Growing On Test</i>) pada tabung reaksi (atas) dan pada cawan Petri (bawah) yang telah berisi media	11
Gambar 3.	Preparasi perkecambahan benih pada kertas towel	11
Gambar 4.	Pertumbuhan bakteri pada berbagai media agar	13
Gambar 5.	Pertumbuhan bakteri pada berbagai media agar	14
Gambar 6.	Teknik penuangan media agar pada cawan Petri	15
Gambar 7.	Pertumbuhan koloni <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> pada media semi selektif, delapan hari setelah diinkubasi pada suhu 24°C.....	15
Gambar 8.	Teknik penggoresan bakteri (metode kuadran)	19
Gambar 9.	Diagram alur Schaad untuk identifikasi bakteri penyakit tanaman tingkat genus (atau spesies atau pathovar tertentu)	20
Gambar 10.	Perbedaan dinding sel bakteri Gram Positif dengan Gram Negatif	21
Gambar 11.	Diagram langkah kerja reaksi uji pewarnaan Gram	22
Gambar 12.	Hasil pewarnaan Gram pada bakteri	22
Gambar 13.	Uji KOH nampak lengket untuk bakteri Gram Negatif	24
Gambar 14.	Hasil pewarnaan spora pada <i>Bacillus</i> sp.....	25
Gambar 15.	Uji aerob/anaerob (oksidatif-fermentatif)	27
Gambar 16.	Koloni bakteri yang tumbuh pada media YDC	29

Gambar 17.	Pigmen flouresen yang dibentuk oleh bakteri dari kelompok <i>Pseudomonas</i>	29
Gambar 18.	Uji katalase	30
Gambar 19.	Uji arginine dihydrolase	30
Gambar 20.	Perbedaan hasil uji LOPAT pada beberapa isolat <i>Pseudomonas</i>	34
Gambar 21.	Bentuk elevasi koloni bakteri pada media Levan	35
Gambar 22.	Uji oxidase	36
Gambar 23.	Uji arginine dihydrolase	37
Gambar 24.	Uji reaksi hipersensitif pada tanaman tembakau	38
Gambar 25.	Hasil reaksi positif pada plate Biolog®	41
Gambar 26.	Contoh <i>printout</i> hasil pembacaan <i>Biolog Micro Station Reader</i>	42
Gambar 27.	Perangkat Mikroskop IF dan hasil pengamatan berupa warna Flouresen disekitar sel bakteri	44
Gambar 28.	Elisa plate yang menunjukkan hasil positif pengujian <i>Erwinia stewartii</i>	45
Gambar 29.	Hasil pengujian ELISA terhadap <i>Xylella fastidiosa</i>	45
Gambar 30.	Alur pengujian metode molekuler	51
Gambar 31.	Siklus pembentukan molekul DNA baru dalam proses PCR	54
Gambar 32.	Jenis-jenis DNA polymerase dan mikroorganismen penghasil enzim tersebut	59

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pemeriksaan organisme pengganggu tumbuhan (OPT) secara mikroskopis di laboratorium di seluruh Unit Pelaksana Teknis (UPT) lingkup Badan Karantina Pertanian dituntut dapat dilaksanakan secara cepat, tepat dan akurat, agar salah satu fungsi Karantina Tumbuhan dalam hal pelayanan publik dapat terlaksana dengan baik. Dengan demikian arus lalu lintas komoditi pertanian baik yang masuk dari luar negeri (impor) ataupun yang keluar negeri (ekspor) dan juga antar pulau (domestik) dapat berjalan lancar.

UPT lingkup Badan Karantina Pertanian dalam melaksanakan pemeriksaan OPT khususnya bakteri selama ini telah menggunakan berbagai metode pengujian yang tidak berorientasi pada OPT sasaran, sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama dalam pengambilan keputusan. Hal ini disebabkan belum adanya satu panduan yang dapat digunakan dalam mendeteksi OPTK bakteri secara tepat dan akurat sesuai OPTK sasaran

International Standards for Phytosanitary Measure (ISPM) No.27 tentang Diagnose Protocol for Regulated Pests, dijadikan acuan dalam penyusunan Pedoman Diagnosis OPTK golongan Bakteri, sehingga dapat dijadikan panduan dalam Diagnosis OPTK golongan bakteri.

1.2 Tujuan

- a. Pedoman Diagnosis OPTK golongan Bakteri dapat dijadikan sebagai panduan dalam melaksanakan pemeriksaan media pembawa di laboratorium terhadap adanya infestasi OPTK golongan bakteri.
- b. Menyeragamkan metode deteksi dan identifikasi OPT golongan bakteri di laboratorium yang berorientasi pada OPT sasaran.
- c. Memudahkan POPT dalam melaksanakan pengujian OPTK golongan bakteri.

1.3 Ruang Lingkup

Pedoman Diagnosis OPTK golongan bakteri ini memuat metode-metode diagnosis yang digunakan dalam melakukan deteksi dan identifikasi OPTK golongan bakteri yang mungkin terbawa pada media pembawa.

1.4 Definisi

- a. Tumbuhan adalah semua jenis sumber daya alam nabati dalam keadaan hidup dan mati, baik belum diolah maupun telah diolah.
- b. Karantina Tumbuhan adalah tindakan sebagai upaya pencegahan masuk dan tersebarnya Organisme Pengganggu Tumbuhan dari

luar negeri dan suatu area ke area lain di dalam negeri atau keluarnya dari dalam wilayah Negara Republik Indonesia.

- c. Organisme Pengganggu Tumbuhan adalah semua organisme yang dapat merusak, mengganggu kehidupan, atau menyebabkan kematian tumbuhan.
- d. Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina adalah semua Organisme Pengganggu Tumbuhan yang ditetapkan oleh Menteri untuk dicegah masuknya ke dalam dan tersebarnya di dalam wilayah Republik Indonesia.
- e. Organisme Pengganggu Tumbuhan Golongan I adalah Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina yang tidak dapat dibebaskan dari media pembawanya dengan cara perlakuan.
- f. Organisme Pengganggu Tumbuhan Golongan II adalah Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina yang dapat dibebaskan dari Media Pembawanya dengan cara perlakuan.
- g. Organisme Pengganggu Tumbuhan Penting adalah Organisme Pengganggu Tumbuhan selain organisme pengganggu tumbuhan karantina, yang keberadaannya pada benih tanaman yang dilalulintaskan dapat menimbulkan pengaruh yang merugikan secara ekonomi terhadap tujuan penggunaan benih tanaman tersebut dan ditetapkan oleh Menteri untuk dikenai tindakan karantina tumbuhan.
- h. Media Pembawa Organisme Pengganggu Tumbuhan yang selanjutnya disebut media pembawa adalah tumbuhan dan bagian-bagiannya dan atau benda lain yang dapat membawa organisme pengganggu tumbuhan.
- i. Benih adalah tumbuhan atau bagian tumbuhan yang dapat digunakan untuk memperbanyak (dapat ditanam).
- j. Protokol Diagnostik adalah suatu tata cara yang menggambarkan tentang prosedur dan metode deteksi dan identifikasi OPTK.

1.5 Dasar Hukum

- a. Undang-undang nomor 16 tahun 1992, tentang Karantina Hewan, Ikan dan Tumbuhan.
- b. Peraturan Pemerintah nomor 14 tahun 2002, tentang Karantina Tumbuhan.
- c. Keputusan Menteri Pertanian Nomor 38/KPTS/HK.060/1/2006, tentang Jenis-jenis Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina (OPTK) Golongan I dan Golongan II Kategori A1 Kategori A2.
- d. ISPM no. 27, tahun 2006 tentang Diagnostic Protocols for Regulated Pests.

II. DIAGNOSIS PENYAKIT DISEBABKAN OLEH BAKTERI

2.1. Diagnosis Penyakit Tumbuhan

Pengertian diagnosis secara umum adalah kepastian suatu penyakit berdasarkan gejala yang tampak, sedangkan diagnosis penyakit tumbuhan menurut Lina L. Llag adalah suatu proses untuk mengidentifikasi suatu penyakit tanaman melalui gejala dan tanda penyakit yang khas termasuk faktor-faktor lain yang berhubungan dengan proses penyakit tersebut.

Diagnosis penyakit yang benar diperlukan untuk merekomendasikan cara pengendalian yang tepat dan juga diperlukan dalam suatu survei penyakit tanaman. Dalam hal ini diagnosis dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri, organisme antagonis dan produk metabolitnya.

Diagnosis penyakit tanaman berdasarkan gejala saja belum dapat diandalkan kebenarannya karena tidak memadai atau tidak cukup untuk mengidentifikasi suatu penyakit disebabkan banyak organisme bakteri yang berbeda memperlihatkan gejala yang sama pada inang yang diinfeksi. Adanya suatu tanda penyakit membantu meyakinkan kebenaran, menambah kepastian suatu diagnosa, tetapi perlu juga diperhatikan kemungkinan adanya bakteri sekunder atau saprofit yang turut serta menginfeksi bagian tanaman. Jadi mungkin saja organisme yang diperoleh dari tumbuhan bergejala penyakit bukan merupakan bakteri primer, tetapi bakteri sekunder/saprofit.

Untuk mendiagnosis penyakit tumbuhan pertama kali perlu menentukan apakah penyakit tersebut disebabkan oleh bakteri atau faktor lingkungannya. Dalam beberapa kasus apabila terdapat gejala penyakit atau terdapat tanda bakteri yang khas, maka cukup mudah bagi mereka yang telah berpengalaman untuk menentukan penyebabnya dengan membandingkan gejala yang ada dengan yang terdapat dalam berbagai buku pedoman, CD – compendium dan lain-lain. Akan tetapi pada banyak kasus pengujian yang lebih lengkap terhadap gejala dan mengamati tentang ciri-ciri lainnya sangat penting untuk mendapatkan hasil diagnosis yang tepat.

Diagnosis penyakit tanaman dan identifikasi bakteri penyebabnya sering dilakukan berdasarkan gejala dan adanya eksudat bakteri di dalam jaringan tanaman yang terserang. Cara diagnosis tersebut tergolong cepat tetapi biasanya memerlukan pengalaman luas dibidang penyakit bakteri. Pada keadaan dengan pengalaman yang masih terbatas atau diagnosis penyakit karantina yang mempunyai nilai ekonomis yang tinggi maka diagnosis yang lebih akurat sangat diperlukan. Hal ini dapat dicapai melalui prosedur isolasi dan seleksi bakteri, jika perlu dilakukan konfirmasi pengujian pada tanaman inang yang sesuai.

Namun karena bakteri berukuran kecil dimana dengan mikroskop biasa sel-sel bakteri hanya terlihat seperti titik-titik kecil, maka identifikasi berdasarkan ciri morfologi sulit dilakukan. Oleh sebab itu identifikasi perlu dilakukan dengan hati-hati untuk menghindari kesalahan. Kesalahan dapat terjadi misalnya bakteri yang ditemukan sebenarnya bakteri non bakteri, yaitu bakteri yang tumbuh pada jaringan yang sebelumnya telah dirusak oleh penyebab lain.

Untuk diagnosis penyakit tumbuhan, yang perlu dilakukan adalah :

- a. Amati gejala yaitu segala kelainan bentuk atau kelainan sifat tanaman.
- b. Pilih bagian tanaman sakit yang memperlihatkan gejala yang belum lanjut (belum rusak atau busuk keseluruhan) atau terlalu awal. Gejala yang terlalu lanjut biasanya sudah ditumbuhi cendawan serta bakteri saprofit yang sering kali mengganggu pertumbuhan bakteri utamanaya. Gejala yang terlalu awal juga menyulitkan diagnosa karena sukar memperoleh tanda penyakit.
- c. Bersamaan dengan melihat gejala ini perlu pula dilihat tanda penyakit untuk memperkuat hasil pemeriksaan gejala.
- d. Gejala dan tanda penyakit yang belum dikenal atau diragukan identifikasinya yang nampaknya penyebab penyakit tersebut belum pernah dilaporkan sebelumnya (penyakit baru) maka harus dilakukan serangkaian pengujian untuk membuktikan hipotesa bahwa bakteri yang diisolasi adalah penyebab penyakitnya melalui postulat Koch.
- e. Gejala yang disertai tanda keberadaan bakteri penyebab penyakit dapat dilakukan identifikasi lebih lanjut di laboratorium.

2.2. Identifikasi Bakteri Penyebab Penyakit

Beberapa bakteri penyakit tanaman berada pada permukaan tanaman atau di dalam tanaman (sebagian besar bakteri). Keberadaan bakteri dipermukaan atau di dalam tanaman menunjukkan bahwa bakteri-bakteri tersebut merupakan penyebab utama penyakit. Pada beberapa kasus, seseorang dengan keahlian tertentu dapat melakukan deteksi dan identifikasi langsung secara visual atau dengan bantuan kaca pembesar. Seringkali identifikasi hanya dapat dilakukan dengan bantuan mikroskop. Tidak semua bakteri tampak pada permukaan tanaman sakit, beberapa lain tampak hanya dari gejala yang ditimbulkan, khususnya untuk bakteri yang berada di dalam tanaman. Sebagian besar bakteri berada pada jaringan yang terinfeksi, antara lain pada jaringan vascular, jaringan bawah tanaman, dan atau di dalam perakaran.

Pada saat bakteri berada pada jaringan tanaman sakit, ada dua kemungkinan yang terjadi yaitu : (1) Bakteri tersebut adalah patogen penyebab utama penyakit pada tanaman tersebut, atau (2) Bakteri tersebut merupakan salah satu bakteri saprofitik atau bakteri yang dapat tumbuh pada jaringan yang telah mati.

Diagnosis penyakit bakteri dan identifikasi bakteri penyebab didasarkan pada gejala awal penyakit yang tampak pada tanaman terinfeksi, jumlah populasi bakteri pada area terinfeksi, dan ketidakberadaan patogen penyebab lainnya. Bakteri adalah mikroorganisme berukuran kecil namun dapat terlihat dengan mikroskop kompon seperti bentuk batang-batang kecil. Identifikasi bakteri sulit dilakukan jika hanya berdasarkan karakter morfologisnya. Isolasi bakteri pada media agar memerlukan kehati-hatian yang tinggi sehingga terhindar dari kontaminasi bakteri saprofit. Saat ini, telah dikembangkan beberapa media selektif yang sesuai untuk hampir semua bakteri patogen tanaman. Media ini tentu tidak sesuai untuk bakteri saprofit, sehingga dapat dipastikan bahwa pada media selektif bebas dari pertumbuhan bakteri saprofit. Hal ini akan memudahkan proses identifikasi hingga tingkat genus dan spesies.

Pada kondisi lampau, cara termudah dan terpercaya untuk membuktikan bahwa bakteri tersebut adalah patogen penyebab adalah melalui isolasi koloni tunggal dan menumbuhkan bakteri pada media, untuk selanjutnya diinokulasi kembali pada tanaman inang yang peka. Gejala yang dihasilkan dari inokulasi tersebut dibandingkan dengan gejala yang disebabkan oleh spesies bakteri yang telah diketahui sebelumnya (Agrios, 2005).

Perkembangan metode identifikasi patogen tanaman saat ini telah mengalami perubahan sejak akhir abad ke-20. Tahun 1970, teknik *immunodiagnostic*, termasuk teknik agglutinasi dan presipitasi, pewarnaan fluoresen dengan antibody, teknik ELISA, mulai digunakan untuk deteksi dan identifikasi bakteri patogen tanaman. Beberapa teknik tersebut lebih sensitif, lebih spesifik, cepat, dan mudah, dan merupakan metode yang telah distandardisasi. Hingga kini secara komersial telah tersedia antisera sebagai bahan identifikasi bakteri patogen tanaman (Agrios, 2005).

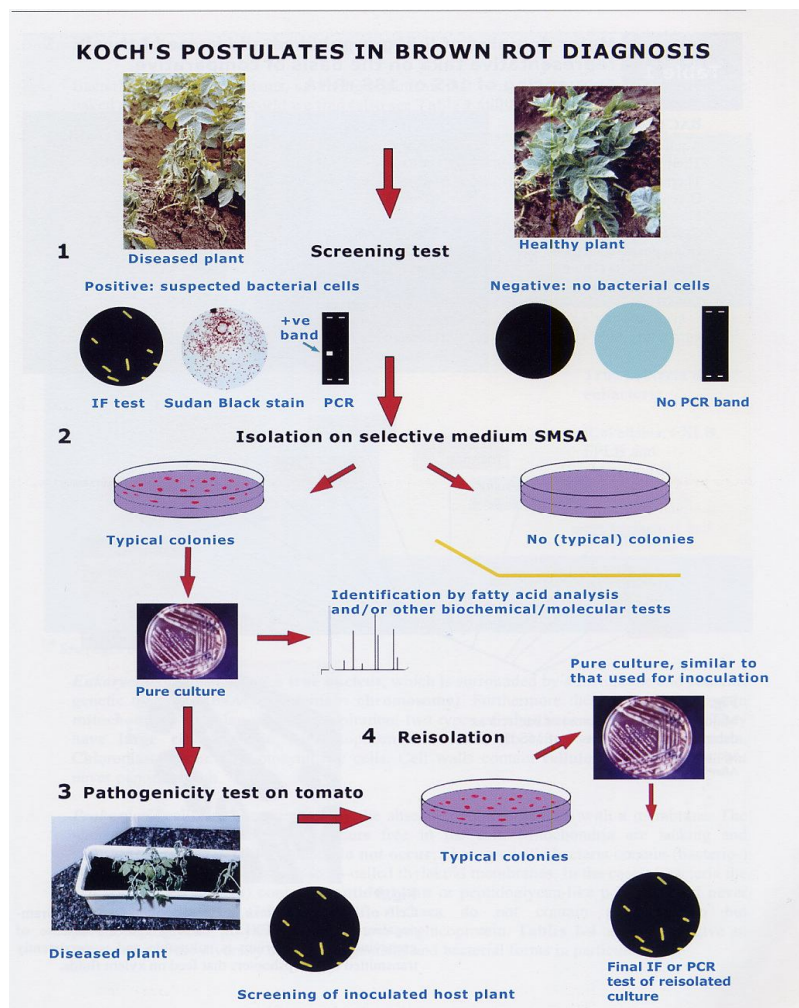
Sejak tahun 1980, teknik yang lebih baru telah dikembangkan berdasarkan penggunaan asam lemak oleh bakteri yang ada pada makanan (Biolog). Identifikasi lain yang juga berkembang adalah berdasarkan asam nukleat, dengan membandingkan jumlah DNA yang dihasilkan oleh enzim restriksi tertentu, atau derajat (persentasi) DNA yang terhibridisasi dari bakteri yang belum diketahui dengan DNA dari bakteri yang telah diketahui. Beberapa teknik molekuler tersebut saat ini digunakan untuk identifikasi bakteri patogen yang vastidious pada vascular.

2.3. Identifikasi Penyakit Baru

Ketika patogen dijumpai pada tanaman sakit, patogen tersebut diidentifikasi berdasarkan referensi hingga manual khusus identifikasi. Namun dalam beberapa hal, patogen diketahui sebagai penyebab penyakit tetapi tidak ada laporan terbaru yang mendukungnya, maka

tahap selanjutnya adalah pembuktian penyebab penyakit melalui Postulat Koch. Postulat ini dilakukan untuk memverifikasi atas hipotesis bahwa isolat patogen yang diuji adalah isolat penyebab penyakit tanaman (Agrios, 2005).

Dalam hal ini harus dilakukan serangkaian pengujian untuk membuktikannya dengan menggunakan dasar-dasar yang dikemukakan oleh Robert Koch, seorang ahli bakteriologi bangsa Jerman. Cara pembuktian ini lazim disebut postulat Koch atau kaidah Koch. Postulat Koch telah diterima secara universal sebagai pembuktian penyebab penyakit dalam hal ini untuk membuktikan hipotesa bahwa bakteri yang diisolasi adalah penyebab penyakitnya, sebagai contoh Identifikasi bakteri penyebab Brown Rot pada tomat (Gambar 1).



Gambar 1. Prosedur Postulat Koch untuk Identifikasi Bakteri Penyebab Brown Rot (Anonim, 2008) dengan tahapan sbb:

1. Screening test : ada tidaknya bakteri : IF test , PCR, mikroskop (400-10.000 x perbesaran).
2. Isolasi pada media selektif : dengan melihat tipe koloni dibuat biakan murni yang selanjutnya analisa asam lemak, uji biokimia, dan molekular.
3. Uji Patogenisitas : inokulasi pada tanaman tomat.
4. Reisolasi (isolasi kembali) dan identifikasi bakteri : tipe koloni pada biakan murni harus sama dengan isolat yang diinokulasikan pada tanaman sehat selanjutnya diidentifikasi dengan uji IF, PCR, Uji BIOLOG.

Langkah-langkah pengujian Postulat Koch adalah sebagai berikut :

- a. Organisme (bakteri) harus ditemukan berasosiasi dengan gejala penyakit yang ada (bagian tanaman yang sakit diuji).
- b. Organisme harus dapat diisolasi dari jaringan yang sakit dan dapat dibuat biakan murni.
- c. Organisme dari biakan murni harus dapat diinokulasikan pada tanaman inang yang sehat dan menghasilkan gejala penyakit yang sama dengan gejala pada tanaman sebelumnya.
- d. Organisme harus dapat diisolasi kembali (reisolasi) dari tanaman yang di inokulasi dan hasilnya harus sama dengan organisme yang dipakai untuk inokulasi.

Jika semua langkah diatas telah diikuti dan dibuktikan kebenarannya maka organisme yang di reisolasi dapat diidentifikasi sebagai organisme yang bertanggung jawab terhadap penyakit. Identifikasi lanjutan untuk penentuan spesies, sub spesies, patovar dan sebagainya, dapat dilakukan berdasarkan karakter morfologi, fisiologi dan biokimia, molekular dan sebagainya sesuai metode identifikasi yang dikemukakan pada berbagai manual atau buku pedoman lainnya.

III. PREPARASI SAMPEL, EKSTRAKSI DAN ISOLASI

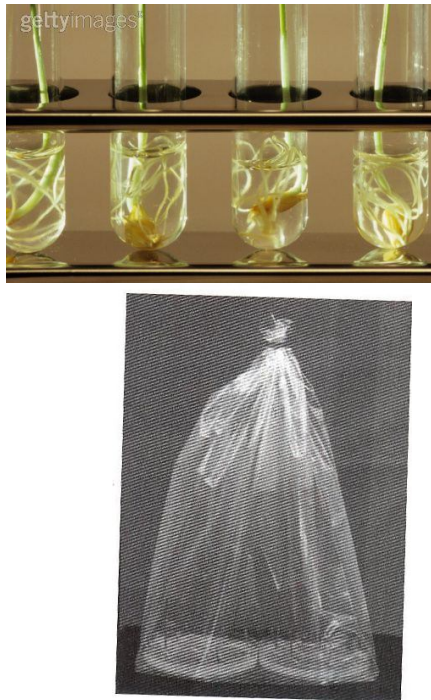
3.1. Preparasi Sampel

3.1.1. Preparasi Sampel Media Pembawa Berupa Benih

- a. Siapkan sampel uji yang diterima oleh petugas penerima sampel.
- b. Untuk menghindari kemungkinan adanya kontaminasi silang antara sampel kerja maka dilakukan sterilisasi tangan, alat-alat, dan meja kerja dengan menggunakan desinfektan (alkohol 70%).
- c. Untuk menentukan berat 1000 biji digunakan rumus berdasarkan ISTA 2006:
Perkiraan berat seribu biji (TSW) = $(\text{berat biji/jumlah biji}) \times 1000$
- d. Apabila sampel kerja tersebut tidak dapat segera dikerjakan, maka disimpan pada suhu ruang dalam kondisi masih terbungkus.

3.1.2. Preparasi Sampel Benih yang Dikecambahkan

- a. Lima lembar kertas blotter steril yang telah dilembabkan dengan akuades steril diletakkan di dalam cawan Petri tanpa ditutup.
- b. Sebanyak 10-25 benih (tergantung ukuran benih) yang sudah disterilkan permukaannya dengan merendam benih pada larutan sodium hipoklorit 1% selama 10 menit, lalu bilas dengan akuades steril sebanyak dua kali diletakkan ke dalam cawan yang telah dialasi kertas blotter lembab.
- c. Cawan Petri dimasukkan ke dalam kantong plastik bening kemudian ujungnya diikat (Gambar 2).
- d. Cara lain : (a) benih ditanam dalam tabung reaksi steril, yang berisi medium water agar dan ditutup dengan aluminium foil, (b) benih ditumbuhkan dalam nampan plastik dengan alas kertas saring yang sudah dilembabkan dengan jumlah benih yang cukup banyak kemudian dimasukkan ke dalam plastik bening, (c) metode kaset dan (d) metode kertas gulung (Gambar 3).
- e. Kantong plastik yang berisi cawan Petri atau tabung reaksi yang telah ditutup rapat diinkubasikan selama ± 14 hari dengan penyinaran 12 jam terang dan 12 jam gelap pada suhu ruang.



Gambar 2. Perkecambahan benih (*Growing On Test*) pada tabung reaksi (atas) dan pada cawan petri (bawah) yang telah berisi media (Neegard, 1997).



Gambar 3. Preparasi perkecambahan benih pada kertas towel (Anonim, 2008).

3.1.3. Preparasi Sampel Media Pembawa Berupa Tanaman/Bagian Tanaman

- a. Sampel kerja diambil dari bagian tanaman yang menunjukkan gejala penyakit disebabkan oleh bakteri.
- b. Tanaman/bagian tanaman yang bergejala dicuci dengan akuades steril, kemudian disterilkan permukaannya dengan cara merendam pada sodium hipoklorit 1% selama 10 menit lalu bilas dengan akuades steril sebanyak dua kali.
- c. Apabila sampel kerja tidak menunjukkan gejala, tanaman/bagian tanaman diambil dalam jumlah yang sesuai standar (masing-masing pengujian untuk OPTK).
- d. Apabila sampel kerja tersebut tidak dapat segera dikerjakan maka disimpan dalam almari pendingin (bukan *freezer*) pada suhu 4°C dalam kondisi masih terbungkus.

3.2. Ekstraksi Dan Isolasi Bakteri Dari Sampel

Ekstraksi bakteri adalah suatu upaya untuk mendapatkan sejumlah bakteri yang terdapat pada benih maupun jaringan tanaman yang terinfeksi dan dari tanah. Ekstraksi bakteri dari sampel media pembawa berupa benih dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu: Ekstraksi langsung dari benih (Pencucian benih dan Penggerusan benih), pertumbuhan benih langsung pada media agar, uji pertumbuhan benih.

Ekstraksi bakteri dari sampel media pembawa berupa bagian tanaman (rimpang, umbi, stek, akar, daun dan lain-lain) dapat dilakukan dengan metode yang sesuai untuk masing-masing patogen. Misalnya, metode tusuk jarum digunakan untuk mengekstraksi bakteri pada umbi kentang, metode pengguntingan daun untuk bakteri *Xanthomonas*. Ekstraksi juga dapat dilakukan dari sampel berupa tanah, misalnya dengan pengenceran berseri, pengumpanan dengan menggunakan medium tumbuh untuk bakteri target.

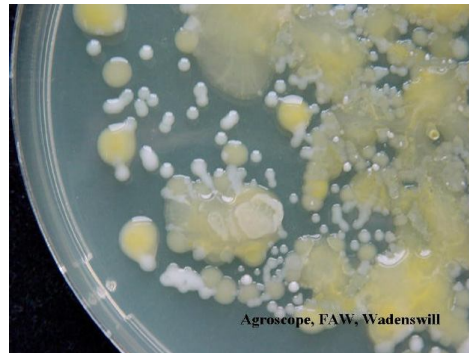
Mengisolasi bakteri patogenik yang belum diketahui spesiesnya sebaiknya digunakan beberapa macam medium agar yang bersifat umum. *Erwinia*, *Xanthomonas* dan *Agrobacterium* tumbuh dengan baik pada *nutrient glucose agar* (NGA) atau *yeast extract dextrose calcium agar* (YDC). Namun demikian ada beberapa spesies atau patovar dari genus-genus tersebut tidak dapat tumbuh dengan NGA. Sebagai contoh *E. stewartii* dan *X. campestris pv. campestris* tidak dapat tumbuh baik pada NGA tapi dapat tumbuh dengan baik pada *nutrient-broth yeast extract agar* (NBY). Bakteri *Pseudomonas fluorescens* tumbuh dengan baik dan khas pada

medium King B (KB), sedangkan *Clavibacter* spp. tumbuh dengan sangat khas pada NBY. Medium untuk *Bacillus* dan *Clostridium* adalah medium agar kasein ditambah glukose (CAG), sedangkan untuk *Streptomyces* adalah medium agar tirosin. Karakter pertumbuhan bakteri pada media (Gambar 4 dan 5) dapat digunakan untuk identifikasi.

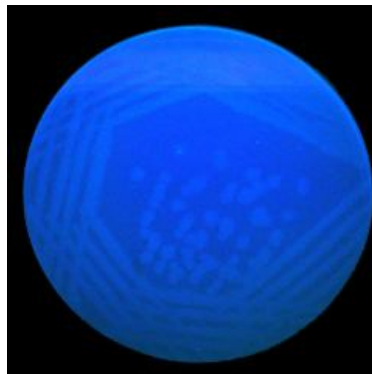
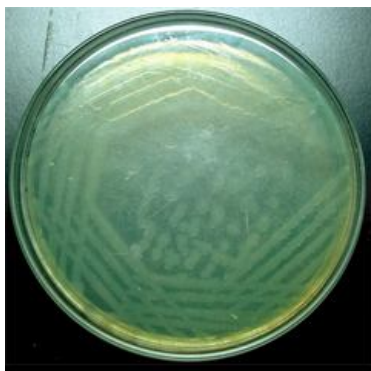
Identifikasi bakteri dengan teknik ini sangat dipengaruhi oleh keberhasilan isolasi yang ditentukan oleh kebenaran teknik penuangan media pada saat isolasi bakteri dilakukan (Gambar 6).



Pertumbuhan Cmm pada media NBY

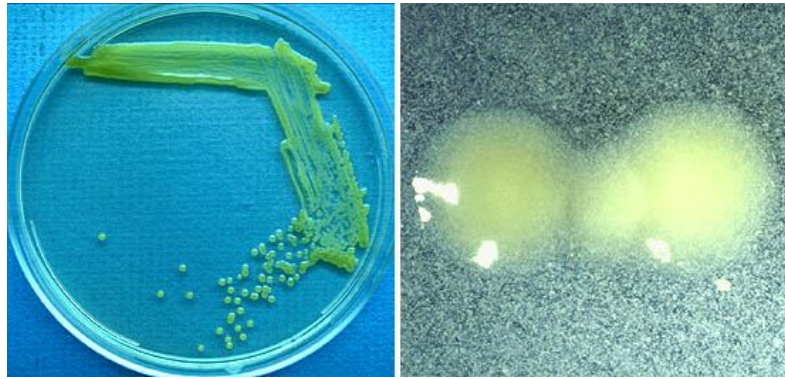


Pertumbuhan bakteri Erwinia pada agar spesifik

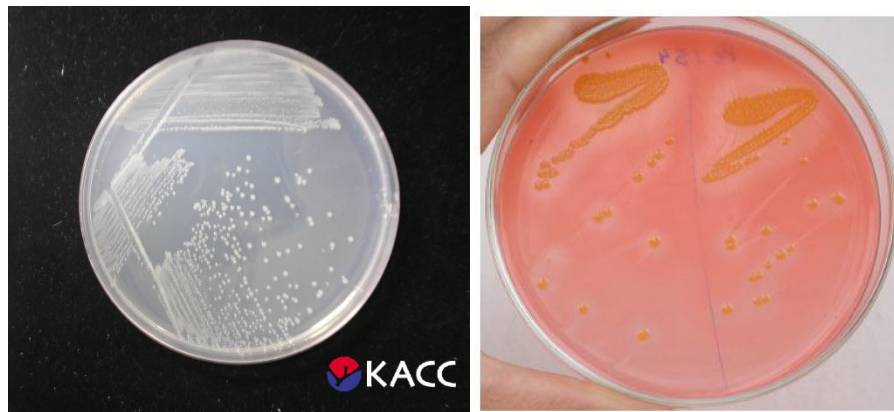


Pertumbuhan *Pseudomonas* pada media King's B (kiri) dan tampak dilihat dengan sinar UV

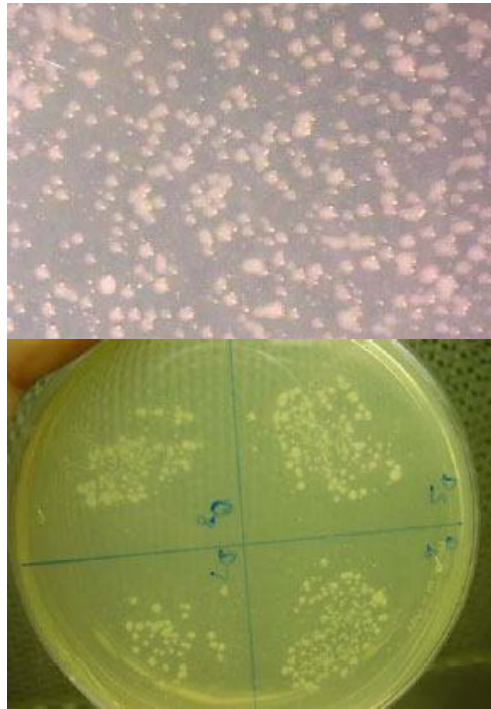
Gambar 4. Pertumbuhan bakteri pada berbagai media agar (Padil, 2008)



Pertumbuhan bakteri *Xanthomonas vesicatoria* pada media Sucrose peptone Agar

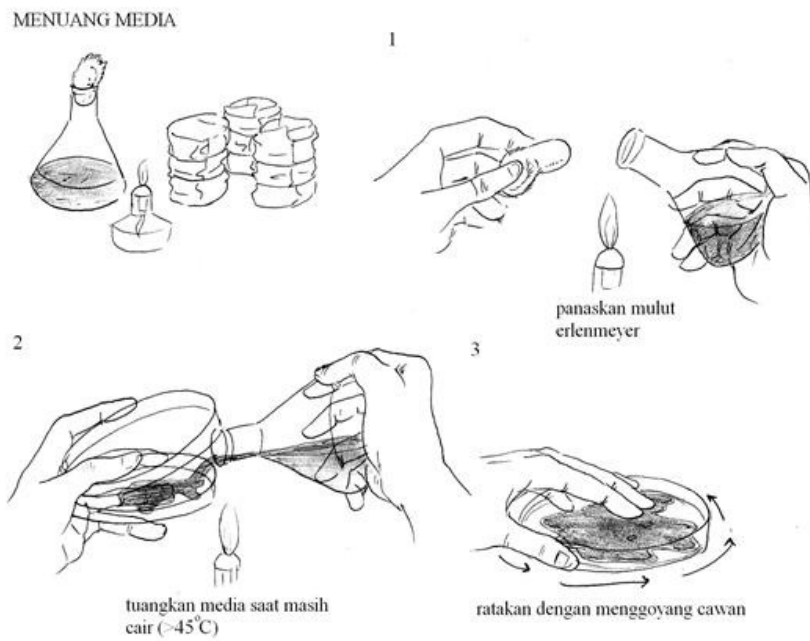


Pertumbuhan *Rhizobium rhizogenes* pada media Pertumbuhan Curtobacterium pada media CFFSM

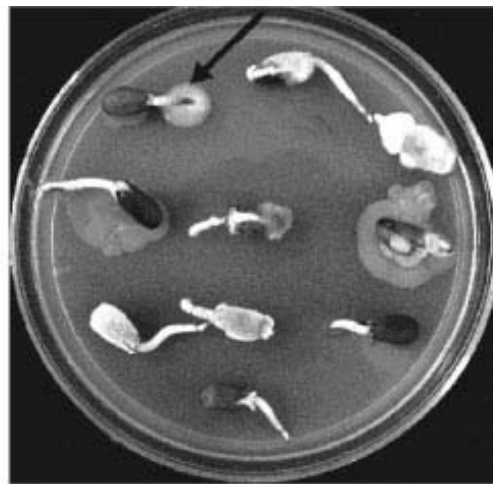


Pertumbuhan Bakteri *Xylella fastidiosa* pada media PW agar

Gambar 5. Pertumbuhan bakteri pada berbagai media agar (Anonim, 2008)



Gambar 6. Teknik penuangan media agar pada cawan Petri (Riesama, 2008)



Gambar 7. Pertumbuhan koloni *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (tanda panah) pada media semi selektif, delapan hari setelah diinkubasi pada suhu 24°C (Anonim, 2008)

3.2.1 Pencucian Benih

Langkah-langkah ekstraksi dengan pencucian benih adalah sebagai berikut:

- a. Benih sampel yang akan diuji ditimbang.
- b. Benih tersebut dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer yang berisi akuades steril sebanyak 10 kali berat biji.
- c. Tabung Erlenmeyer yang berisi benih diinkubasi sambil digoyang menggunakan penggoyang (*shaker*) pada kecepatan 200 rpm selama 16-18 jam (tergantung benih) pada suhu ruang (21°C).
- d. Suspensi bakteri yang terbentuk dibuat seri pengenceran : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , dan 10^{-8} .
- e. Dari setiap seri pengenceran diambil 100 μ l suspensi dan disebar pada medium isolasi (misal NA atau KB) dalam cawan Petri menggunakan drigalski.
- f. Cawan Petri diinkubasikan pada suhu ruang selama 24-48 jam.
- g. Koloni bakteri yang tumbuh dipisahkan dan dipindahkan ke medium yang baru (NA atau media selektif) sehingga diperoleh biakan murni.
- h. Masing-masing isolat bakteri diuji lanjut berdasarkan sifat-sifat morfologi dan fisiologi bakteri sasaran.

3.2.2 Penggerusan Benih

Langkah-langkah ekstraksi dengan penggerusan benih adalah sebagai berikut:

- a. Benih sampel yang akan diuji disiapkan.
- b. Benih sampel diblender selama beberapa menit sampai halus.
- c. Benih yang telah halus dicampur dengan akuades steril sebanyak 10 kali berat biji dalam Erlenmeyer.
- d. Erlenmeyer dimasukkan dalam kantong plastik dan ditutup rapat.
- e. Suspensi benih tersebut diinkubasikan selama beberapa menit hingga beberapa jam (tergantung jenis benihnya) pada suhu ruang.
- f. Suspensi bakteri yang terbentuk dibuat seri pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , dan 10^{-8} .
- g. Dari setiap seri pengenceran diambil 100 μ l suspensi dan disebar pada medium isolasi (misal NA atau KB) dalam cawan Petri menggunakan drigalski.
- h. Cawan Petri diinkubasikan pada suhu ruang selama 24-48 jam.

- i. Koloni bakteri yang tumbuh dipisahkan dan dipindahkan ke medium yang baru (NA atau media selektif) sehingga diperoleh biakan murni.
- j. Masing-masing isolat bakteri diuji lanjut berdasarkan sifat-sifat bakteri sasaran.

3.2.3. Inkubasi Benih Langsung Pada Medium Agar

Langkah-langkah ekstraksi dengan cara inkubasi benih langsung pada medium agar adalah sebagai berikut:

- a. Benih sampel yang akan diuji disiapkan.
- b. Benih disterilisasi permukaannya dengan sodium hipoklorit 1% dan dibilas dengan akuades steril sebanyak dua kali.
- c. Benih kemudian diletakkan pada cawan Petri yang berisi medium NA sebanyak 10-25 benih tiap cawan (tergantung ukuran benih) dan diinkubasikan pada suhu 23-27 °C selama 24-48 jam.
- d. Bakteri yang tumbuh di sekitar benih diambil dengan jarum ose, dipindahkan ke medium yang baru sehingga diperoleh koloni yang terpisah (*single colony*).
- e. Koloni bakteri yang tumbuh dipisahkan dan dipindahkan ke medium yang baru (NA atau media selektif) sehingga diperoleh biakan murni.
- f. Masing-masing isolat bakteri diuji lanjut berdasarkan sifat-sifat bakteri sasaran.

3.3 Ekstraksi Bakteri Patogen Dari Kecambah

Langkah-langkah Ekstraksi bakteri dari kecambah adalah sebagai berikut:

- a. Benih yang sudah dikecambahkan diseleksi daun atau batangnya yang bergejala, kemudian dipotong kecil (maks. 1 cm²) dengan menyertakan bagian yang sakit dan sehat.
- b. Potongan daun tersebut dicacah menjadi potongan yang lebih kecil, kemudian diletakkan pada gelas obyek dan ditetesi dengan akuades steril.
- c. Suspensi yang terbentuk dibuat seri pengenceran 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸.
- d. Dari setiap seri pengenceran diambil 100 µl suspensi dan disebarkan pada medium isolasi (misal NA atau KB) dalam cawan Petri menggunakan drigalski.
- e. Isolasi juga dapat dilakukan dengan cara mencelupkan jarum ose ke dalam suspensi kemudian digoreskan pada medium isolasi menggunakan metode kuadran (Gambar 8).
- f. Cawan Petri diinkubasikan pada suhu ruang selama 24-48 jam.
- g. Koloni bakteri yang tumbuh dipisahkan dan dipindahkan ke medium yang baru (NA atau media selektif) sehingga diperoleh biakan murni.

- h. Masing-masing isolat bakteri diuji lanjut berdasarkan sifat-sifat bakteri sasaran.

3.4 Ekstraksi Dan Isolasi Bakteri Patogen Dari Tanaman

Langkah-langkah Ekstraksi dan Isolasi dari Tanaman Terinfeksi adalah sebagai berikut:

- Tanaman/bagian tanaman yang bergejala dan sudah disterilkan permukaannya dipotong kecil – kecil.
- Potongan tersebut direndam dalam akuades steril selama waktu tertentu sesuai target bakteri dan media pembawa yang akan di ekstraksi agar bakteri keluar dari jaringan tanaman.
- Suspensi yang terbentuk dibuat seri pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .
- Dari setiap seri pengenceran diambil 50-100 μ l suspensi dan selanjutnya diisolasi sesuai dengan prosedur 3.4 bagian d.

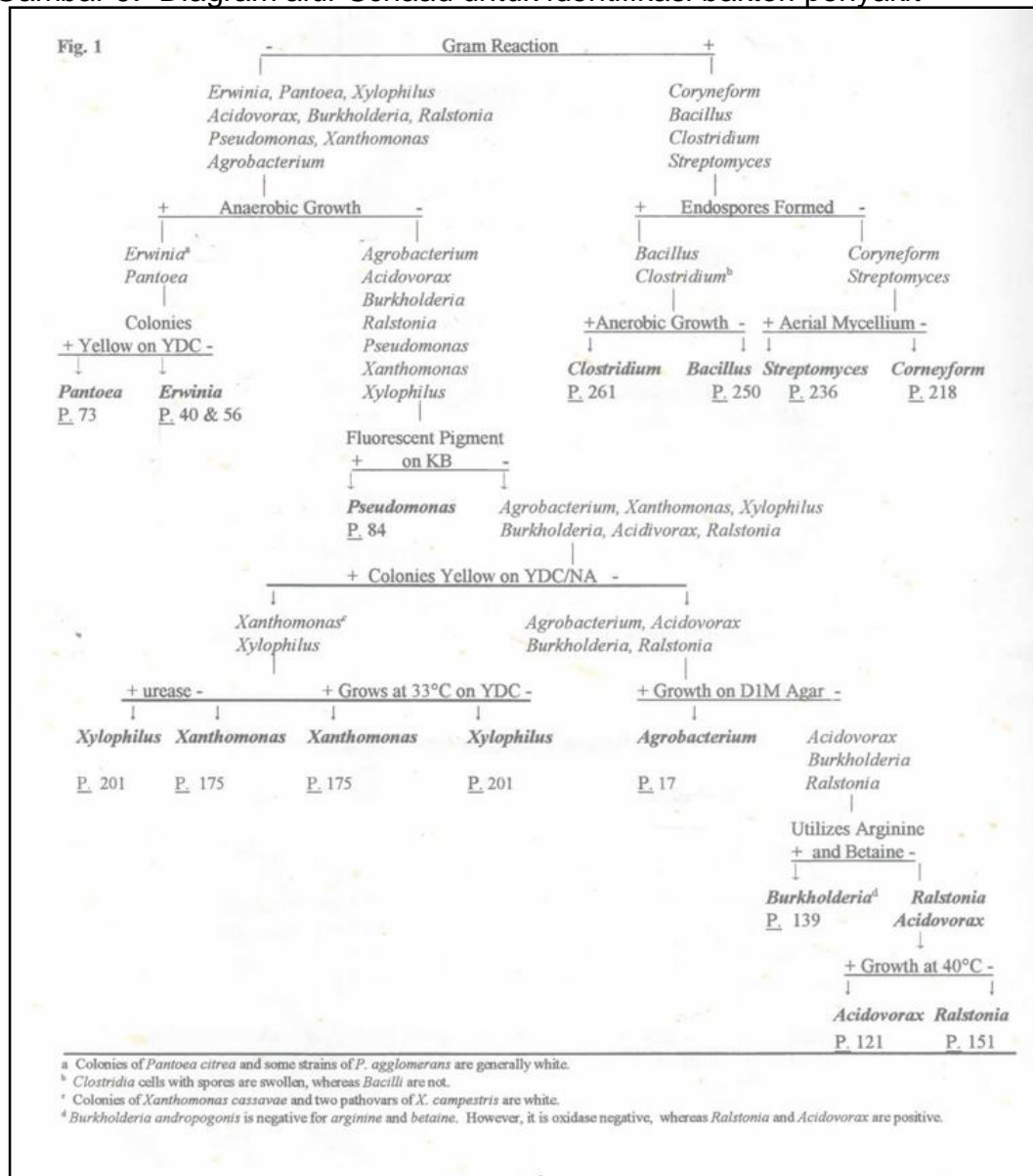


Gambar 8. Teknik penggoresan bakteri (metode kuadran) (Riesama, 2008).

IV. IDENTIFIKASI GENUS BAKTERI PATOGEN TANAMAN

Identifikasi bakteri patogen dapat dilakukan dalam beberapa metode dari konvensional hingga mutakhir, misalnya morfologi, fisiologi, biokimia, serologi dan molekuler. Untuk genus-genus penting identifikasi dapat dilakukan berdasarkan skema yang dikemukakan oleh Schaad (2001).

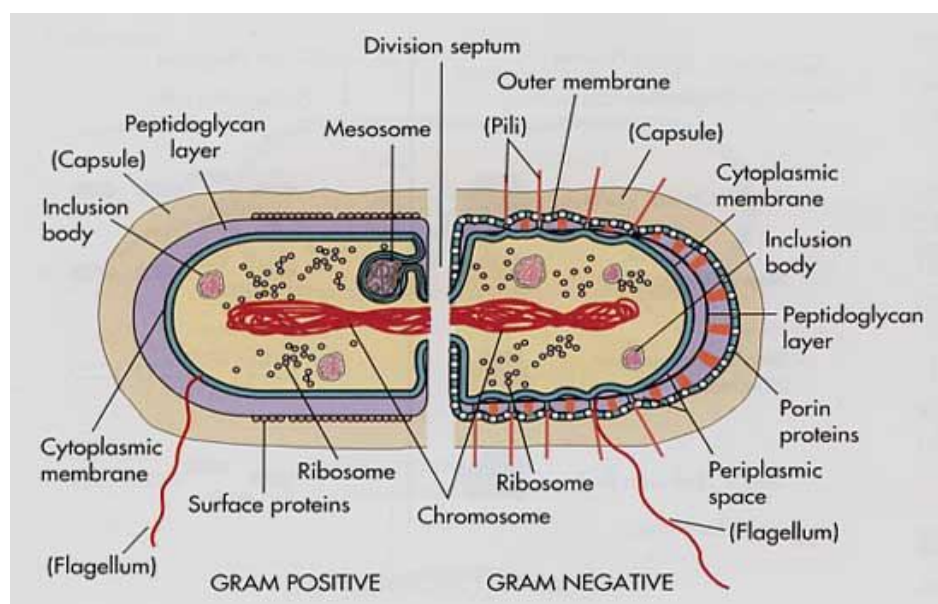
Gambar 9. Diagram alur Schaad untuk identifikasi bakteri penyakit



tanaman tingkat Genus (atau spesies atau pathovar tertentu) (Schaad, 2001)

4.1 Reaksi Gram

Pengujian reaksi Gram merupakan tahap awal dalam mengidentifikasi bakteri patogen tanaman. Pengujian dilakukan untuk membedakan bakteri kedalam dua kelompok besar berdasarkan struktur dinding sel bakteri yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pengujian reaksi Gram dilakukan dengan metode pewarnaan Gram (Gambar 10) dimana dalam metode ini selain dapat diketahui reaksi Gram dari biakan bakteri juga dapat diamati bentuk dan ukuran sel. Sebagai alternatif, uji reaksi Gram dapat dilakukan dengan uji solubilitas KOH (Potassium Hidroksida), dimana teknik ini lebih praktis dan mudah untuk dilakukan.

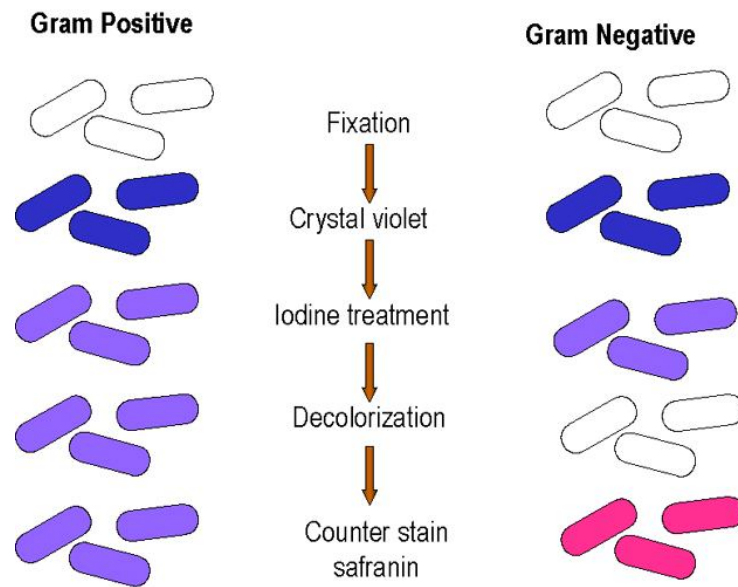


Gambar 10. Perbedaan dinding sel bakteri Gram Positif dengan Gram Negatif

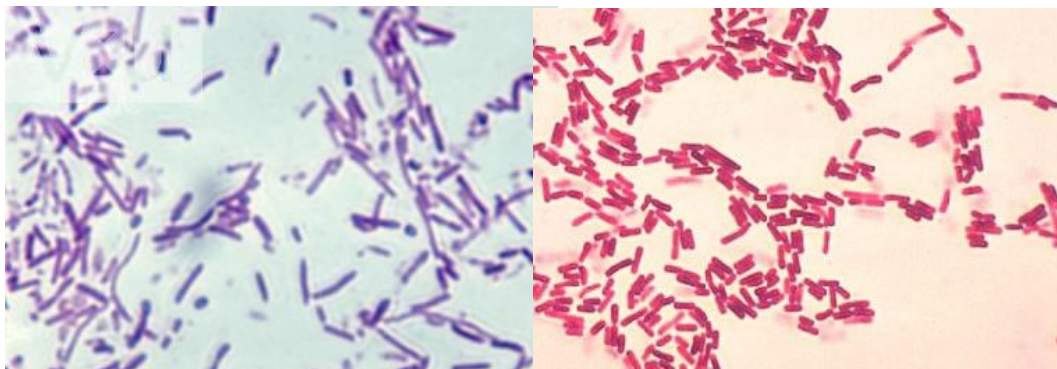
http://homepage.ntlworld.com/diamonddove/04a_Gram/Gram.html

4.1.1 Pewarnaan Gram

Pengujian pewarnaan Gram dimaksudkan untuk membedakan bakteri tergolong Gram positif atau Gram negatif. Bakteri Gram positif berwarna ungu, sedangkan Gram negatif berwarna merah, setelah diamati dibawah mikroskop kompon 1000 x perbesaran (Gambar 11). Langkah kerja pewarnaan Gram seperti pada diagram berikut ini:



Gambar 11. Diagram langkah kerja reaksi uji pewarnaan Gram (Ekmonsaurus, 2008)



Gambar 12. Hasil pewarnaan Gram pada bakteri: (a) bakteri Gram positif, (b) bakteri Gram negatif (Anonim, 2008)

Larutan Uji Gram:

a. Hucker's ammonium oxalate crystal violet

Larutan A :

Crystal violet	2,0 g
Ethyl alcohol (95%)	20,0 ml

Larutan B :

Ammonium oxalate	0,8 g
H ₂ O	80,0 ml

Campur larutan A dan B. Simpan 24 jam sebelum digunakan. Saring dengan kertas ke dalam botol penyimpanan.

b. Lugol's Iodine (modifikasi Gram's)

Iodine (I ₂)	1,0 g
Potasium Iodida (KI)	2,0 g
H ₂ O	300,0 ml

Biarkan larutan Iodine melarut beberapa jam atau satu malam pada botol gelap. Atau gerus halus Iodine dan KI dalam mortar, tambahkan air perlahan. Lanjutkan menghaluskan I dan KI, bilas dengan air yang tersisa, simpan di botol gelap.

c. Pewarna tandingan

Larutan stock :

Safranin O	2,5 g
Ethyl alcohol	100,0 ml

Larutan Kerja :

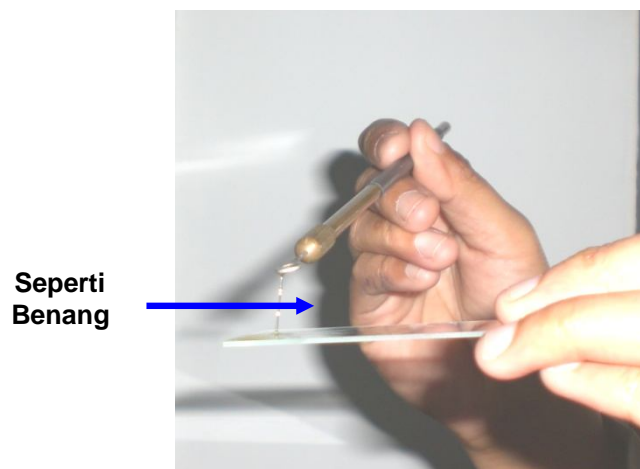
Larutan stok	10,0 ml
H ₂ O	90,0 ml

Langkah-langkah pewarnaan Gram :

- Buat olesan tipis suspensi dari koloni murni bakteri berumur 24 jam pada gelas objek yang bersih, kemudian kering-anginkan. Setelah kering, difiksasi dengan cara melewatkan bagian bawah gelas objek diatas api bunsen dua kali.
- Genangi olesan bakteri dengan larutan kristal violet selama 1 menit.
- Bilas dengan air kran selama beberapa detik, kering anginkan.
- Genangi dengan larutan iodine dan dibiarkan selama 1 menit.
- Bilas dengan air kran selama beberapa detik, kering anginkan.
- Bilas dengan alkohol selama 30 detik, kemudian kering anginkan. Pembilasan dengan alkohol (95%) tidak boleh terlalu lama, karena zat warna yang sudah terserap bakteri Gram positif mungkin akan tercuci.
- Bilas dengan air keran selama 2 detik.
- Genangi dengan safranin selama 10 detik.
- Bilas dengan air kran dengan cepat, kering anginkan.
- Amati hasil pewarnaan dibawah mikroskop kompon dengan pembesaran 1000 x menggunakan minyak emersi. Sel-sel bakteri Gram positif akan berwarna ungu hingga biru gelap sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah.

4.1.2. Pengujian reaksi dengan KOH

- Campurkan 1 loop biakan murni bakteri yang berumur antara 24-48 jam dengan 2 tetes KOH 3 % (w/v dalam H₂O), kemudian diaduk berulang kali dengan menggunakan jarum ose. Angkat jarum ose dengan cepat berkali-kali dari permukaan suspensi, amati apakah terbentuk suspensi bakteri lengket yang terangkat seperti benang bersama jarum ose.
- Apabila suspensi berubah menjadi berlendir, lengket dan terangkat seperti benang bersama jarum ose, berarti bakteri Gram negatif (-).
- Apabila suspensi tetap encer, tidak terangkat dengan jarum ose, berarti bakteri Gram positif (+).

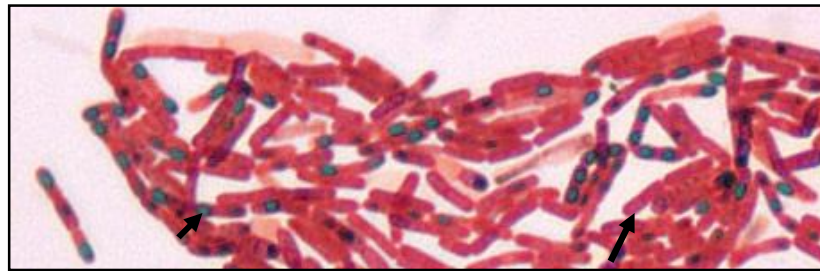


Gambar 13. Uji KOH nampak lengket untuk bakteri Gram Negatif (Foto: Titi, BBUSKP 2008)

4.2. Pewarnaan Spora

Metode pewarnaan spora dimaksudkan untuk mengetahui apakah bakteri membentuk spora. Prosedur pewarnaan spora adalah sebagai berikut :

- Buat olesan tipis suspensi dari koloni murni bakteri pada gelas objek yang bersih, kemudian kering-anginkan. Pengujian sebaiknya menggunakan biakan bakteri yang telah tua (berumur 72 jam).
- Setelah olesan bakteri mengering, genangi dengan larutan malachite green 5,0 % (w/v dalam H₂O) selama 10 menit.
- Cuci gelas objek dengan air keran yang mengalir, kemudian kering anginkan.
- Genangi olesan bakteri dengan larutan safranin 0,5% (w/v dalam H₂O) selama 15 detik.
- Bilas gelas objek dengan air keran yang mengalir, kemudian kering anginkan.
- Lakukan pengamatan sel-sel bakteri di bawah mikroskop kompon dengan pembesaran 400x (Gambar 5). Spora bakteri akan tampak berwarna hijau, sedangkan sel bakteri berwarna merah.



Spora *Bacillus* sp.
(warna hijau tua)

Sel vegetatif
(warna merah)

Gambar 14. Hasil pewarnaan spora pada *Bacillus* sp (Anonim, 2008)

4.3. Uji Oxidatif Dan Fermentatif (OF)/aerob atau anaerob

Pengujian OF dilakukan untuk mengidentifikasi isolat bakteri termasuk dalam kategori bakteri aerob atau bakteri anaerob. Perubahan warna yang terjadi pada media OF akan menentukan kategori bakteri tersebut. Apabila terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning pada tabung mengindikasikan positif untuk pertumbuhan anaerob (berarti terjadi fermentasi), begitupun sebaliknya.

Bahan yang dibutuhkan dalam 1 liter media:

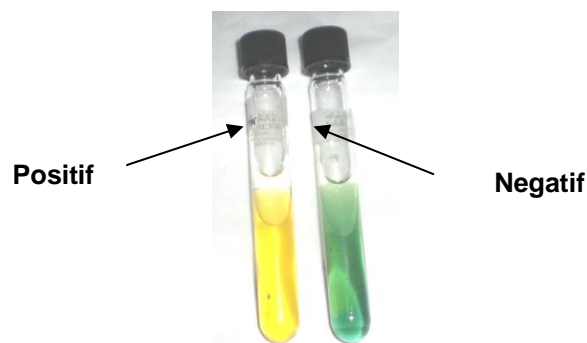
- | | |
|--------------------------------------|----------|
| a. Pepton : | 2,0 gram |
| b. NaCl : | 3,0 gram |
| c. KH ₂ PO ₄ : | 0,3 gram |
| d. Agar : | 3,0 gram |
| e. Bromotymol blue (1%) : | 3,0 ml |

Langkah kerja :

- a. Larutkan semua bahan yang telah disiapkan, sesuaikan pH media hingga 7,1.
- b. tuangkan media kedalam tabung reaksi berdiameter 13 mm sebanyak 4,5 ml per tabung,
- c. Autoclave pada temperatur 121° C selama 20 menit.
- d. Dinginkan media sampai 50°C, lalu tambahkan ke dalam tiap-tiap tabung 0,5 ml larutan glukosa 10% yang disterilkan dengan cara filtrasi atau di autoclave secara terpisah dari media.
- e. Ambil sedikit bakteri yang akan diidentifikasi menggunakan jarum inokulasi, lalu tusukkan jarum tersebut pada media. Inokulasi dua tabung. Pada salah satu tabung segera tambahkan parafin atau vaselin steril setebal 1 cm untuk menciptakan kondisi anaerob, sedangkan tabung lainnya dibiarkan dalam kondisi aerob (tanpa parafin/vaselin).

- f. Inkubasi 72 jam atau lebih pada suhu ruang.
- g. Amati perubahan warna media. Perubahan warna media menjadi kuning pada tabung yang tidak diberi parafin tetapi tidak berubah pada tabung yang diberi parafin, menunjukkan metabolisme oksidatif dari glukosa. Perubahan warna media menjadi kuning terjadi pada kedua tabung, menunjukkan metabolisme fermentatif. Jika terdapat produksi gas, akan terlihat pada tabung yang diberi parafin.

Catatan: Genus *Xanthomonas*, *Pseudomonas* cenderung mempunyai metabolisme glukosa secara oksidatif, sedangkan *Erwinia* cenderung bersifat fermentatif.



Gambar 15. Uji aerob/anaerob (oksidatif – fermentatif) (Gambar:Titi-BBUSKP, 2008)

4.4. Pertumbuhan Pada Media D1 (D1M)

Media ini digunakan untuk membedakan *Agrobacterium* sp. dari *Acidovorax*, *Burkholderia*, dan *Ralstonia*

Bahan-bahan untuk media 1 liter :

- a. Cellobiose : 5,0 gram
- b. NH₄Cl : 1,0 gram
- c. NaH₂PO₄ : 1,0 gram
- d. K₂HPO₄ : 1,0 gram
- e. MgSO₄.7H₂O : 3,0 gram
- f. Malachite green : 10,0 mg
- g. Agar : 15,0 gram

Cara Kerja :

- a. Campur dan larutkan semua bahan, atur derajat keasaman (pH) 7,0 (media berwarna biru), autoclave pada temperatur 121 °C selama 15 menit.
- b. Tuangkan media D1 pada cawan petri, biarkan media dingin dan mengeras.
- c. Pada media D 1 digoreskan bakteri yang akan diuji.
- d. Bakteri yang dapat tumbuh pada media ini menunjukkan hasil positif (+), yaitu jenis bakteri dari genus *Agrobacterium* sp.

4.5. Pertumbuhan Pada Suhu 33° Atau 41° C, atau suhu tertentu lainnya

- i. Inokulasi 5-10 ml media cair NBY, inkubasi satu malam pada suhu 25-27° C menggunakan shaker pada kecepatan 100 rpm.
- ii. Ambil 50 ul biakan menggunakan mikropipet, masukkan pada tabung reaksi yang berisi NBY cair dan inkubasikan pada suhu 41° C dengan shaker pada kecepatan 100 rpm.
- iii. Catat pertumbuhan bakteri setelah 15-24 jam.

Catatan : *Acidovorax* dapat dibedakan dengan *Ralstonia*, *Pseudomonas* dan *Burkholderia* pada pertumbuhan 41°C. Bakteri dari genus *Acidovorax* tumbuh baik pada 41°C ditunjukkan dengan perubahan media menjadi keruh. Sedangkan bila media tetap jernih menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri (genus *Ralstonia*, *Pseudomonas* dan *Burkholderia*).

4.6. Produksi Urease

Bahan-bahan yang digunakan dibawah ini merupakan hasil modifikasi dari media yeast salts broth.

Bahan- bahan media yeast salts/YS (per 800 ml):

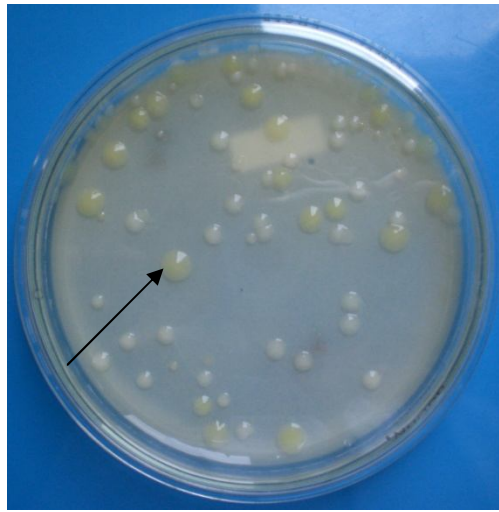
a. NH ₄ H ₂ PO ₄	:	0,5 g
b. K ₂ HPO ₄	:	0,5 g
c. MgSO ₄ .7H ₂ O	:	0,2 g
d. NaCl	:	5,0 g
e. Yeast extract	:	1,0 g
f. Cresol Red	:	16,0 mg

Setelah media di autoclave tambahkan Urea (Larutan stok) 200 ml (dengan cara menambahkan 20.0 gram Urea dalam 180 ml air dan sterilisasi dengan filter). Masukkan 5 ml media YS kedalam tabung reaksi ukuran 25 cm. Inokulasikan dengan bakteri yang akan diuji dan inkubasi dalam inkubator shaker pada suhu 28°C. Siapkan tabung kontrol berisi media tanpa urea. Peningkatan pH ditunjukkan dengan peningkatan kepekatan warna merah magenta (pH 9.0) yang membuktikan terdapat aktifitas urease.

4.7. Warna Koloni Dan Konsistensi Pada Agar YDC

Bahan dan cara pembuatan media (Lihat Lampiran 3)

Goreskan bakteri pada media agar YDC dan inkubasikan pada suhu 30°C. Setelah 48 jam lakukan pengamatan. Apabila terbentuk koloni berwarna kuning merupakan bakteri dari genus *Xanthomonas* dan *Xylophilus*.

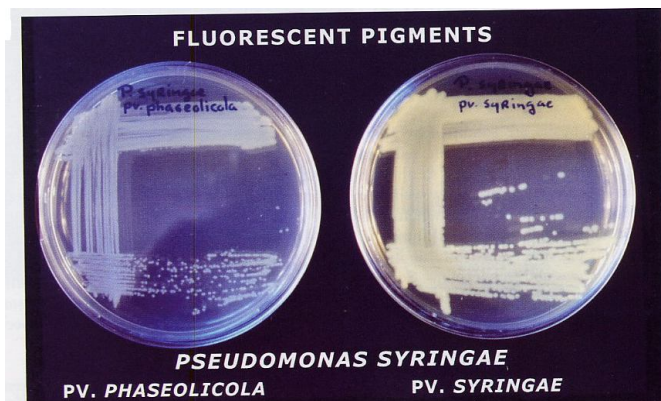


Gambar 16. Koloni bakteri yang tumbuh pada media YDC (Foto: Titi-BBUSKP,2008)

4.8. Pigmen Fluoresen Dan Difusi Non Fluoresen Pada Agar KB

Bahan dan cara pembuatan media (Lihat Lampiran 3)

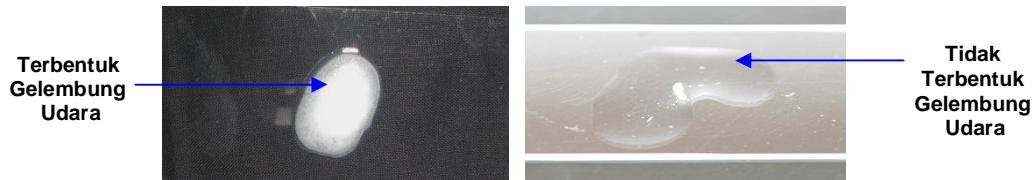
Goreskan bakteri pada media agar KB dan inkubasikan pada suhu 25°C. Setelah 48 jam diamati pada ruang gelap dengan menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm. Apabila terjadi fluoresensi merupakan bakteri dari kelompok *Pseudomonas*.



Gambar 17. Pigmen fluorensen yang dibentuk oleh bakteri dari kelompok *Pseudomonas* (Anonim, 2008).

4.11. Uji Katalase

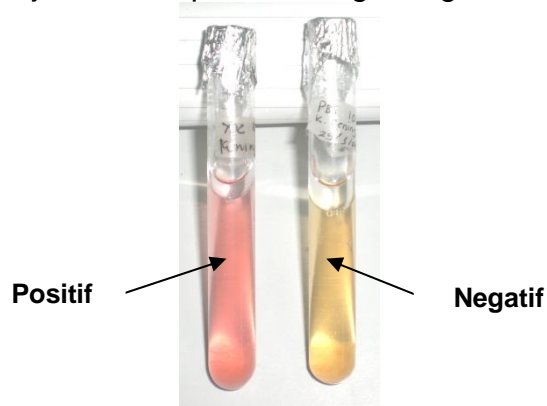
Teteskan 2 tetes larutan H_2O_2 3% pada kaca obyek, ambil 1 ose bakteri (umur 24-48 jam) dan campurkan pada larutan KOH tersebut. Terbentuknya gelembung udara mengindikasikan reaksi katalase positif.



Gambar 18. Uji katalase (kiri : reaksi positif; kanan : reaksi negatif) (Foto:Titi-BBUSKP, 2008)

4.11. Uji *arginine dihydrolase*

Inokulasikan bakteri pada bagian tengah media *arginine broth* pada *test tube*, kemudian tutup dengan vaselin/paraffin. Apabila terjadi perubahan warna menjadi merah pada tabung mengindikasikan positif.



Gambar 19. Uji arginine dihydrolase (Foto: Titi-BBUSKP, 2008)

4.11. Pewarnaan Flagela

Persiapan

- Bakteri yang akan diuji dibiakkan dalam tabung reaksi pada media standar, seperti YDC, pada suhu $27^{\circ}C$ selama 24-48 jam.
- Gunakan jenis bakteri yang telah diketahui berflagela seperti *Erwinia corotovora* sebagai kontrol.
- Setelah bakteri tumbuh, kedalam tabung dimasukkan aquades steril 1 ml hingga terbentuk suspensi yang tampak agak keruh. Usahakan media agar tidak terguncang.
- Suspensi bakteri diambil dengan jarum ose (cukup dicelupkan 1x) dicampur dengan cara hanya menyentuh jarum ose pada satu tetes aquades steril diatas gelas objek yang bersih.
- Gelas objek dikering-anginkan.

Pewarnaan

- a. Ulasan bakteri pada gelas objek digenangi dengan reagen A hingga 2-4 menit, kemudian dibilas dengan aquades.
- b. Ulasan bakteri digenangi dengan reagen B (pH 10) selama 30 detik, kemudian segera dibilas dengan aquades.
- c. Gelas objek dikering-anginkan.
- d. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop kompon dengan menggunakan minyak imersi. Bakteri dan flagela akan tampak berwarna coklat tua hingga hitam dengan latar belakang yang terang hingga keemasan.

Reagen-reagen

- a. Reagen A (Larutan asam tannat):

Asam tannat	:	5,0 gram
Feri khlorida	:	1,5 gram
Formalin 15 %	:	2,0 ml
Sodium hidroksida 1%	:	1,0 ml

Ditambah aquades steril hingga larutan menjadi 100 ml

- b. Reagen B (Larutan ammoniated silver nitrate):

Silver nitrat (2%)	100,0 ml
--------------------	----------

Pindahkan dan simpan 10 ml silver nitrat. Pada 90 ml silver nitrat, tambahkan amonium hidroksida sedikit-demi sedikit hingga terbentuk presipitasi, teruskan penambahan amonium hidroksida sampai presipitat larut seluruhnya. Kemudian larutan dititrasi dengan silver nitrat 10 ml hingga larutan sedikit keruh (*Cloudy*). Atur pH hingga mencapai 10 dengan cara menambahkan silver nitrat dan amonium hidroksida. Reagen ini hanya dapat digunakan dalam waktu kurang dari 4 jam setelah penyiapan.

Pengujian fisiologis di atas dapat dibandingkan dengan tabel daftar genus bakteri sesuai karakter pertumbuhannya pada media agar (Tabel 1). Hasil uji tersebut hanya dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri sampai tingkat genus, sedangkan untuk identifikasi sampai spesies harus dilakukan uji lanjutan. Uji lanjutan untuk identifikasi bakteri sampai spesies dapat dilakukan dengan uji Biolog. Penggunaan Biolog dalam identifikasi bakteri hanya dapat dilakukan terhadap jenis-jenis bakteri yang terdapat dalam database Biolog™, sedangkan bakteri yang belum masuk ke dalam database tidak akan teridentifikasi.

Tabel 1. Karakterisasi genus patogen tumbuhan ditumbuhkan pada media standar (Schaad *et al* 2001).

Character	<i>Erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Xylophilus</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Clavibacter</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Streptomyces</i>
Gram positive	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Grows anaerobically	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Grows aerobically	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Colonies yellow or orange on YDC, or NBY	-	+ ^a	-	-	-	-	+ ^b	+ ^c	-	+ ^d	-	-	-
Colonies mucoid on YDC at 30°C	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	ND	ND	-
Fluorescent pigment on KB	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diffusible non-fluorescent pigments on KB	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Urease	- ^e	-	+	-	+	V	-	+	ND	-	ND	ND	ND
Oxidase	-	-	+	-	+	+ ^f	-	+	-	-	-	V	+
Grows at 40°C	-	V	+	-	-	+ ^g	-	-	-	-	+	+	-
More than four peritrichous flagella	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V	-
Growth on DIM agar	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Spores formed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Aerial mycelium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ , 80% or more strains positive after five days; V, between 21-79% of strains positive; -, 80% or more strains negative; ND, not determined.

^a - Colonies of *Pantoea citrea* and some strains of *P. agglomerans* are generally white.

^b - Colonies of *X. campestris* pathovars *manihottis* and *mangiferaeindicae* are white.

^c - *Xylophilus* grows very slowly on these media, but somewhat better on Difco nutrient agar.

^d - Colonies of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* are generally white.

^e - *Erwinia nigrifluens* is positive.

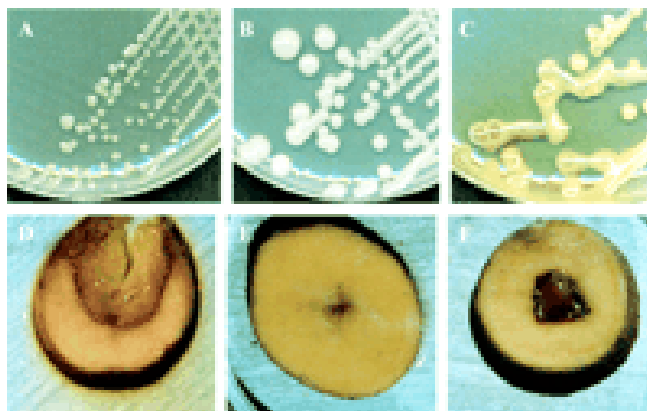
^f - *Burkholderia andropogonis* is oxidase negative.

^g - *Burkholderia andropogonis* and *B. glumae* pv. *agricola* are negative.

V. METODE IDENTIFIKASI SPESIES

5.1. Pengujian LOPAT (Levan, Oxidase, Potato soft rot, Arginine dihydrolise, Tobacco hypersensitivity)

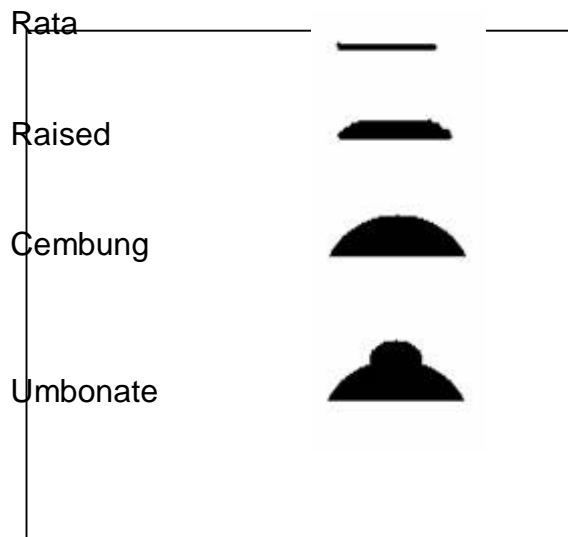
Pengujian LOPAT ini merupakan tahapan pengujian terhadap bakteri dari genus *Pseudomonas* yang berfluoresen pada medium tumbuh King B agar. Pada bakteri *Pseudomonas* kelompok fluorescent dapat diidentifikasi hingga tingkat spesies seperti *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas syringae* group, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Pseudomonas tollasii*. Dalam hasil pengujian identifikasi untuk tingkat spesies dapat melihat pada tabel referensi identifikasi secara biokimia.



Gambar. 20. Perbedaan hasil uji LOPAT pada beberapa isolate *Pseudomonas*. Pertumbuhan pada media Hypersucrose (Uji L) (A sampai C) dan uji aktivitas Pectinolitik pada irisan umbi kentang (D sampai F). (A) isolate *P. viridiflava* CECT 458 (kontrol negatif); (B) *P. syringae* pv. *syringae* CECT 4429 (kontrol positif); (C) atypical *P. viridiflava* LPPA 144; (D) *P. viridiflava* CECT 458 (kontrol positif); (E) *P. syringae* pv. *syringae* CECT 4429 (kontrol negatif); (F) atypical *P. viridiflava* LPPA 144 (Ana JG et al., 2003).

5.1.1. Levan

Pseudomonas syringae memproduksi warna putih, mengkilat, mucoid/berlendir. Tipe koloni terbentuk pada medium dengan komposisi 5% sukrose Nutrient Agar. Koloni biasanya berukuran 3-5 mm setelah diinkubasi selama tiga hari pada suhu 27°C. Uji levan untuk mengetahui tingkat koloni membentuk elevasi. Bakteri yang tergolong **Levan positif** apabila koloni yang berkembang pada Medium 5% Sukrosa Nutrient Agar berbentuk **cembung/convex** (Gambar 21). Sedangkan levan negatif maka permukaan koloni bakteri tidak cembung dan pertumbuhan koloni kurang berkembang.

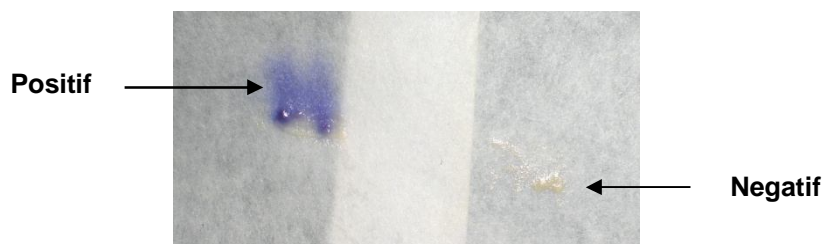


Gambar 21. Bentuk elevasi koloni bakteri pada media Levan (BBUSKP, 2009)

5.1.2. Oksidase

Pengujian oksidase adalah pengujian yang penting untuk membedakan karakteristik genus *Pseudomonas*. Pengujian ini dapat bermanfaat untuk membedakan spesies yang serupa dengan *P. syringae*. Pada *P. syringae* oksidase bersifat negatif dan spesies lain dari genus *Pseudomonas* bersifat oksidase positif. Letakkan kertas Whatman No.1 didalam petridish dan teteskan 3-4 tetes 1 % larutan tetramethyl paraphenyliene diamine dihydrochloride pada bagian tengah kertas. Letakkan 1 lup penuh bakteri yang segar telah ditumbuhkan pada medium Kings'B Agar dan goreskan pada kertas saring yang lembab. Perubahan warna reagent menjadi ungu dalam 10 detik merupakan hasil positif. Sedangkan untuk oksidase negatif maka pembentukan warna ungu setelah 30 detik (Gambar 22).

Catatan : karena tetramethyl paraphenyliene diamine dihydrochloride merupakan reagent yang mahal, maka persiapkan larutan sesuai dengan kebutuhan. Reagent dapat digunakan selama berminggu-minggu apabila disimpan dalam botol kaca yang gelap pada suhu 4°C. Hati-hati meletakkan reagent, agar tidak kontak dengan kulit.



Gambar 22. Uji oksidase (kiri : reaksi positif; kanan : reaksi negatif) (Foto: Titi-BBUSKP, 2008)

5.1.3. Pengujian Potato Soft Rot (busuk lunak pada kentang)

Cara ini untuk menguji apakah bakteri tergolong *Pseudomonas marginalis* atau bukan. Bakteri *P. marginalis* adalah penyebab busuk lunak.

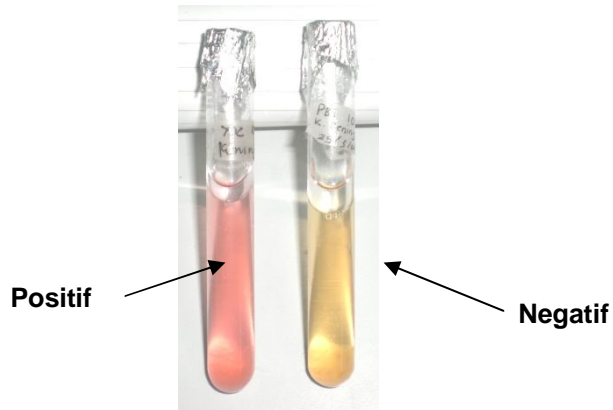
Cara pengujian yaitu :

- a. Cuci umbi kentang dan rendam dalam alkohol selama 10 detik diikuti dengan sterilisasi menggunakan pembakaran pada api bunsen
- b. Iris kentang dengan ketebalan 7-8 mm
- c. Letakkan pada kertas saring steril yang telah dilembabkan pada cawan petri atau tempat yang serupa dengan cawan petri dan tambahkan air sampai 3-4 mm pada cawan,
- d. Buat irisan melintang pada kentang dan oleskan dengan isolat bakteri berumur 24 jam pada medium agar. Buatlah preparat yang tidak diolesi oleh koloni bakteri untuk dijadikan sebagai control.
- e. Inkubasi pada tempat yang gelap dengan suhu 25°C selama 24 jam.
- f. Catatan hasil : gambar sebuah inokulasi melintang pada permukaan untuk mendeterminasi apakah diluar titik inokulasi tersebut terjadi pembusukan. Busuk ringan yang terjadi pada titik inokulasi adalah negatif. *P. marginalis* dapat menyebabkan busuk lunak tetapi pada tepi jaringan yang busuk berwarna coklat muda lebih daripada yang disebabkan oleh Erwinia.

5.1.4. Arginine Dehydrolase (Lelliot & Steade, 1987)

Arginin dyhidrolase merupakan suatu cara untuk dapat mendeteksi pertumbuhan bakteri pada kondisi anaerob dalam medium yang mengandung bahan kimia arginine.

Medium yang digunakan yaitu medium Arginine dengan pewarna phenol merah (phenol red). Inokulasi medium arginine dengan koloni bakteri, lalu ditutup dengan minyak parafin steril atau agar cair untuk menciptakan kondisi anaerob. Inkubasikan selama tiga hari pada suhu 27°C. Terjadi perubahan warna menjadi merah merupakan reaksi positif (Gambar 23).



Gambar 23. Uji arginine dihydrolase (Foto: Titi-BBUSKP, 2008)

5.1.5. Uji Kesensitifan (Reaksi Hipersensitif)

Kebanyakan bakteri patogen tanaman dapat menghasilkan reaksi hipersensitif ketika disuntikkan ke dalam jaringan daun tembakau. Bakteri non patogen dan beberapa patogen tanaman lainnya, terutama yang dapat membentuk puru, tidak menghasilkan respon hipersensitif. Reaksi ini merupakan teknik diagnosis yang baik untuk memisahkan bakteri patogenik dan non patogenik. Memasukkan suspensi bakteri kedalam jaringan daun dengan cara menyuntikan jarum halus diameter 0,4 mm diantara kedua epidermis daun, selanjutnya tekan suntikan untuk memasukan suspensi bakteri sehingga suspensi bakteri masuk ke dalam epidermis daun tanpa merusak epidermis daun. Adanya zoning (bagian tampak kebasahan) pada daun yang terisi suspensi bakteri berarti cara memasukan suspensi bakteri sudah benar.

Selanjutnya daun tembakau diberi label dan diinkubasi selama 24-48 jam. Reaksi dinyatakan positif bila terbentuk gejala nekrotik pada jaringan daun (pada daerah zoning). Sedangkan jaringan daun yang tidak mengalami perubahan hanya kekuningan berarti negatif (Gambar 24).



Gambar 24. Uji reaksi hipersensitif pada tanaman tembakau (Foto:Titi-BBUSKP, 2008)

5.2. Pengujian Secara BIOLOG

Prosedur pengujian secara biolog ini merupakan pengujian fisiologi dengan menggunakan 95 jenis gula dalam mikroplat dan 1 kontrol (tanpa gula) yang siap diinokulasi. Biakan murni bakteri dari hasil isolasi yang telah ditumbuhkan pada media tumbuh Biolog Universal Growth (BUG) berusia 24 jam pada suhu $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ untuk memacu pertumbuhan, selanjutnya diuji jenis kelompok Gram positif atau Gram negatif dan uji oksidasi tergolong oksidasi positif atau oksidasi negatif. Berdasarkan hasil hasil pengujian Gram dan uji oksidasi maka bakteri yang akan diuji dengan pengujian secara Biolog dikelompokkan dahulu menjadi bakteri golongan enterik atau bakteri golongan non-enterik. Bakteri enterik adalah bakteri Gram negatif dan oksidasi negatif. Bakteri non-enterik adalah bakteri Gram negatif dan bakteri oksidase

positif. Suspensi bakteri dipersiapkan dengan menggunakan cairan inokulan (0.1 g Gellan Gum, 4 g NaCl, 0.3 g Pluronic F-68, dan 1 L air destilasi).

Konsentrasi suspensi bakteri untuk golongan non-enterik sekitar 52% transmisi menggunakan spectrophotometer biolog's. Sedangkan bakteri golongan enterik sekitar 63%. Konsentrasi suspensi bakteri gram positif dengan transmisi sebesar 25 - 28%.

Suspensi bakteri diinokulasikan pada mikroplat disesuaikan dengan kelompok Gram bakteri (Mikroplat GN untuk bakteri Gram negatif, Mikroplat GP untuk kelompok bakteri Gram positif). Jumlah suspensi yang dimasukkan pada setiap lubang mikroplat sebanyak 145 μ L dengan menggunakan mikropipet. Mikroplat yang telah diisi suspensi selanjutnya ditutup dan diinkubasi dalam inkubator pada temperatur 28 - 30°C selama 24 jam untuk memberikan kesempatan bakteri mengubah gula.

Pembacaan hasil secara langsung dilakukan dengan memasukkan mikroplat yang telah diinkubasi kedalam *Biolog's Reader* untuk mengidentifikasi bakteri hingga spesies. Hasil Pengujian dapat terbaca terkadang setelah 4 jam, 12 jam, 18 jam atau terkadang setelah 30 jam masa inkubasi.

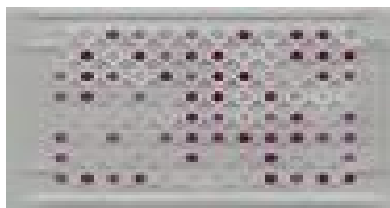
Ilustrasi untuk identifikasi bakteri dengan pengujian BIOLOG sebagaimana pada gambar di bawah (Anonymous, 2001).

TAHAPAN IDENTIKASI BAKTERI MENGGUNAKAN UJI BIOLOG



Instruksi Kerja :

- a. Siapkan isolat murni bakteri berumur 24 – 48 jam
- b. Uji KOH 3%
Teteskan 2 tetes larutan KOH 3% pada object glass, ambil 1 ose bakteri (umur 24-48 jam) dan campurkan pada larutan KOH tersebut. Bakteri gram-negatif akan terbentuk lendir, lengket, dan terlihat seperti benang apabila ose diangkat, sedangkan bakteri gram-positif tidak lengket dan tidak terlihat seperti benang apabila ose diangkat.
- c. Apabila dari uji KOH diketahui bakteri gram negatif (GN), maka dilanjutkan dengan uji Oxidase dengan cara sebagai berikut :
Teteskan larutan *Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride* 1% (larutan fresh) pada kertas saring steril. Ambil bakteri dengan loop yang terbuat dari platinum atau plastik, goreskan pada kertas saring steril yang sudah diberi perlakuan tersebut. Amati selama 10-60 detik, apabila terjadi perubahan warna menjadi ungu pada kertas saring mengindikasikan oxidase positif. Bila kertas saring tidak berubah warna mengindikasikan oxidase negatif.
- d. Ambil koloni bakteri dengan *cotton swab* steril, kemudian suspensikan dalam *GN/GP Inoculation Fluid tube* (hati-hati jangan sampai terbentuk gelembung udara).
- e. Ukur turbidity suspensi bakteri dengan Biolog Turbidimeter sampai nilai suspensi sesuai dengan standar.
- f. Tambahkan 3 tetes *Thioglycolate* pada suspensi bakteri yang telah diukur turbidity, campur perlahan, kemudian tuangkan ke *reservoir* petridish steril.
- g. Ambil mikroplate Biolog (GN2 : untuk bakteri gram negatif; atau GP2 : untuk bakteri gram positif).
- h. Masukkan suspensi bakteri sebanyak 150 µl per well (sumuran) dengan mikropipet 8-channel.
- i. Inkubasikan pada temperatur sesuai petunjuk pada tabel selama 4-6 jam; atau 16-24 jam. Amati perubahan warna menjadi ungu (Gambar 25).
- j. Baca dengan *Biolog MicroStation Reader*. Contoh hasil pembacaan (Gambar 26).



Gambar 25. Hasil reaksi positif pada plate Biolog®

```

Program           : MicroLog3 4.20.04
Save To File      : C:\Biolog420\DataFiles\168-R5.D4C
Unrestricted Access? : Yes
Read Time        : Jun 26 2008 15:23
Parent File      : Original Data Record
Plate Number     : 4
Incubation Time  : 16-24
Sample Number    :
Strain Type      : GN-ALL
Strain Number    : Krem
Strain Name      : 184-220
Other            :
Data Input Mode  : Reader
590/750 Filters Used : 6 / 5
Threshold Mode   : Automatic: Color: 58/141
Number +/- Reactions : 32 / 17 / 47
Database To Search : MicroLog
Data Base(s) Searched : C:\Biolog420\Databases\GN601.KID

```

Plate Type: GN2

Key : <X>: positive; <X-: mismatched positive; X: negative; X+: mismatched negative
{X}: borderline; -X: less than A1 well

Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	1	51	{ 122}	{ 94}	{ 116}	-17	-25	-32	< 578-	-28	22
B	-35	< 189-	20	< 149-	{ 62}	< 299>	-24	-15	-26	-20	-34	{ 117}
C	5	16	{ 93}	-7	4	-11	-26	-11	{ 87}	-19	40	{ 109}
D	{ 125}	< 400>	< 386>	< 345>	-30	< 384>	< 374>	-30	< 323>	-1	< 239>	-6
E	17+	{ 65}	-8	< 357>	35	< 314>	{ 129}	< 256>	< 275>	< 332>	-32	< 201>
F	< 222>	33	{ 77}	{ 125}	{ 107}	< 155>	26	< 496>	< 407>	< 414>	-9	-30
G	< 296>	< 381>	{ 64}	< 306>	57	< 521>	< 370>	26+	< 179>	42	< 182>	< 355>
H	-19	{ 64}	3	7	< 282>	< 371>	{ 139}	24	35	-9	-24	16

=> Species ID: Pseudomonas maculicola <=

Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1) Pseudomonas maculicola	100	0.68	4.93	GN-NENT OXI+
2) Pseudomonas putida biotype A	0	0.00	7.11	GN-NENT OXI+
3) Pseudomonas viridilivida	0	0.00	7.69	GN-NENT OXI-
4) Pseudomonas putida	0	0.00	8.09	GN-NENT OXI+
5) Pseudomonas putida biotype B	0	0.00	8.73	GN-NENT OXI+
6) Pseudomonas corrugata	0	0.00	10.00	GN-NENT OXI+
7) Pseudomonas fluorescens biotype G	0	0.00	10.16	GN-NENT
8) Pseudomonas resinovorans	0	0.00	10.25	GN-NENT OXI+
9) Pseudomonas taetrolens	0	0.00	10.48	GN-NENT OXI+
10) Pseudomonas mendocina	0	0.00	10.82	GN-NENT OXI+
Other)				

Print Time = Jun 26 2008 15:28

Page 1 of 1 pages

Gambar 26. Contoh *printout* hasil pembacaan *Biolog MicroStation Reader* (BBUSKP, 2008)

5.3. Metode Immuno Flouresence (IF)

Metode identifikasi Immuno Flouresence yaitu suatu metode yang dalam diagnosis nya mengamati reaksi antara bakteri dengan anti serum spesifik untuk bakteri tersebut (serodiagnostic), dibawah mikroskop majemuk yang dilengkapi komponen floresensi (seperti flouresence isothyocyanate, FITC). Pada saat konjugat *antibody* mengikat bakteri akan terjadi reaksi yang dapat dilihat dibawah mikroskop yang menggunakan sinar ultra violet dan filter floresensi dengan menggunakan warna yang sesuai. Sel bakteri yang telah terikat dengan antiserum dapat diamati dengan adanya floresensi berwarna hijau sekitar dinding sel bakteri.

Dua macam Metode IF yang biasa digunakan yaitu: Metode langsung (*Direct immunoflourescence technique*) dan metode tidak langsung.

Metode tidak langsung (*Indirect immunoflourescence technique*):

- a. Pipet 25 ul dari 10^6 sel/ml suspensi bakteri untuk setiap masing-masing preparat (*window*) yang merupakan *plastic-coated multiwindow* pada mikroskop floresensi
- b. Selanjutnya kering anginkan selama 1 jam atau dengan menggunakan *blower*.
- c. Lekatkan (Fix) dengan memberi ethanol 96%, selama 10 menit.
- d. Cuci dengan aquades steril 2x5 menit, lalu kering anginkan
- e. Tambahkan 25 ul untuk masing-masing preparat dengan antiserum yang telah diencerkan dengan 0,01 M PBS, Ph 7,2 dan tambahkan preparat terakhir dengan 25 ml PBS sebagai kontrol.
- f. Inkubasikan preparat selama 30 menit pada suhu ruang diatas kertas saring yang basah dalam ruang yang gelap dan lembab
- g. Kocok dan bilas dengan PBS selama 3x5 menit, kemudian dikering anginkan. PBS yang digunakan untuk mencuci adalah 0,001 M. Dari semua tahapan, setiap preparat harus diberi perlakuan secara individual untuk menghindari adanya kontaminasi silang.
- h. Pipet 25 ml dari pada masing-masin preparat dengan goat anti rabbit gamma globulin-FITC conjugate yang telah diencerkan 1:50-1:400
- i. Inkubasikan preparat selama 30 menit pada suhu ruang diatas kertas saring yang basah dalam ruang yang gelap dan lembab
- j. Kocok dan bilas dengan PBS selama 3x5 menit, kemudian dikering anginkan. PBS yang digunakan untuk mencuci adalah 0,001 M. Dari semua tahapan, setiap preparat harus diberi perlakuan secara individual untuk menghindari adanya kontaminasi silang.
- k. Pipet 10 ul 0,1 mol phospate buffer glycerine dengan pH 7,6 untuk masing preparat dan tutup dengan gelas penutup
- l. Amati dibawah mikroskop dengan pembesaran 60x100 (menggunakan minyak imersi). Dimulai dari preparat kontrol, jika tidak memperlihatkan adanya floresensi terhadap antiserum yang paling encer maka dimulai dari pengenceran yang lebih kecil (Gambar 27).
- m. Catat dan lakukan pengamatan.

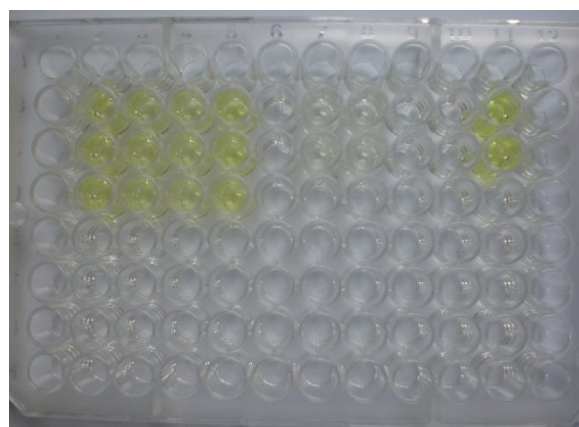


Gambar 27. Perangkat Mikroskop IF dan hasil pengamatan berupa warna flouresen disekitar sel bakteri (BBUSKP,2005)

5.4. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Reaksi ELISA merupakan reaksi spesifik antara antigen dan antibodi. Reaksi ini dapat diketahui hasilnya melalui perubahan warna yang ditunjukkan pada akhir reaksi (Gambar 28 dan 29). Reaksi berupa perubahan warna yang ditunjukkan secara kualitatif tersebut dapat dikuantitatifkan melalui alat pembaca yang disebut ELISA *reader*. Instruksi kerja pada metode ini sangat bergantung pada produsen kit antisera.

Instruksi kerja dilakukan sesuai dengan protokol yang disediakan oleh produsen antisera (Agdia, Adgen, LCA Biotest, dll).



Gambar 28. Elisa plate yang menunjukkan hasil positif pengujian *Erwinia stewartii* (BBUSKP, 2008)



Gambar 29. Hasil pengujian ELISA terhadap *Xylella fastidiosa* (BBUSKP, 2008)

5.4.1. Prosedur Pengujian DAS-ELISA, Alkaline phosphatase label (PROTOKOL AGDIA) sebagai berikut :

1. Buat denah/*lay out* pengujian.
2. Isi lubang mikroplate dengan 100 μ l antibodi yang telah dilarutkan dalam coating buffer dengan perbandingan 1:200 (v/v). Lakukan duplo pada setiap sampel (2 ulangan/2 lubang plate ELISA).
3. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu ruang selama 4 jam atau pada suhu 4^o C selama 1 malam.
4. Selesai inkubasi, kosongkan mikroplate dan cuci dengan 4-8 kali dengan larutan PBST (1X). Kemudian keringkan mikroplate dengan cara dibalik dan ditepuk-tepukan pada permukaan yang telah dialasi kertas towel.
5. Isi lubang mikroplate dengan sampel, kontrol positif dan kontrol negatif sebanyak 100 μ l. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu ruang selama 2 jam atau pada suhu 4^o C selama 1 malam.
6. Cuci mikroplate seperti pada tahap 4.
7. Larutkan *conjugate* dengan *conjugate buffer* dengan perbandingan 1:200 (v/v). Masukkan 100 μ l *conjugate* ke dalam setiap sumur uji. Inkubasikan *microplate* pada suhu ruang selama 2 jam dalam kotak lembab. Siapkan enzim *conjugate* 10 menit sebelum digunakan.
8. Cuci mikroplate seperti pada tahap 4.
9. Siapkan larutan PNP dalam substrat buffer sesaat sebelum digunakan (kira-kira 15 menit sebelum waktu inkubasi berakhir) dengan perbandingan sesuai aturan dari produsen (1:1), 1 tablet 5 mg:5 ml PNP Buffer. Jangan sentuh PNP dengan tangan atau terpapar cahaya yang kuat. Isi mikroplate dengan 100 μ l larutan PNP. Inkubasi mikroplate pada suhu ruang dalam kotak lembab selama 15 - 60 menit. Untuk menghentikan reaksi tambahkan 50 μ l NaOH 3M.

10. Pengamatan secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada larutan. Bila terjadi perubahan warna pada sumur uji dari bening menjadi kuning, maka mengindikasikan bahwa sampel yang diuji positif.
11. Pembacaan hasil juga dilakukan dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil dikatakan positif apabila nilai sampel lebih dari atau sama dengan dua kali rata-rata nilai kontrol negatif.

5.4.2. Prosedur Pengujian DAS-ELISA, Peroksidase label (PROTOKOL AGDIA) sebagai berikut :

1. Buat denah/*lay out* pengujian.
2. Isi lubang mikroplate dengan 100 µl antibodi yang telah dilarutkan dalam coating buffer dengan perbandingan 1:200 (v/v). Tiap sampel diduplo (2 ulangan/2 lubang plate ELISA).
3. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu ruang selama 4 jam atau pada suhu 4° C selama semalam (tidak boleh lebih dari 24 jam).
4. Selesai inkubasi, kosongkan mikroplate dan cuci dua kali atau lebih dengan larutan PBST (1X). Kemudian keringkan mikroplate dengan cara dibalik dan ditepuk-tepukan pada permukaan yang telah dialasi kertas towel.
5. Isi lubang mikroplate dengan sampel, kontrol positif dan kontrol negatif sebanyak 100 ul. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu ruang selama 2 jam atau pada suhu 4° C selama semalam.
6. Selesai inkubasi, Kosongkan mikroplate dan cuci dengan 8 kali dengan larutan PBST (1X). Kemudian keringkan mikroplate dengan cara dibalik dan ditepuk-tepukan pada permukaan yang telah dialasi kertas towel.
7. Larutkan *conjugate* dengan *MRS Component* dengan perbandingan 1:200 (v/v). Masukkan 100 µl *conjugate* ke dalam setiap sumur uji. Inkubasikan *microplate* pada suhu ruang selama 2 jam dalam kotak lembab. Siapkan Enzim *conjugate* 10 menit sebelum digunakan.
8. Cuci mikroplate seperti pada tahap 6.
9. Isi mikroplate dengan 100 µl TMB peroxidase substrate. Inkubasi mikroplate pada suhu ruang dalam kotak lembab selama 20 menit.
10. Pengamatan secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada larutan. Bila terjadi perubahan warna pada sumur uji dari bening menjadi biru, maka mengindikasikan bahwa sampel yang diuji positif.
11. Pembacaan hasil juga dilakukan dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 650 nm. Hasil dikatakan positif apabila nilai sampel lebih dari atau sama dengan 2 kali rata-rata nilai kontrol negatif.

Catatan :

- a. Penyiapan sampel : gerus sampel yang akan diuji dalam ekstrak buffer) dengan perbandingan 1 gram (sampel) : 10 ml (general extract buffer/ MEB extract buffer); sesuaikan dengan protokol produk.
- b. Sebelum digunakan, bahan uji dihomogenkan terlebih dahulu dengan vortex.
- c. Apabila kotak lembab tidak tersedia, sebagai alternatif masukkan 100 µl akuades ke dalam setiap sumuran yang terletak pada semua bagian tepi *microplate*.
- d. Hindari keberadaan jaringan tanaman atau gelembung udara pada saat pencucian *microplate*. Jika masih dijumpai jaringan tanaman atau gelembung udara maka pencucian diulangi.

5.4.3. Prosedur Pengujian Indirect-ELISA, Alkaline phosphatase label (PROTOKOL AGDIA) sebagai berikut :

1. Buat denah/*lay out* pengujian.
2. Sampel : *Coating buffer* (0.5 g : 2 ml), kemudian gerus sampai halus. Bufer bisa ditambahkan apabila ekstrak terlalu kental. Sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 2 menit, buang supernatan. Larutkan pelet dengan 1 ml PBS buffer 1X, vortex; Sentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama 2 menit, buang supernatan. Larutkan pelet dengan 1 ml PBS buffer 1X, vortex; Sentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama 2 menit, buang supernatan. Larutkan pelet dengan 1 ml PBS buffer 1X, vortex; Sentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama 2 menit, buang supernatan. Larutkan pelet dengan *Coating buffer* , vortex.
3. Masukkan sampel, Kontrol (-), Kontrol (+), dan bufer ; masing-masing 100 µl per well. Lakukan duplikasi.
4. Tutup plate, inkubasikan pada 37 °C selama semalam sampai kering.
5. Tambahkan *blocking buffer* masing-masing 200 µl per well. Blocking solution : 5 % nonfat dried milk dalam PBS Buffer (0.05 g blocking component per 1 ml PBS Buffer).
6. Tutup plate, inkubasikan pada suhu ruang selama 30 menit.
7. Cuci plate dengan PBST 1 X, keringkan dengan kertas towel.
8. Larutkan *antibody* dengan *dilution buffer* (2.5 % nonfat dried milk dalam PBST); kemudian masukkan masing-masing 100 µl per well.
9. Tutup plate, inkubasikan pada suhu ruang selama 1 jam.
10. Cuci plate 5 kali dengan PBST 1 X, keringkan dengan kertas Towels.
11. Larutkan *Enzyme conjugate* dengan *dilution buffer* (2.5 % nonfat dried milk dalam PBST); kemudian masukkan masing-masing 100 µl per well.
12. Tutup plate, inkubasikan pada suhu ruang selama 1 jam.

13. Cuci plate 5 kali dengan PBST 1 X, keringkan dengan kertas Towels.
14. Larutkan PNP dengan PNP bufer 1 mg/1ml (1 tablet/5 ml); kemudian masukkan masing-masing 100 µl per well.
15. Tutup plate, inkubasikan dalam box lembab pada suhu ruang selama 30-60 menit. Untuk menghentikan reaksi tambahkan 50 ul NaOH 3M.
16. Pengamatan secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada larutan. Bila terjadi perubahan warna pada sumur uji dari bening menjadi kuning, maka mengindikasikan bahwa sampel yang diuji positif.
17. Pembacaan hasil juga dilakukan dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil dikatakan positif apabila nilai sampel lebih dari atau sama dengan 2 kali rata-rata nilai kontrol negatif.

5.4.4. Prosedur Pengujian Indirect – ELISA, Alkaline phosphatase label (PROTOKOL ADGEN) sebagai berikut :

1. Buat denah/*lay out* pengujian. Siapkan sampel dan *Coating buffer* dengan perbandingan 0.5 g : 2 ml, kemudian gerus sampai halus. Bufer bisa ditambahkan apabila ekstrak terlalu kental.
2. Masukkan sampel, Kontrol (-), Kontrol (+) ; masing-masing 100 µl per well. Lakukan duplikasi. Tiap sampel diduplo (2 ulangan / 2 lubang plate ELISA).
3. Tutup plate, inkubasikan pada 4 °C selama semalam.
4. Cuci plate minimal 3X dengan PBST 1 X, keringkan dengan kertas towel.
5. Tambahkan *blocking buffer* masing-masing 200 µl per well.
6. Tutup plate, inkubasikan pada 37 °C selama 1 jam.
7. Cuci plate seperti pada poin 5.
8. Larutkan *antibody* dengan *PAb dilution buffer* ; kemudian masukkan masing-masing 100 µl per well.
9. Tutup plate, inkubasikan pada 37 °C selama 2 jam.
10. Cuci plate seperti pada poin 5.
11. Larutkan *Enzyme conjugate* dengan *PAb dilution buffer/Conjugate buffe* ; kemudian masukkan masing-masing 100 µl per well.
12. Tutup plate, inkubasikan pada 37 °C selama 1 jam.
13. Cuci plate 4X dengan PBST 1 X, keringkan dengan kertas towel. Pencucian lebih extra untuk membersihkan sisa-sisa conjugate.
14. Larutkan pNPP dengan substrate buffer/pNP bufer 1 mg/1ml (1 tablet/5 ml); kemudian masukkan masing-masing 100 µl per well.
15. Tutup plate, inkubasikan pada suhu ruang, diruang gelap selama sampai dengan 1 jam.

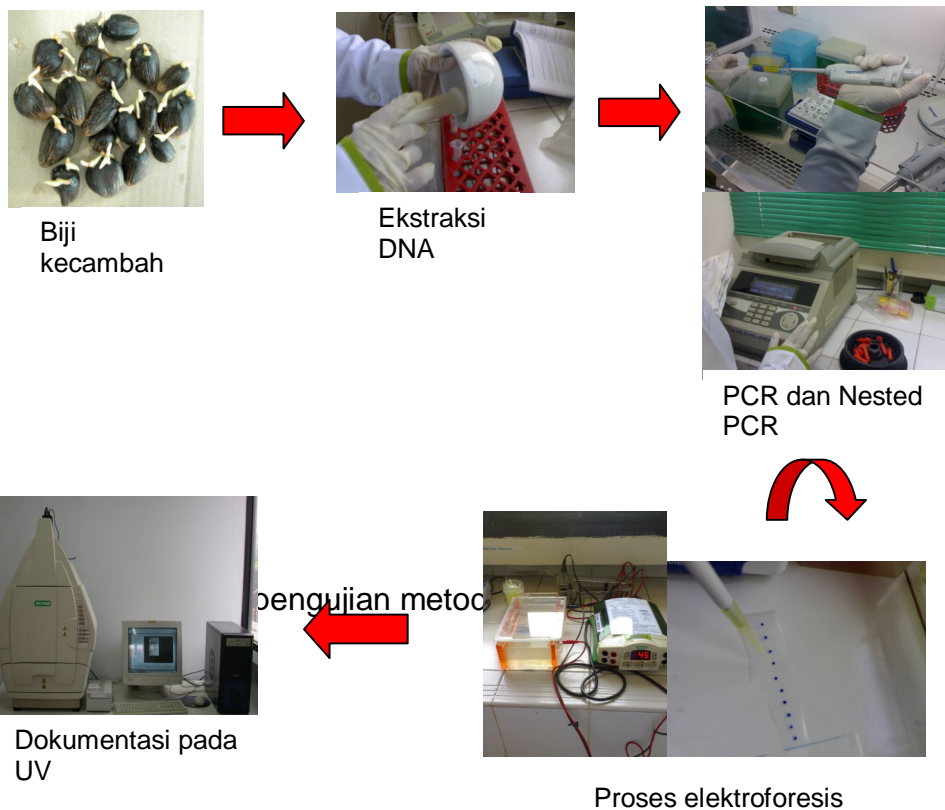
16. Pengamatan secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada larutan. Bila terjadi perubahan warna pada sumur uji dari bening menjadi kuning, maka mengindikasikan bahwa sampel yang diuji positif.
17. Pembacaan hasil juga dilakukan dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil dikatakan positif apabila nilai sampel lebih dari atau sama dengan 2 kali rata-rata nilai kontrol negatif.

5.5. Metode Molekuler

Alur pengujian molekuler terdiri beberapa tahapan yaitu :

- ekstraksi DNA dari sampel uji,
- penggandaan pita DNA menggunakan mesin PCR,
- elektroforesis hasil PCR,
- visualisasi pita DNA yang ada pada gel elektroforesis.

Gambar alur pengujian seperti berikut ini.



Hal yang perlu diperhatikan pada saat bekerja dengan metode PCR dan nested PCR :

- Gunakan jas laboratorium, sarung tangan dan masker penutup hidung pada saat melakukan pengujian.
- Beberapa bahan kimia antara lain phenol, chloroform, 2-Mercapthoethanol mempunyai bau yang sangat menyengat, serta beracun, untuk itu pada saat bekerja dengan bahan kimia tersebut harus dilakukan dalam lemari asam dan menggunakan sarung tangan serta masker. Phenol dapat menyebabkan luka bakar
- Ethidium bromide merupakan bahan kimia yang bersifat karsinogenik (menyebabkan kanker). Untuk itu pada saat bekerja dengan bahan kimia tersebut harus hati-hati dan menggunakan sarung tangan. Sarung tangan dan agarose yang telah terkena ethidium bromide harus dibuang dalam wadah khusus dan diberi perlakuan sebelum dimusnahkan atau dibuang ke lingkungan. Ethidium bromide harus diletakkan dalam ruang gelap agar terhindar dari sinar matahari secara langsung untuk menjaga kualitas bahan kimia tersebut.

5.5.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Bakteri merupakan suatu mikroorganisme prokariotik yang susunan asam nukleatnya berupa DNA (*Deoxyribonucleic Acid*). Pada mikroorganisme prokariotik, DNA terdapat didalam kromosom sel. DNA merupakan molekul yang amat panjang, terdiri dari ribuan deoksiribonukleotida (Adenin, Guanin, Sitosin, Timin) yang bergabung dalam suatu urutan yang bersifat khas bagi tiap organisme. Molekul ini biasanya berbentuk untaian ganda (Lehninger, 1982). DNA berfungsi untuk menyimpan informasi genetik secara lengkap yang diperlukan untuk mencirikan struktur semua protein dan RNA tiap-tiap spesies organisme, untuk membuat program pada saat yang tepat dan menempatkan biosintesis sel dan komponen jaringan secara teratur, untuk menentukan aktivitas organisme sepanjang siklus hidupnya, dan untuk menentukan kekhususan organisme tertentu.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai *primer* dalam suatu *thermocycler* (mesin PCR).

Dalam proses PCR diperlukan sepasang primer yang akan mengagapit posisi DNA target yang kita gandakan. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida. Primer *forward* adalah

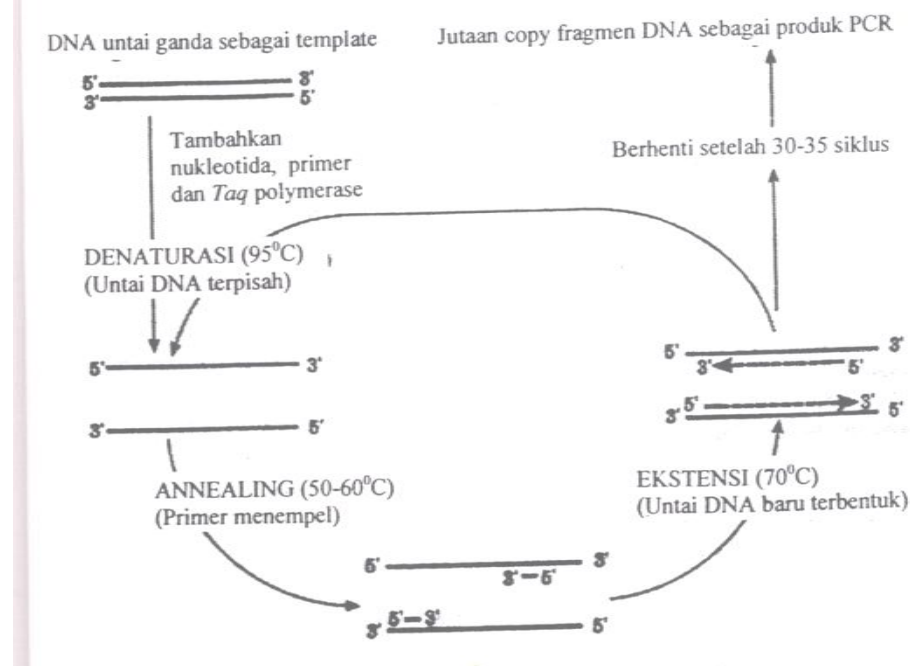
primer yang berada sebelum daerah target sedangkan primer *reverse* merupakan primer yang berada setelah daerah target.

Metode PCR mempunyai sensitifitas tinggi dan dapat dilakukan dalam waktu cepat. Metode ini digunakan untuk mendeteksi bakteri yang dapat terbawa oleh media pembawa (misalnya benih, stek, umbi, dan lain lain) maupun isolat biakan bakteri pada media agar. Beberapa spesies bakteri yang menginfeksi tanaman dapat dideteksi menggunakan metode ini antara lain *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Burkholderia andropogonis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Erwinia tracheiphila*, *Phytoplasma lethal yellowing*.

Pada dasarnya dalam satu siklus PCR melalui tiga tahap yaitu:

- a. Pemisahan (*Denaturation*).
Tahap pertama dalam proses penggandaan adalah pemisahan utas ganda menjadi utas tunggal dengan temperatur tinggi, yaitu 90-95°C selama 30 detik hingga 1,5 menit.
- b. Penempelan primer (*Renaturation/Annealing*).
Pada tahap kedua temperatur lebih dingin, yaitu sekitar 55-70°C. Pada suhu ini primer akan menempel pada komplemen DNA target yang spesifik.
- c. Sintesa (*Synthesis/Extension*).
Pada tahap ini temperatur dinaikkan menjadi sekitar 72°C, dimana merupakan kondisi optimum untuk proses katalisa *Taq* DNA Polimerase. Pada suhu ini enzim polimerase mulai bekerja yaitu dengan cara menyusun pasangan untaian DNA yang baru dengan nukleotida-nukleotida dari dNTPs yang telah tersedia dalam larutan. Sintesa DNA dimulai dari ujung 3'-hidroksi pada tiap primer.

Fragmen DNA yang dihasilkan dari ketiga tahapan tersebut kemudian menjadi cetakan untuk sekuen selanjutnya dalam proses PCR dengan cara mengulang tahapan tersebut sebanyak 25 hingga 50 kali.



Gambar 31. Siklus pembentukan molekul DNA baru dalam proses PCR. (Sumber : Muladno, 2002)

5.5.2. Nested PCR

Pada metode Nested PCR ini tahapan PCR dilakukan sebanyak dua kali. PCR tahap pertama dilakukan untuk memperbanyak cetakan DNA yang akan digunakan pada PCR tahap kedua. Metode ini bermanfaat untuk jenis-jenis bakteri yang memiliki titer yang sangat rendah dalam jaringan tanaman atau terdapat inhibitor DNA polimerase dalam jaringan tanaman. Untuk PCR tahap pertama umumnya digunakan primer yang tidak terlalu spesifik, dapat juga digunakan primer *degenerate*. Selanjutnya dari proses PCR tahap pertama diambil sebagian kecil volume ke dalam tabung PCR tahap kedua yang telah berisi primer yang lebih spesifik untuk jenis bakteri tertentu dan melipatgandakan potongan sekuens DNA di dalam potongan sekuens hasil PCR pertama. Dengan metode ini jumlah molekul yang akan dilipatgandakan akan meningkat, selain itu juga dapat menghilangkan inhibitor (Webster *et al.* 2004).

Komponen-komponen yang diperlukan dalam proses PCR dan Nested PCR.

A. DNA sampel uji (*template*)

Dalam hal ini DNA sampel uji dapat berasal dari bahan tanaman (daun, biji, kecambah, akar, batang) yang bergejala maupun yang terlihat sehat (*symptomless*), selain itu dapat berupa koloni tunggal bakteri dari hasil biakan pada media agar. Untuk mendapatkan DNA yang berasal dari bahan tanaman diperlukan suatu tahap proses ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA tanaman dapat dilakukan menggunakan metode konvensional

(antara lain metode CTAB, Dellaporta) maupun menggunakan kit ekstraksi DNA yang diproduksi oleh suatu produsen. Keberhasilan suatu proses PCR sangat ditentukan oleh kualitas DNA yang dihasilkan dari proses ekstraksi. Pada umumnya kualitas DNA yang dihasilkan dari proses ekstraksi menggunakan kit cenderung lebih baik dibandingkan menggunakan metode konvensional. Selain itu penggunaan kit ekstraksi DNA ini dianggap lebih praktis dan cepat serta jauh lebih aman bagi kesehatan manusia.

Protokol ekstraksi DNA :

Metode Dellaporta (Dellaporta *et al.* 1983)

1. Gerus 0,2 g jaringan tanaman menggunakan mortar dan pestle atau di dalam tabung mikro ukuran 1,5 ml menggunakan micropestle dalam nitrogen cair. Lalu tambahkan 500 µl buffer ekstrak Dellaporta ke dalam mortar atau tabung mikro lalu homogenkan dengan pestle. Untuk sampel yang dihomogenkan di dalam mortar masukkan ekstraksi jaringan tanaman ke dalam tabung mikro tersebut.
2. Tambahkan 33 µl 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) (w/v) dan vortex lalu inkubasi larutan pada suhu 65°C selama 10 menit.
3. Tambahkan 160 µl 5M potassium acetate (KoAc) dan vortex.
4. Sentrifuge selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm
5. Pindahkan supernatant (cairan/ larytan bagian atas) ke dalam tabung mikro baru dan buang sisa endapan (pelet) di dasar tabung.
6. Tambahkan 1 volume Phenol, chloroform, isoamylalcohol (PCI) dengan perbandingan 25:24:1 (sebagai contoh untuk 500 µl supernatant yang berhasil terambil dari tahap sebelumnya ditambahkan 500 µl PCI), vortex dengan kecepatan tinggi, dan sentrifuge pada 10.000 rpm selama 5 menit.
7. Pindahkan supernatant ke dalam tabung mikro baru lalu tambahkan 1 volume isopropanol, bolak balik tabung hingga beberapa kali, lalu sentrifuge 14.000 rpm selama 10 menit (atau 12.000 rpm selama 15 menit).
8. DNA akan menempel pada dasar tabung mikro (umumnya berwarna putih namun tergantung jenis jaringan tanaman yang diekstrak), lalu buang isopropanol dengan hati-hati hingga hanya tersisa pelet di dasar tabung.
9. Cuci pelet dengan alkohol 70% kemudian sentrifuge pada 10.000 rpm selama 5 menit.
10. Buang cairan yang tersisa dan keringanginkan selama 15 menit dalam inkubator suhu 37°C atau kurang lebih satu jam pada suhu ruang hingga sisa-sisa ethanol di dalam tabung mikro menguap.
11. Larutkan pelet dalam 50µl air bebas nuklease. Simpan DNA dalam suhu -20°C.

Metode CTAB

1. Siapkan bufer ekstrak yang akan digunakan sesuai kebutuhan lalu tambahkan 0,1% 2-ME ke dalam bufer, setelah itu panaskan dalam waterbath suhu 65°C selama lebih kurang 5 menit.
2. Gerus 0,2 g jaringan tanaman dalam nitrogen cair menggunakan mortar dan pestle hingga menjadi serbuk. Tambahkan bufer ekstrak CTAB sebanyak 700 µl lalu aduk hingga merata.
3. Pindahkan ekstrak jaringan tanaman ke dalam tabung mikro 1,5 ml.
4. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 65°C dalam waterbath
5. Tambahkan 700 µl Chloroform, isoamylalcohol (CI) perbandingan 24:1 dan campur dengan vortex hingga merata, lalu sentrifuge pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit.
6. Setelah sentrifuge akan terbentuk dua fase cairan, pindahkan sebanyak 500 µl fase bagian atas cairan yang berisi DNA ke tabung mikro ukuran 1,5 ml baru. Jangan sampai endapan ataupun fase bagian bawah ikut terbawa ke dalam tabung baru.
7. Tambahkan sebanyak 500 µl isopropanol dalam keadaan dingin kedalam masing-masing tabung mikro. Masukkan DNA yang dipresipitasi dengan isopropanol ke dalam freezer -20°C selama 1 jam atau semalam.
8. Sentrifuge 13.000 rpm selama 5 menit. Buang cairan dalam tabung sehingga hanya tersisa pelet DNA pada dasar tabung (umumnya berwarna putih atau warna lain tergantung pada jenis jaringan tanaman yang diekstrak).
9. Tambahkan 300 µl ethanol 70% goyangkan tabung dengan jari hingga pelet terlarut dalam ethanol lalu sentrifuge 13.000 rpm selama 5 menit.
10. Buang cairan yang tersisa dan keringanginkan selama 15 menit dalam inkubator suhu 37°C atau kurang lebih satu jam pada suhu ruang hingga sisa-sisa ethanol di dalam tabung mikro menguap.
11. Larutkan pelet dalam 50 µl air bebas nuklease. Simpan DNA dalam suhu -20°C.

Mengukur Jumlah (Konsentrasi) Molekul DNA

Pengukuran jumlah DNA melalui spektrofotometer didasarkan pada prinsip iradiasi sinar ultra violet yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Penyerapan iradiasi sinar UV secara maksimal oleh DNA dicapai pada panjang gelombang 260 nm dan apabila kepadatan optik (optical density) atau biasa disebut OD₂₆₀ sama dengan satu, maka konsentrasi molekul DNA setara 50 µg/ml (untuk DNA heliks ganda) atau setara 40 µg/ml (untuk RNA atau DNA untai tunggal).

Formula yang digunakan untuk menghitung konsentrasi DNA dengan alat spektrofotometer adalah sebagai berikut :

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi } (\mu\text{g/ml}) &= A_{260} \times \text{FP} \times 50 \mu\text{g/ml (untuk DNA untai ganda)} \\ &= A_{260} \times \text{FP} \times 40 \mu\text{g/ml (untuk RNA atau DNA untai tunggal)}\end{aligned}$$

dimana A_{260} = nilai OD₂₆₀ pada larutan DNA yang diukur

FP = Faktor Pengencer

Mendeteksi Kualitas (Tingkat Kemurnian) DNA

Untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA, yang berkorelasi dengan kualitas DNA, dapat ditentukan dengan cara menghitung rasio antara nilai OD₂₆₀ dan nilai OD₂₈₀ pada sampel DNA yang diukur melalui spektrofotometer. Molekul DNA dikatakan murni apabila rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1.8-2.0. Namun apabila konsentrasi DNA yang diukur terlalu kecil, seringkali nilai rasio tersebut sulit digunakan sebagai patokan dalam menentukan tingkat kemurniannya.

B. Primer (Oligonukleotida)

Primer yang digunakan dalam proses PCR terdiri dari dua jenis yaitu: primer pertama (*primer forward*) mempunyai sekuens identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat, sedangkan primer yang kedua (*primer reverse*) identik dengan sekuens pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain (Yuwono 2006). Spesifitas dari suatu deteksi menggunakan PCR sangat ditentukan oleh desain primer yang tepat untuk jenis, pathovar atau subspecies tertentu dari suatu target misalnya pathovar bakteri tertentu.

Lisdiyanti (1997) menjelaskan bahwa hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer adalah :

- a. Panjang urutan basa primer yang optimal adalah 18-20 basa dan tidak terdapat duplikasi antara kedua primer untuk mendeteksi gen target.
- b. Spesifitas urutan basanya harus tinggi untuk menghindari bergabungnya primer pada daerah yang tidak diinginkan, terutama pada daerah terminal 3'.
- c. Persentase kandungan basa G + C kedua primer antara 40-60%.
- d. Nilai T_m kedua primer antara 55-80^oC.
- e. Konsentrasi optimal dari primer antara 0,1-0,5 μM. Konsentrasi yang tinggi akan mengakibatkan kesalahan menempel sehingga mensintesis produk yang tidak diinginkan.

Beberapa program komputer yang dapat digunakan untuk merancang primer secara *offline* maupun *online*, seperti: Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), FastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>) dan beberapa program lainnya. Cara lain yang dapat digunakan untuk mendapatkan urutan suatu sekuen primer tertentu diantaranya adalah dengan mencontoh design primer yang telah diterbitkan di dalam jurnal penelitian. Cara ini lebih praktis karena umumnya primer yang dicantumkan dalam jurnal tersebut merupakan suatu hasil penelitian yang biasanya mencantumkan urutan siklus PCR yang digunakan sehingga mempersingkat waktu untuk optimasi program PCR untuk primer tersebut.

C. Deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP)

Deoksiribonukleotida triphosphat terdiri atas dATP, dTTP, dCTP dan dGTP yang digunakan dalam proses ekstensi untai DNA oleh enzim DNA polimerase.

Ketidak seimbangan campuran dNTP akan mengurangi kemampuan kerja enzim *Taq polymerase*. Sehingga untuk menghindari “nucleotide miscorporation” atau kesalahan membaca nukleotida maka konsentrasi dNTP yang digunakan antara 20-200 μ M.

D. Enzim DNA polymerase

Selama proses sintesis DNA, enzim DNA polimerase akan membantu proses penempelan nukleotida yang satu dengan yang lain dengan tepat sesuai dengan pasangannya (A-T dan G-C) untuk selanjutnya dilakukan pemanjangan rantai DNA.

Beberapa jenis Enzim DNA polymerase dan mikroorganismenya sebagai berikut :

DNA polymerase	Natural/Recombinant	Source
<i>Taq</i>	Natural	<i>Thermus aquaticus</i>
Amplitaq®	Recombinant	<i>T. aquaticus</i>
Amplitaq® (Stoffel fragment)	Recombinant	<i>T. aquaticus</i>
Hot Tub™	Natural	<i>Thermus flavus</i>
Pyrostase™	Natural	<i>T. flavus</i>
<i>Pfu</i>	Natural	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Pwo</i>	Natural	<i>Pyrococcus woesei</i>
<i>Tbr</i>	Natural	<i>Thermus brockianus</i>
<i>Tfi</i>	Natural	<i>T. flavus</i>
<i>Tli</i>	Recombinant	<i>Thermococcus litoralis</i>
Vent™	Recombinant	<i>T. litoralis</i>
DeepVent™	Recombinant	<i>Pyrococcus GB-D</i>
<i>Tth</i>	Recombinant	<i>Thermus thermophilus</i>
UITma™	Recombinant	<i>Thermotoga maritima</i>

Gambar 32. Jenis-jenis DNA polymerase dan mikroorganismenya sebagai berikut. (Sumber : Newton and Graham, 1997).

Dari beberapa jenis enzim DNA polymerase di atas, pada umumnya yang sering digunakan dalam suatu reaksi PCR adalah enzim *Taq* DNA polymerase hal ini karena enzim tersebut mempunyai kelebihan yaitu dapat aktif hingga suhu 94-95°C.

E. Buffer PCR (Larutan penyangga)

Buffer PCR yang biasa digunakan untuk reaksi PCR mengandung 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, dan 1.5 mM MgCl₂. Muladno (2002) menjelaskan bahwa adakalanya buffer ditambah dengan 100 μ g/ml gelatin atau Bovine Serum Albumin (BSA) untuk meningkatkan kualitas hasil PCR. Penambahan gelatin atau BSA ini dilakukan setelah buffer tersebut disterilisasi.

5. 6. Identifikasi Bakteri Dengan Sequencing Gen 16S rRNA

Gen 16S rRNA adalah gen universal yang dimiliki oleh semua organisme prokaryota (tanpa inti sel). Urutan nukleotida dari setiap spesies atau strain bakteri pada gen tersebut biasanya bersifat spesifik/khas yang dapat digunakan sebagai kunci identifikasi bakteri

tersebut. Data-data sekuen gen 16S rRNA dari sebagian besar bakteri yang telah dikarakterisasi tersimpan pada Gen Bank. Apabila ada bakteri yang kita sequencing gen 16S rRNA dan urutan nukleotidanya dapat diketahui, maka data tersebut dapat dikonfirmasi menggunakan program Blast pada Gen Bank untuk mengetahui kemiripan antara bakteri yang diidentifikasi dengan data bakteri yang tersimpan pada Gen Bank tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adgen Phytodiagnostic-Protocol 3c. PTA ELISA Protocol (Bacteria and fungi)
- Agdia Protokol Agdia for DAS ELISA, alkaline phosphatase label.
- Amir Hamzah dkk. (1993). Manual Identifikasi Bakteri Tanaman, Pusat Karantina Pertanian, Jakarta.
- Ana J . González, M . Rosario Rodicio² and M . Carmen Mendoza^{*}. 2003. Identification of an Emergent and Atypical *Pseudomonas viridiflava* Lineage Causing Bacteriosis in Plants of Agronomic Importance in a Spanish Region. Applied and Environmental Microbiology, May 2003, p . 2936-2941, Vol . 69, No . 5
- Anonim. 2006. Lampiran KEPMENTAN 38/2006, Daftar Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina yang belum dilaporkan terdapat di Indonesia.
- Anonim. 2006. Lampiran KEPMENTAN 38/2006, Daftar Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina yang sudah dilaporkan terdapat di Indonesia.
- Anonim (?). Micritest Laboratories Standard Operating Procedure No. 1015B, G, Y rev 006 : Identification of Bacteria (B: Genus & Species, G: Genus Only, Y: Yeast),
http://faculty.stcc.edu/rapp/BIOT251/biolog_sop.htm
- Anonim. 2008. PDC Services & Fees : Additional Information on Services provided by Clinic,
<http://www.labservices.uoguelph.ca/labserv/units/pdc/services.cfm>
- Anonim.2008.<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100> [Des 2008].
- Braun- Kiewnick, A and Sand, DC. 2001. Pseudomonas, hal : 84 – 120, didalam : Schaad, NW, Jones, JB, dan Chun, W. 2001, Ed., Laboratory Guide for Identification of Plantpathogenic Bacteria. APS Press, Minnesota.
- [CABI] Centre in Agricultural and Biological Institute, 2007, Crop Protection Compendium, [CD Room]. London: CABI Publisher.
- Carroll TW, 1986. Hordeiviruses - biology and pathology. In: Regenmortel MHV van, Fraenkel-Conrat H, eds. Plant Viruses; Vol. 2, The Rod-Shaped Plant Viruses. New York, USA: Plenum Press, pp. 373-394.

- Coplin, DL dan Kado, CI. 2001. *Pantoea*, hal : 73 - 83, didalam : Schaad, NW, Jones, JB, dan Chun, W. 2001, Ed., *Laboratory Guide for Identification of Plantpathogenic Bacteria*. APS Press, Minnesota.
- Ekmonsaurus. 2008. Gambar teori pewarnaan bakteri. http://ekmonsaurus.blogspot.com/2008_11_01_archive.html [Des 2008]
- Jones, JB, Gitaitis, RD, and Schaad, NW. 2001. *Acidovorax* an *Xylella*, hal : 175 -200 didalam : Schaad, NW, Jones, JB, dan Chun, W. 2001, Ed., *Laboratory Guide for Identification of Plantpathogenic Bacteria*. APS Press, Minnesota.
- Kaneshiro W.S., Mizumoto C.Y., Alvarez A.M. (2006). *European journal of plant pathology* vol. 116, n°1, pp.45-56 [12 page(s) (article)] (1p.1/4) : Abstract. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing, Copyright 2007 INIST-CNRS.
- Lehninger, A L. 1982. *Principle of Biochemistry*. Worth Publisher, Inc.
- Lisdiyanti P. 1997. Polymerase chain reaction : cara mudah memperbanyak DNA. *Warta Biotek*. Tahun XI No. 3-4. Sep-Des 1997. hal : 1-3
- Mguni C. M., Mortensen C. N., Keswani C. L., Hoeckenhull J. (1999). *Journal Title Seed science and technology* vol. 27, n°2, pp. 447-454 (24 ref.) : Abstract. Detection of the black rot pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and other xanthomonads in Zimbabwean and imported Brassica seed , Copyright 2007 INIST-CNRS.
- Mortensen C. N. (1989). *Seed Bacteriology Laboratory Guide*, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen
- McGuire, RG dan Jones, JB. 1989. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Tomato, hal: 59-62 didalam : Saettler, AW, Schaad NW, dan Roth, DA. Ed., *Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material*. APS Press, Minnesota.
- McGuire, RG dan Jones, JB. 1989. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Tomato, hal: 59-62 didalam : Saettler, AW, Schaad NW, dan Roth, DA. Ed., *Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material*. APS Press, Minnesota.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor

Newton CR and Graham A. 1997. PCR. Secon edition. Springer. Bios Scientific Publishers

Riesama. 2008. <http://riesama.blog.friendster.com/dunia-mikrobiologi/>
[des 2008]

Schaad N.W., J.B. Jones., W. Chun (2001), Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria Third edition, The American Phytopathological Society, USA

Schaad, NW, Jones, JB, dan Lacy, GH. 2001. Xanthomonas, hal : 175 - 200 didalam: Schaad, NW, Jones, JB, dan Chun, W. 2001, Ed., Laboratory Guide for Identification of Plantpathogenic Bacteria. APS Press, Minnesota.

LAMPIRAN I

LAMPIRAN I

MATRIKULASI IDENTIFIKASI BAKTERI TANAMAN

6.1. OPTK A 1

NO.	NAMA ILMIAH/SINONIM/FAMILI/ NAMA UMUM/ SCIENTIFIC NAME/SYNONIM/TAXON/COMM ON NAME	Identifikasi bakteri hingga tingkat Genus										Identifikasi bakteri hingga tingkat Species				Ket.
		RG	C	Ox	OF	Pt D1M	Pt S	RU	YDC	Fl KB	Mu coid	Bio	IFA	ELISA	PCR	
1	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (Manns) Willems et al.; (= <i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> = <i>P.pseudoalcaligenes</i> sub sp. <i>citrulli</i>); Burkholderiales, Comamonadaceae; busuk buah, fruit blotch, fruit rot	Negatif		Positif	Negatif	Negatif	Positif	Positif	Negatif	Negatif	Positif	√	-	- (CABI, 2007)	√ (CABI, 2007, BBUS KP).	
2	<i>Burkholderia gladioli</i> Yabuuchi et al.; (= <i>Pseudomonas gladioli</i>); Burkholderiales: Burkholderiaceae; busuk umbi	Negatif		Positif	Negatif	Negatif	Positif	V	Negatif	Negatif	Negatif	√	-	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)	Ditambah uji pato genisitas
3	<i>Burkholderia andropogonis</i> (Smith) Gillis et al.; (= <i>Pseudomonas woodsii</i> = <i>Aplanobacter stizolobii</i> = <i>Bacterium andropogonis</i> = <i>B.stizolobii</i> = <i>B.woodsii</i> = <i>Phytobacterium andropogonis</i> = <i>P.stizolobii</i> = <i>P.woodsii</i> = <i>Phytomonas andropogonis</i> ,	Negatif		Positif	Negatif	Negatif	Positif	V	Negatif	Negatif	Negatif	√	-	- (CABI, 2007)	√ (BBUS KP)	

	= <i>P.stizobii</i> = <i>P.woodsii</i> = <i>Pseudomonas andropogonis</i> = <i>P.andropogonis</i> pv. <i>stizobii</i> = <i>P.stizobii</i> = <i>P.woodsii</i>); Burkholderiales: Burkholderiaceae; bacterial leaf stripe, leaf striping															
4	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Smith) Davis et al.; (= <i>Aplanobacter michiganensis</i> = <i>Bacterium michiganense</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>michiganense</i> = <i>C.michiganense</i> subsp. <i>michiganense</i> = <i>C.michiganense</i> = <i>Erwinia michiganensis</i> (= <i>michiganense</i>) = <i>Mycobacterium michiganense</i> = <i>Phytomonas michiganensis</i> = <i>Pseudomonas michiganense</i> = <i>P. michiganensis</i>); Actinomycetales : Microbacteriaceae; bacterial cancer, birds eye spot	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	√	.	√ (CABI, 2007; BBUS KP)	√ (CABI, 2007)		
5	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> (Vidaver & Mandel) Davis et al.; (= <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>nebraskensis</i> = <i>C.michiganense</i> subsp. <i>nebraskense</i> = <i>C.nebraskense</i>); Actinomycetales: Microbacteriaceae; bacterial stripe, leaf freckles and wilt	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	√	.	.	.	(CABI, 2007)	

6	<p><i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (Spieckermann & Kotthoff) Davis et al.; (= <i>Aplanobacter sepedonicus</i> = <i>Bacterium sepedonicum</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>sepedonicum</i> = <i>C.</i> <i>michiganense</i> subsp. <i>sepedonicum</i> = <i>C. sepedonicum</i> = <i>Mycobacterium sepedonicum</i> = <i>Phytomonas sepedonica</i> = <i>Pseudobacterium sepedonicum</i>); Actinomycetales: Microbacteriaceae; bacterial ring rot</p>	Positif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	√	√	√ (CABI, 2007; BBUS KP)	√ (CABI, 2007; BBUS KP))	
7	<p><i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> (Hedges) Collins&Jones; (= <i>Bacterium</i> <i>flaccumfaciens</i> = <i>Corynebacterium</i> <i>flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> = <i>C. flaccumfaciens</i> = <i>C. flaccumfaciens</i> ssp. <i>flaccumfaciens</i> = <i>Phytomonas</i> <i>flaccumfaciens</i> = <i>Pseudomonas</i> <i>flaccumfaciens</i>); Actinomycetales: Microbacteriaceae; bacterial wilt</p>	Positif											√ (ha nya sam pai spe sies)		· (CABI, 2007)	√ (BBUS KP)	
8	<p><i>Erwinia amylovora</i> (Burrill); (= <i>Bacillus amylovorus</i> = <i>Bacterium</i> <i>amylovorum</i> = <i>Erwinia amylovora</i> f.sp. <i>rubi</i> = <i>Micrococcus</i> <i>amylovorus</i>); Enterobacteriales:</p>	Negatif		Negatif	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	√	√	√ (CABI, 2007)	√ (CABI, 2007)	

	Enterobacteriaceae, fire blight																	
9	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> (Van Hall) Jennison; (= <i>Erwinia caricae</i> = <i>Bacillus atrosepticus</i> = <i>Bacillus melanogenes</i> = <i>B. phytophthorus</i> = <i>Bacterium atrosepticum</i> = <i>B. carotovorum</i> = <i>B. carotovorum</i> var. <i>atrosepticum</i> = <i>B. melanogenum</i> = <i>B. phytophthorum</i> = <i>Erwinia carotovora</i> = <i>E. carotovora</i> pv. <i>atroseptica</i> = <i>E. dahliae</i> = <i>E. melonis</i> = <i>E. papayae</i> = <i>E. phytophthora</i> = <i>E. phytophthorus</i> = <i>Pectobacterium atrosepticum</i> = <i>P. carotovorum</i> = <i>P. carotovorum</i> var. <i>atrosepticum</i> = <i>P. carotovorum</i> var. <i>carotovorum</i> = <i>P. phytophthorum</i> = <i>Erwinia atroseptica</i> = <i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>); Enterobacteriales: Enterobacteriaceae; blackleg disease	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	√	-	√ (CABI, 2007)	√ (CABI, 2007)				
10	<i>Erwinia tracheiphila</i> (Holland) Smith; (= <i>Bacillus tracheiphilus</i> Smith = <i>Bacillus tracheiphilus</i> f. sp. <i>cucumis</i> = <i>Bacterium tracheiphilum</i> = <i>Erwinia amylovora</i> var. <i>tracheiphila</i>); Enterobacteriales:	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	-	-	√ (CABI, 2007)	√ (BBUS KP)			

	Entero bacteriaceae; bacterial wilt																
11	<i>Pantoea ananas</i> pv. <i>ananas</i> Walcott et al. ; (= <i>Bacillus ananas</i> = <i>Bacterium ananas</i> = <i>Chromobacterium ananas</i> = <i>Erwinia</i> = <i>Erwinia ananas</i> pv. <i>ananas</i> = <i>E. herbicola</i> var. <i>ananas</i> = <i>Pectobacterium ananas</i>); Enterobacteriales : Entero bacteriaceae; brown rot, fruitlet rot, pink disease	Negatif	-	Negatif	Positif	Negatif	V	Negatif	Positif	Negatif	Negatif	-	-	-	(CABI, 2007)	√ (BBUS KP)	
12	<i>Pantoea ananas</i> pv. <i>uredovora</i> Walcott et al. , (= <i>Erwinia ananas</i> pv. <i>uredovora</i> = <i>E. urediniolytica</i> = <i>E. uredovora</i> = <i>Xanthomonas</i> <i>uredovora</i>), Enterobacteriales : Enterobacteriaceae oats rust, rye rust	Negatif		Negatif	Positif	Negatif	V	Negatif	Positif	Negatif	Negatif	-	-	-	(CABI, 2007)	- (CABI, 2007)	Ditambah uji pato genisitas
13	<i>Pantoea stewartii</i> (Smith) Mergaert et al. ; (= <i>Aplanobacter</i> <i>stewartii</i> = <i>Bacillus stewartii</i> = <i>Bacterium stewartii</i> = <i>Erwinia</i> <i>stewartii</i> = <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> = <i>Phytomonas stewartii</i> = <i>Pseudobacterium stewartii</i> = <i>Pseudomonas stewartii</i> = <i>Xanthomonas stewartii</i>); Enterobacteriales : Enterobacte riaceae, bacterial leaf blight of	Negatif		Negatif	Positif	Negatif	V	Negatif	Positif	Negatif	Negatif	√	√	√	(CABI, 2007)	√ (BBUS KP)	

	maize, bacterial wilt of maize, maize bacteriosis, Stewart's wilt																
14	Phytoplasma; Acholeplasmatales: Acholeplasmataceae; Lethal yellowing , Cape st Paul disease, Cape Three Point disease, keincope, kribi													- (CABI, 2007)	√ (BBUS KP, CABI, 2007)		
15	Phytoplasma; Acholeplasmatales: Acholeplasmataceae; sugarcane white leaf phytoplasma (SCWL) = white leaf disease = India albino													√ (CABI, 2007)	√ (CABI, 2007)		
16	Phytoplasma; Acholeplasmatales: Acholeplasmataceae; sugarcane grassy shoot and (SCGSD) = grassy shoot disease = sugarcane grassy=stunt phytoplasma=grassy shoot=grassy stunt phytoplasma													√ (CABI, 2007)	√ (CABI, 2007)		
17	<i>Pseudomonas rubrisubalbicans</i> North. & Smith; (= <i>Bacterium rubrisubalbicans</i> = <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> = <i>Phytomonas rubrisubalbicans</i> = <i>Xanthomonas rubrisubalbicans</i>);Pseudomonadales: Pseudomonadaceae; mottled stripe, bacterial leaf stripe	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	-	-	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)			

18	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coriandricola</i> Toben & Rudolph; Pseudomonadales : Pseudomonadaceae; hawar daun, bacterial blight	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	-	-	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)	
19	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> Teix & Pinh.; (= <i>P. garcae</i>); Pseudomonadales : Pseudomonadaceae; bacterial leaf spot, bacterial blight of coffee	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	-	-	- (CABI, 2007)	√ (BBUS KP)	
20	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> ; (= <i>Bacillus lachrymans</i> = <i>Bacterium burgeri</i> = <i>Bacterium lachrymans</i> = <i>Chlorobacter lachrymans</i> = <i>Phytomonas lachrymans</i> = <i>Pseudomonas lachrymans</i> = <i>P. lachrymans</i> f. <i>cucumis</i> = <i>P. burgeri</i>); Pseudomonadales: Pseudomonadaceae; angular leaf spot of cucumber, aacterial leaf spot	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	√	-	√ (BBUS KP)	- (CABI, 2007)	
21	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> (McCulloch) Young et al. ; (= <i>Bacterium maccullochianum</i> = <i>B. maculicola</i> = <i>B. maculicola</i> var. <i>japonicum</i> = <i>Phytomonas maculicola</i> = <i>Pseudomonas maculicola</i>); Pseudomonadales: Pseudomonadaceae; pepper spot, leaf spot	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	√	-	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)	

22	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisii</i> (= <i>Bacterium pisi</i> = <i>Chlorobacter pisi</i> = <i>Phytomonas pisi</i> = <i>Pseudomonas pisi</i>); Pseudomonadales: Pseudomonadaceae; bacterial pea blight	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	√	-	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)	
23	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>theae</i> (Hori) Young et al. ; (= <i>Bacillus theae</i> = <i>Erwinia theae</i> = <i>Innominatus theae</i> = <i>Pseudomonas theae</i>); Pseudomonadales : Pseudomonadaceae; shoot blight, bacterial stem blight, bacterial tea blight, red blight, tea bacterial leaf spot	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	.	.	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)	
24	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (van Hall) <i>Pseudomonas cerasi</i> = <i>Pseudomonas cerasi</i> f.sp. <i>pyri</i> = <i>P.cerasi</i> var. <i>prunicola</i> = <i>P.cerasi</i> var. <i>pyri</i> = <i>P.citrarefaciens</i> = <i>P.</i> <i>citriputrealis</i> = <i>P.hibisci</i> = <i>P.holci</i> = <i>P.matthiolae</i> = <i>P.nectalaspila</i> = <i>P.oryzicola</i> = <i>P.prunicola</i> <i>P.spongiosa</i> = <i>P.syringae</i> = <i>P.syringae</i> f.sp. <i>prunicola</i> (Wormald) = <i>P.trifoliorum</i> = <i>P.utiformica</i> = <i>P.vignae</i> = <i>P.vignae</i> var. <i>leguminophila</i> = <i>P.viridifaciens</i>	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	√	-	√ (BBUS KP)	- (CABI, 2007)	

	= <i>P.syringae</i> pv. <i>japonica</i>); Pseudomonadales: Pseudomonadaceae; bacterial canker or blast (stone and pome fruits), bacterial brown spot (beans), bacterial black spot bacterial eye spot, bacterial leaf spot, bacterial sheath rot, blast of citrus															
25	<i>Rathayibacter tritici</i> (Hutchinson) Zgurskaya et al.; (= <i>Clavibacter tritici</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>tritici</i> = <i>C. tritici</i> = <i>Agrobacterium tritici</i> = <i>Bacterium tritici</i> = <i>Phytomonas tritici</i> = <i>P. tritici</i> = <i>Pseudomonas tritici</i>); Actinomycetales: Microbacteriaceae; spike blight, tundu disease yellow ear rot, yellow slime disease, yellow spike	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	√	.	.	(CABI, 2007)	.	(CABI, 2007)
23	<i>Rhizobium vitis</i> (Ophel & Kerr) Young et al. ; (= <i>Agrobacterium biovar 3</i> = <i>A. tumefaciens biovar 3</i> = <i>A. vitis</i>); Rhizobiales: Rhizobiaceae; crown gall	Negatif	Positif	Negatif	Positif	Negatif	ND	Negatif	Negatif	Positif	√	.	.	√ (CABI, 2007)		
26	<i>Rhodococcus fascians</i> (Zopt.) Tsukunura; (= <i>Bacterium fascians</i> = <i>Phytomonas fascians</i> = <i>Pseudobacterium fascians</i>)	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	√	.	.	√ (CABI, 2007)		

	= <i>Rhodococcus rubropertinctus</i> = <i>Corynebacterium fascians</i> ; Actinomycetales: Nocardiaceae; witches' broom syndrome, ornamental cauliflower disease, arbei cauliflower disease, arbei fasciation														
27	<i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) Chen et al.; Entomoplasmatales: Spiroplasmataceae; corn stunt disease, corn stunt spiroplasma, cSD, cSS, maize stunt spiroplasma, mSS, rio Grande corn stunt											.	.	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)
28	<i>Streptomyces ipomoeae</i> (Person & Martin) Waksman & Henrici; (= <i>Actinomyces ipomoeae</i>); Actinomycetales: Streptomycetaceae; Streptomycete soil rot (pox), soil rot, ground rot, <i>Streptomyces</i> soil rot (pox), sweet potato soft rot, sweet potato soil rot	Positif		Positif	Negatif	Negatif	Negatif	ND	Negatif	Negatif	Negatif	.	.	√ (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)
29	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i> ; Xanthomonadales: Xanthomonadaceae hawar daun	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	.	.	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)
30	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> (McCulloch & Pirone) Vauterin et al. ; (= <i>Phytomonas dieffenbachiae</i>)	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	√	.	√ (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)

	<p>=<i>Bacterium dieffenbachiae</i> =<i>Xanthomonas dieffenbachiae</i> =<i>X.campestris</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> =<i>X.campestris</i> pv. <i>syngonii</i>); Xanthomonadales: Xanthomonadaceae; anthurium blight, bacterial blight of aroids, bacterial blight of anthurium</p>															
31	<p><i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>poinsetticola</i> (Patel, Bhatt & Kulkarni) Vauterin et al. ; (= <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>poinsetticola</i> = <i>X.poinsetticola</i> = <i>X.poinsetticola</i> = <i>X.pulcherrimae</i> = <i>X.ricini</i> f.sp. <i>poinsetticola</i> = <i>X.ricini</i> f.sp. <i>poinsetticola</i>); Xanthomonadales: Xanthomonadaceae</p>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	√	.	.	(CABI, 2007)	(CABI,2 007)	
32	<p><i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> (Cobb) Vauterin et al. ; (= <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vasculorum</i> = <i>Bacillus vasculorum</i> = <i>Bacterium vasculorum</i> = <i>Phytomonas vasculara</i> = <i>P.vasculorum</i> = <i>Pseudomonas</i> <i>vasculorum</i> = <i>Xanthomonas</i> <i>vasculorum</i>); Xanthomonadales: Xanthomonadaceae; sugarcane gumming disease, gumming disease of sugar cane, gummosis</p>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	.	.	.	√ (CABI, 2007)	√ (CABI, 2007)	

33	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vitiens</i> (Brown) Vauterin et al. ; (= <i>Bacterium lactucaae</i> = <i>B.vitiens</i> = <i>Phytomonas lactucaae</i> = <i>P.lactucaae-scariolae</i> = <i>P.vitiens</i> = <i>Pseudomonas lactucaae</i> = <i>P.lactucaae-scariolae</i> = <i>P.vitiens</i> = <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitiens</i> = <i>X.lactucaae</i> = <i>X.lactucaae-</i> <i>scariolae</i> = <i>X.vitiens</i>); Xanthomonadales: Xanthomonadaceae; leafspot lettuce bacterial spot	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	-	-	- (CABI, 2007)	- (CABI,2 007)	
34	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>armoraciae</i> (McCulloch) Buck; (= <i>Bacterium campestre</i> var. <i>armoraciae</i> = <i>Phytomonas</i> <i>campestris</i> var. <i>armoraciae</i> = <i>Pseudomonas campestris</i> var. <i>armoraciae</i> = <i>Xanthomonas</i> <i>armoraciae</i>); Xanthomonadales: Xanthomonadaceae; Xanthomonas leaf spot	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	-	-	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)	
35	<i>Xanthomonas cassavae</i> (ex Wiehe & Dows) Vauterin et al. ; (= <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cassavae</i> = <i>X.ricini</i> f.sp. <i>cassavae</i>); Xanthomonadales: Xanthomonadaceae; cassava leaf spot, cassava bacterial necrosis	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	-	-	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)	

36	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> (Brown) Vauterin et al.; (= <i>Bacterium geranii</i> = <i>B. pelargonii</i> = <i>Phytomonas geranii</i> = <i>P. pelargonii</i> = <i>Pseudomonas geranii</i> = <i>P. pelargonii</i> = <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargonii</i> = <i>X. geranii</i> = <i>X. pelargonii</i>); Xanthomonadales: Xanthomonadaceae; bacterial leafspot	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	√	.	- (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)	
37	<i>Xylella fastidiosa</i> Wells et al.; Xanthomonadales: Xanthomonadaceae; Pierce's disease of grapevines, alfalfa dwarf, almond leaf scorch, citrus variegated chlorosis, dwarf lucerne, leaf scorch, phony disease of peach, plum leaf scald										.	.	√ (CABI, 2007)	√ (CABI, 2007)	
38	<i>Xylophilus ampelinus</i> (Panag.) Willems et al.; (= <i>Xanthomonas ampelina</i>); Pseudomonadales: Pseudomonadaceae; canker of grapevine bacterial blight of grapevine, black arm	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Positif	Negatif	Negatif	.	.	√ (CABI, 2007)	- (CABI, 2007)	

6.2. OPTK A 2

NO.	NAMA ILMIAH/SINONIM/FAMILI/ NAMA UMUM/ SCIENTIFIC NAME/SYNONIM/TAXON/COMM ON NAME	Identifikasi bakteri hingga tingkat Genus										Identifikasi bakteri hingga tingkat Species				Refr.
		RG	C	Ox	OF	Pt D1M	Pt S	RU	YDC	Fl KB	Mu coid	Bio	IFA	ELISA	PCR	
1	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> (Manns) Willems et al. (= <i>Bacillus avenae</i> = <i>Bacterium</i> <i>alboprecipitans</i> = <i>B.avenae</i> = <i>B.rubrilineans</i> = <i>B.setariae</i> = <i>Chlorobacter setariae</i> = <i>C.stariae</i> = <i>Phytobacterium alboprecipitans</i> = <i>Phytomonas alboprecipitans</i> = <i>P.avenae</i> = <i>P.rubrilineans</i> = <i>P.setariae</i> = <i>Pseudomonas</i> <i>alboprecipitans</i> = <i>P.avenae</i> = <i>P.avenae</i> subsp. <i>avenae</i> = <i>P.setariae</i> = <i>P.rubrilineans</i> = <i>Xanthomonas rubrilineans</i> = <i>X.rubrilineans</i> var. <i>indicus</i>); Burkholderiales: Comamonadaceae; bacterial leaf bacterial brown stripe, bacterial leaf stripe, brown stripe, leaf streak of sugar cane, red stripe of sugarcane, maize bacterial leaf blight	Negatif		Positif	Negatif	Negatif	Positif	Positif	Negatif	Negatif	Positif	√	-	-	√	(CABI, 2007; BBUS KP)
2	<i>Rhizobium rhizogenes</i> (Riker et al.) Young et al.; (= <i>Agrobacterium</i> <i>biovar 2</i> = <i>A.radiobacter</i>	Negatif		Positif	Negatif	Positif	Negatif	ND	Negatif	Negatif	Positif	√	-	-	√	

	<p>=<i>A.rhizogenes</i> =<i>A.rhizogenes</i> =<i>A.tumefaciens</i> biotype 2=<i>A.tumefaciens</i> biovar 2= <i>Bacterium rhizogenes</i> =<i>Erwinia rhizogenes</i> =<i>Phytomonas rhizogenes</i>); Rhizobiales : Rhizobiaceae; bacterial gall, bacterial stem gall, beet crown gall, burr knot, crown gall, crown gall: beet, crown gall, crown knot, gall, root gall, root knot, hairy root</p>															
3	<p><i>Erwinia chrysanthemi</i> Bulkholder, Mc. Fadden & D1Mock; (= <i>Erwinia carotovora</i> f.sp. <i>parthenii</i> = <i>E.carotovora</i> f.sp. <i>zeae</i> = <i>E.carotovora</i> var. <i>chrysanthemi</i> = <i>E.dieffenbachiae</i> = <i>E.maydis</i> = <i>E.paradisiaca</i> = <i>Pectobacterium carotovorum</i> f. sp. <i>chrysanthemi</i> = <i>P.carotovorum</i> var. <i>chrysanthemi</i> = <i>P.carotovorum</i> var. <i>graminarum</i> = <i>P.chrysanthemi</i> = <i>P.chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i> = <i>P.parthenii-dianthicola</i>); Enterobacteriales: Enterobacteriaceae; busuk kaki</p>	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	-	-	√	√	
4	<p><i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Davis et al.) Evtushenko et al.); (= <i>Clavibacter xyli</i> =</p>	Positif										-				

	<i>Clavibacter xyli</i> subsp. <i>xyli</i>); Actinomycetales : Microbacteriaceae; ratoon stunting of sugarcane, sugarcane ratoon stunting disease																
5	<i>Liberobacter asiaticum</i> Monique Garnier; (= <i>Candidatus liberobacter Africa num</i> = <i>C. liberobacter asiaticum</i> = <i>Liberobacter Africa num</i>); Proteobacteria, Alpha subdivision; citrus huanglongbing (greening) disease, African greening, Asian greening, citrus greening bacterium, greening bacterium, huanglongbing bacterium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√	Uji pati- yodium
6	<i>Pantoea agglomerans</i> (= <i>Bacterium herbicola</i> = <i>B. typhiflavum</i> = <i>Corynebacterium beticola</i> = <i>Enterobacter agglomerans</i> = <i>E. agglomerans</i> pv. <i>milletiae</i> = <i>Erwinia herbicola</i> = <i>E. herbicola</i> pv. <i>milletiae</i> = <i>E. lathyri</i> = <i>E. mangiferae</i> = <i>E. milletiae</i> = <i>E. vitivora</i> = <i>Flavobacterium herbicola</i> = <i>F. rhenanum</i> = <i>F. trifolii</i> = <i>Kurthia baccarinii</i> = <i>Pantoea agglomerans</i> pv. <i>milletiae</i> = <i>Phytomonas itoana</i> = <i>Pseudomonas herbicola</i> = <i>P. itoana</i> = <i>P. trifolii</i> = <i>Xanthomonas</i>	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	V	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	√	-	-	√			

	<i>cosmocola</i> = <i>X.indica</i> = <i>X.itoana</i> = <i>X.maydis</i> = <i>X.oryzae</i> = <i>X.penniseti</i> = <i>X.rubrisorghii</i> = <i>X.tagetis</i> = <i>X.translucens</i> f.sp. <i>oryzae</i> = <i>X.trifolii</i>); Enterobacteriales : Enterobacteriaceae; bacterial grapevine blight, bacterial rice leaf blight, pink disease of pineapple															
7	<i>Pseudomonas cichorii</i> (Swingle) Stapp.; Pseudomonadales : Pseudomonadaceae; hawar bakteri	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	√	-	-	√	
8	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i> (Boyer & Lambert) Young et al.; Pseudomonadales : Pseudomonadaceae; hawar daun	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	√	-	-	√	
9	<i>Pseudomonas syzygii</i> Roberts et al.; Pseudomonadales : Pseudomonadaceae; bakteri pembuluh kayu cengkeh (BPKC)	Negatif	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	-	-	-	√	
10	<i>Ralstonia solanacearum</i> Race 2 (Smith) Yabuuchi et al.; Burkholderiales: Ralstoniaceae; penyakit moko	Negatif	Positif	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	Negatif	Positif	√	-	√	√	
11	<i>Spiroplasma citri</i> Saglio et al.; Entomoplasmatales: Spiroplasmataceae; stubborn disease											-	-	√	√	

Ket : **RG** : Reaksi Gram, **C** : Uji Catalase, **OX** : Uji Oksidase, **OF** : Pertumbuhan oksidatif /fermentative (Anaerob), **Pt D1m** : Pertumbuhan D1M pada agar, **PtS** : Pertumbuhan pada suhu 37°C atau 40 °C, **RU** : Reaksi Urease, **YDC** : Warna koloni pada YDC/NBY, **FI Kb** : Fluorescen pada media KB, **Mucoid** : Koloni mucoid pada media YDC pada 30°C, **Bio** : Biologi, **IFA** : Immunofluoresensi, **ELISA**, **PCR**, **V** : antara 21 – 79% strain positif, **ND** : Not determined.

Spiroplasma citri

Ruang Lingkup :

Citrus sp

Identitas Penyebab Penyakit :

Spiroplasma citri Saglio et al., 1973

Taksonomi :

Domain: Bacteria
Phylum: Firmicutes
Class: Mollicutes
Order: Entomoplasmatales
Family: Spiroplasmataceae

Kode EPPO :

SPIRCI (*Spiroplasma citri*)

Nama Umum :

English:

stubborn disease of citrus
brittle root of horseradish (US)
citrus stubborn disease
little leaf of citrus
acorn disease

Spanish:

mal pertinaz de los cítricos

French:

stubborn

Status dalam Peraturan (SK Menteri Pertanian atau peraturan dibawahnya) :

Kategori A2 Golongan I (Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian No.28/KPTS/HK.060/1/2009 tanggal 22 Januari 2009).

Deteksi

Gejala Di Lapangan :



Gejala Penyakit Stubborn pada tanaman jeruk berusia muda, tampak daun mengguklung dan klorosis, serta cenderung menghadap ke atas (CABI,2007).



Gejala pada buah jeruk : ukuran buah mengecil, bentuk asimetris, dan warna tidak seragam Buah paling kanan adalah buah yang sehat (CABI,2007).

Identifikasi

METODE DAS-ELISA (PROTOKOL AGDIA)

Bahan dan alat untuk Identifikasi

- Capture antibody
- Alkaline phosphatase enzyme conjugate
- Kontrol positif
- Kontrol negatif
- 96-well ELISA microplate
- Aquadestilata
- Coating buffer
- General extraction buffer
- ECI buffer
- Substrate buffer
- PNP tablet
- PBST buffer
- Kertas towel
- Micropipet
- Tip mikropipet
- Plastic tebal (untuk sampel)
- Kotak lembab untuk inkubasi

Cara Kerja :

Coating sumur plate ELISA:

1. Siapkan humid box
Siapkan humid box dengan vegati alas paper towel basah. Menyimpa plate ELISA pada humid box akan mencegah penguapan sampel.
2. Siapkan capture antibody
Catatan : Siapkan capture antibody pada container yang terbuat dari polyethylene atau gelas untuk mencegah terikatnya antiboi pada permukaan container

Capture antibody tersedia dalam konsentrasi pekat dan harus diencerkan dengan coating buffer sebelum digunakan. Rekomendasi pengenceran, rasio antibody terhadap buffer , terdapat pada label.

Contoh, jika pengenceran pada label di botol capture antibody 1 : 200. Dan anda memerlukan 10 ml larutan capture antibody. Anda harus mencampur 10 ml coating buffer dengan 50 μ l larutan capture vegative pekat. Campur capture antibody dengan baik dan segera gunakan.
3. Coat Plate
Pipet 100 μ l larutan antibody yang telah disiapkan ke dalam setiap sumur plate.

4. Inkubasi plate
Inkubasi plate dalam humid box selama 4 jam pada temperature ruang atau biarkan semalam di dalam refrigerator (4°C).
5. Cuci plate
Kosongkan sumur, isi sumur uji dengan mengisi sampai melimpah dengan 1 x PBST, kemudian dengan cepat kosongkan sumur. Ulangi 2 kali pencucian.

Balikkan plate dan ketukkan dengan kuat pada permukaan lipatan kertas towel untuk menghilangkan sisa cairan.

Catatan : Gunakan coated plate segera

Menghaluskan dan Mengencerkan Sampel

Bila mungkin, pilih sampel yang bergejala. Jaringan tanaman sering dalam uji Elisa. Batang, biji, dan jaringan lain bisa juga diuji.

Pada umumnya digunakan general extraction buffer (GEB) untuk menghaluskan dan mengencerkan sampel. Tetapi buffer lain dianjurkan untuk beberapa spesies tanaman.

Dalam beberapa kasus, komposit sampai 10 daun per sumur uji bisa dilakukan agar lebih ekonomis. Tetapi, terlalu banyak sampel per sumur bisa mengurangi sensitifitas uji.

Haluskan jaringan tanaman dalam GEB dengan rasio 1:10. Dibutuhkan 100 µl sampel yang telah diencerkan per sumur uji, siapkan dalam jumlah yang agak berlebih untuk kemudahan saat membagikan. Gunakan vial tebal, mortar dan pistil, atau alat penghalus lainnya. Bila menggunakan mortar dan pistil cuci dan bilas sampai bersih antara satu sampel dengan sampel berikutnya.

Prosedur Uji

1. Membagikan sampel
Mengikuti diagram uji yang telah disiapkan, bagikan 100 µl sampel ke dalam sumur sampel, 100 µl vial positif ke dalam sumur vial positif, 100 µl vial negatif ke dalam sumur vial negatif dan 100 µl GEB ke dalam sumur buffer.
2. Inkubasi sampel
Atur plate di dalam kotak lembab dan inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang atau malamkan pada refrigerator (4°C)
3. Menyiapkan Konjugat
Catatan : Selalu siapkan konjugat 10 menit sebelum digunakan.

Konjugat di dalam botol dalam keadaan pekat dan harus diencerkan dengan buffer ECI sebelum digunakan. Anjuran rasio konjugat dan buffer tersedia pada label botol. Siapkan volume buffer yang sesuai ke dalam wadah. Diperlukan 100 µl ke dalam sumur uji. Kemudian tambahkan konjugat sesuai anjuran pengenceran pada label.

Contoh, jika pengenceran pada label 1 : 200, dan dibutuhkan 10 ml konjugat pada konsentrasi akhir, maka siapkan terlebih dahulu 10 ml buffer ECI. Kemudian tambahkan 50 µl konjugat pekat ke dalam buffer ECI tersebut.

Setelah menambahkan konjugat, aduk larutan sebaik-baiknya.

4. Cuci plate

Bila masa inkubasi sampel selesai, cuci plate. Lakukan gerakan membalik dan membuang larutan dari sumur plate dengan cepat untuk menghindarkan tercampurnya isi sumur. Isi semua sumur sampai melimpah dengan 1 X PBST, dan secara cepat kosongkan kembali. Ulangi 4 – 8 kali.

Setelah pencucian, balikkan plate dan ketukkan dengan kuat pada permukaan lipatan kertas towel untuk menghilangkan sisa cairan pencuci.

Periksa sumur uji. Semua sumur harus bebas dari jaringan tanaman atau gelembung udara. Jika jaringan dan gelembung udara masih ada, ulangi pencucian dan ketukkan dengan kuat pada permukaan kertas towel.

5. Menambahkan konjugat

Bagi 100 µl konjugat yang telah disiapkan pada setiap sumur plate.

6. Inkubasi plate

Inkubasi plate pada kotak lembab selama 2 jam pada suhu ruang.

7. Menyiapkan larutan PNP

Siapkan larutan PNP dengan konsentrasi 1 mg/ml. Satu tablet PNP (Agdia) cukup untuk 5 ml larutan PNP.

Sekitar 15 menit sebelum inkubasi tahap sebelumnya berakhir, siapkan 5 ml 1X PNP buffer dengan suhu ruang untuk setiap tablet yang digunakan. Kemudian, tanpa menyentuh tablet, tambahkan tablet PNP

kedalam buffer.

Catatan : jangan menyentuh tablet PNP atau mengekspos larutan PNP pada cahaya yang kuat. Cahaya atau kontaminasi bisa menyebabkan warna latar pada sumur yang viiiegative.

8. Cuci plate
Seperti sebelumnya, cuci plate 4 – 8 kali engan 1 X PBST.

Cepat periksa apakah pada sumur terlihat gelembung uara. Ulangi pencucian dan ketukkan dengan kuat pada permukaan kertas towel untuk menghilangkan gelembung udara.
 9. Tambahkan substrat PNP
Bagikan 100 µl substrat PNP pada setiap sumur.
 10. Inkubasi plate
Inkubasi plate pada kotak lembab selama 60 menit.
 11. Evaluasi hasil
Amati sumur dengan mata telanjang. Atau ukur dengan *plate reader* pada 405 nm. Sumur yang mengalami perubahan warna menunjukkan hasil positif. Sumur yang tidak menunjukkan perubahan warna yang nyata menunjukkan hasil negative. Hasil uji valid hanya jika sumur kontrol positif memberikan hasil positif dan buffer tetap tidak berwarna. Pembacaan absorbansi dengan EILISA reader pada 405 nm terhadap sampel menunjukkan hasil positif apabila nilai absorbansi sampel lebih besar atau sama dari 2 X rata-rata absorbansi kontrol negatif.

Hasil dapat dibaca setelah lebih dari 60 menit inkubasi sepanjang sumur kontrol negatif masih bersih.
- Pilihan : Menghentikan reaksi
Tahap ini boleh ilakukan atau tifik ilakukan. Tambahkan 3 M NaOH untuk menghentikan perkembangan reaksi, tetapi plate tetap dapat iamatii secara visual atau engan plare reaer tanpa tahap ini.

Tambahkan 50 µl 3M NaOH pada setiap sumur. Aamati sumur dengan mata atau ukur dengan *plate reaer* pada 405 nm.

FORMULASI BUFFER

Coating Buffer (1X)
Larutkan di dalam 1000 ml aquadestilata :

		1,59 g
	Sodium carbonate (anhydrous)	2,93 g
	Sodium bicarbonate	0,2 g
	Sodium azide	
	Atur pH 9,6. Simpan pada 4°C	
PBST Buffer (Buffer Pencuci) 1X	Larutkan dalam 1000 ml aquadestilata :	
		8,0 g
	Sodium chloride	1,15 g
	Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	0,2 g
	Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	0,5 g
	Potassium chloride	
	Tween-20	
	Atur pH 7,4	
ECI Buffer (1X)	Tambahkan pada 1000 mL 1 X PBST :	
		2,0 g
	Bovine serum albumin (BSA)	20,0 g
	Polynilepyrrolidone (PVP) MW 24 – 40.000	0,2 g
	Sodium Azide	
	Atur pH 7,4. Simpan pada 4°C.	
PNP Buffer (1X)	Larutkan dalam 800 ml aquadestilata :	
		0,1 g
	Magnesium chloride hexahydrate	0,2 g
	Sodium azide	97,0 ml
	Diethanolamine	
	Atur pH 9,8 dengan HCl. Tambahkan aquadestilata sampai volme akhir mencapai 1000 ml.	
General Extraction Buffer (GEB 1X)	Larutkan dalam 1000 ml 1 X PBST :	
	Sodium sulfite (anhydrous)	1,3 g
	Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24- 40.000	20,0 g
	Sodium Azide	0,2 g
	Powdered egg (chicken) albumin, Grade II	2,0 g
	Tween-20	20,0 g
	Atur pH 7,4. Simapan pada 4°C	

Blueberry Extraction Buffer (1X)	Larutkan dalam GEB sampai volume 1000 ml :	
		10,4 g
	Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	0,9 g
	Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	
	Simpan pada 4°C	
Grape Extraction Buffer (1X)	Larutkan dalam 900 ml aquadestilata :	
		60,5 g
	Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	8,0 g
	Sodium chloride	20,0 g
	Sodium chloride	10,0 g
	Polyvinyl pyrrolidone (PVP) MW 24 – 40.000	0,2 g
	Polyethylene glycol	0,5 g
	Sodium azide	
	Tween-20	
	Atur pH 8,2 dengan HCl. Tambahkan aquadestilata hingga volume mencapai 1000 ml. Simpan pada 4°C.	

Acidovorax avenae subsp. citrulli

Ruang Lingkup :

Inang utama

[*Citrullus lanatus* \(watermelon\)](#), [*Cucumis melo* \(melon\)](#)

Inang lain

[*Cucumis sativus* \(cucumber\)](#), [*Cucurbita moschata* \(pumpkin\)](#), [*Cucurbita pepo* \(ornamental gourd\)](#)

Identitas Penyebab Penyakit :

Acidovorax avenae subsp. citrulli (Schaad et al., 1978) Willems et al., 1992

Taksonomi :

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Betaproteobacteria

Order: Burkholderiales

Family: Comamonadaceae

Nama lain (sinonim) :

Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. citrulli Schaad et al., 1978

Pseudomonas avenae subsp. citrulli (Schaad et al., 1978) Hu et al., 1991

Kode EPPO :

PSDMAC (*Acidovorax avenae subsp. citrulli*)

English:

fruit blotch

bacterial fruit blotch

seedling blight

United Kingdom:

fruit rot

Status dalam Peraturan (SK Menteri Pertanian atau peraturan dibawahnya) :

Kategori A1 Golongan I (Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian No.28/KPTS/HK.060/1/2009 tanggal 22 Januari 2009).

Deteksi

Gejala Di Lapangan :



Gejala seperti terkena air panas pada pembibitan semangka (CABI, 2007)



Gejala pada buah semangka (Fruit blotch) (CABI, 2007)

Identifikasi :

Metode Diagnostic Agar (Schaad *et al*, 2001).

Media isolasi *A. avenae* subsp. *citruli* :

A. Beef- yeast extract :

Beef extract	1,0 g
Yeast extract	2,0 g
Agar	20,0 g
Aquadestilata	1000 ml

Atur pH 7,4 sebelum di autoklaf

Selain untuk isolasi *A. avenae* subsp. *citruli* media ini juga digunakan untuk isolasi *A. avenae* subsp. *avenae* dan *A. avenae* subsp. *cattleyae* dari jaringan tanaman. Koloni berwarna beige.

B. Yeast Extract Dextrose – CaCO₃ (YDC)

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

Untuk memperoleh media berwarna putih susu, CaCO₃ harus digerus halus, bila tidak CaCO₃ 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 CaCO₃ 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.

Media Semi Selektif Untuk Isolasi

Media Modifikasi Etyhanol Bromcresol Purple Brilliant Blue (mEBB) :

NH ₄ H ₂ PO ₄	2,6 g
KH ₂ PO ₄	0,8 g
KHPO ₄	0,3 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Yeast extract	0,3 g
Boric acid	0,5 g
Bromcresol purple	0,6 ml
(stok 15 mg/ml)	
Brilliant blue R	1,0 ml
(stok 10 mg/ml)	

Koloni *A. avenae* subsp. *citrulli* bulat, diameter 1-2 mm setelah 3-4 hari pada 36° C. Koloni terus membesar dan pada bagian tengah berubah menjadi berwarna hijau olive dengan morfologi koloni seperti ceplok telur setelah 4 – 5 hari. Koloni bakteri lainnya pada mEBB umumnya berwarna biru dan ukurannya tetap kecil.

Media ini sesuai untuk isolasi *A. avenae* subsp. *citrulli* dari benih cucurbitase

Membedakan Genus, Spesies dan Subspecies *Acidovorax* dengan Bakteri Plant Patogen Lain Yang Umum Diisolasi.

Karakter phenotip pembeda genus *Acidovorax* dari patogen tanaman lainnya adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Perbandingan spesies patogenik *Acidovorax* dengan patogen tanaman lain.

Karakteristik	<i>Acidovorax</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Burkholderia</i>
Flagella	Polar, 1-2	Bipolar, 1-5	Polar, 1-4	Polar, 1-4
Tumbuh pada 41°C	+	-	-	-
Mengakumulasi poly-B-hydroxybutirate	+	-	+	+
Menghasilkan pigment fluoresens	-	+	-	-
Menggunakan sumber karbon tunggal :				
Arginine	-	+	-	+
Betaine	-	+	-	+
Citraconate	+	ND	-	V
L-arabinose	+ ^a	-	-	+
Sucrose	- ^b	+	+	V
Ethanol	+	-	-	-
n-propanol	+	-	-	-

+, berarti 80% atau lebih strain positif; V, 21-79% strain positif; - 80% atau lebih strain negatif; ND, tidak diketahui

^a semua positif kecuali *A. konjaci*.

^b semua negatif kecuali *A. avenae* subsp *cattleyae*.

Strain dalam *Acidovorax* sulit dibedakan dan biasanya berdasarkan uji patogenisitas. Namun ada beberapa karakter unik diantara subspecies *avenae* . Berikut adalah karakter pembedanya :

Tabel 2. Perbedaan subspecies *Acidovorax avenae* dan *A. konjaci*

Karakteristik	<i>avenae</i>	<i>cattleyae</i>	<i>citrulli</i>	<i>A. konjaci</i>
Tumbuh pada :				
D-xylose	+	-	+D	-
D-fucose	+	+	+D	+

	D-mannitol or D-arabitol	+	+	-	+
	Sorbitol	+	+	-	ND
	Sucrose	-	+	-	-
	L-threonine atau L-histidine	+	+	-	ND
	Mereduksi nitrat	+	+	-	+
	Membentuk presipitat pada Lactalysate atau beef extract	+	-	-	-
	Menghidrolisis pati	+D	+D	-	-
	Patogenik pada				
	Semangka	-	ND	+	-
	Cantaloupe	-	ND	+	-
	Squash	-	ND	+	-
	Pumpkin	-	ND	+	-
	Jagung	+	ND	-	-
	Padi	+	ND	-	-
	Phalenopsis spp.	-	+	-	-
	<i>Cattleya</i> spp.	-	+	-	-
	<i>Amorphophalus konjac</i>	-	-	-	+

+, berarti 80% atau lebih strain positif; V, 21-79% strain positif; - 80% atau lebih strain negatif; ND, tidak diketahui

^a semua positif kecuali *A. konjaci*.

^b semua negatif kecuali *A. avenae* subsp *cattleyae*.

Mengakumulasi poly-B-hydroxybutirate :

Tumbuhkan bakteripada media Ayers yang mengandung 0,5% DL- β -hydroxybutirate (sodium salt), setelah dua hari, buat olesan bakteri yang difiksasi dengan panas dan genangi selama 10 menit dengan 0,3% Sudan black B dalam 70% ethanol (larutan baru bisa digunakan setelah pewarna larut didalam ethanol secara sempurna, memerlukan waktu sekitar 12 jam). Selesai inkubasi buang Sudan Black B dan keringkan dengan menekan tissue perlahan. Bilas dengan xylol atau air sesaat, keringkan dengan cara yang sama seperti sebelumnya. Beri pewarna tandingan 0,5% Safranin selama 10 detik. Cuci dengan air mengalir, keringkan dengan cara sebelumnya dan amati dibawah pembesaran 100X dengan minyak imersi. Butiran PHB berwarna biru kehitaman di dalam sel.

Reduksi Nitrat pada kondisi anaerob (untuk *Acidovorax*, *Pseudomonas*) :

Siapkan media dengan komposisi berikut :

Yeast extract	5,0 g	
KNO ₃	3,0 g	
Noble agar	1,0 g	
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g	
KCl	0,20 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,20 g

Bagi media kedalam tabung reaksi masing-masing 5 ml sebelum di autoklaf. Inokulasi media dengan inokulum dan tutup dengan 3% agar Noble atau minera oil steril. Inkubasi pada 27°C sampai 5 hari. Bila ada pertumbuhan bakteri uji denitrifikasi adalah positif.

Membentuk presipitat pada Lactalysate atau beef extract :

- a. Nutrient Broth. Inokulasi media Nutrient Broth (Beef extract 3,0 g; Peptone 5,0 g; aquadestilata 1000 ml) dengan inokulum. Inkubasi pada 36°C tanpa shaking, Adanya presipitat putih menunjukkan hasil positif
- b. Media Lactalysate. Goreskan bakteri pada plate mengandung media berikut : Lactalysate 20,0 g; agar 18,0 g; beef extract 5,0 g. Inkubasi pada 36°C selama 48-72 jam. Koloni yang tumbuh dengan dikelilingi halo jernih didalam area presipitat putih.

Menghidrolisis pati:

Siapkan media berikut : Nutrient broth (Difco 8,0 g; soluble potato starch 10,0 g; Bacto agar (Difco) 15,0 g, aquadestilata 1000 ml. Autoklaf media, lalu tuang ke dalam cawan petri. Inokulasi inokulum berumur 24-48 jam pada permukaan agar, inkubasi 28°C selama 4 hari atau lebih. Ambil bakteri yang tumbuh dari permukaan media, lalu genangi media dengan Lugol's Iodine, Bila media berwarna biru menunjukkan pati tidak dihidrolisis. Bila menjadi jernih menunjukkan pati telah dihidrolisis.

Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria

Ruang Lingkup :

Inang utama

[*Capsicum annuum* \(bell pepper\), *Lycopersicon esculentum* \(tomato\)](#)

Inang lain

[*Capsicum* \(peppers\), *Lycopersicon*](#)

Identitas Penyebab Penyakit :

Xanthomonas vesicatoria (Doidge) Dowson 1939

Taksonomi :

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Xanthomonadales

Family: Xanthomonadaceae

Nama lain (sinonim) :

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye 1978

Pseudomonas vesicatoria (Doidge) Stevens 1925

Pseudomonas exitiosa Gardner & Kendrick 1921

Bacterium exitiosum Gardner & Kendrick 1921

Bacterium vesicatorium Doidge 1920

Phytomonas exitiosa (Gardner & Kendrick) Bergey et al. 1923

Phytomonas vesicatoria (Doidge) Bergey et al. 1930

Pseudomonas gardneri Sutic 1957

Pseudomonas gardneri var. *capsici* Sutic 1957

Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria* (Doidge) Vauterin et al., 1995

Kode EPPO :

XANTAV (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*)

XANTVE (*Xanthomonas vesicatoria*)

English:

bacterial spot of tomato and pepper

bacterial stem blight of tomato and pepper

bacterial leaf blight of tomato and pepper

bacterial scab of tomato

stem canker of tomato

black spot

leaf spot: red pepper

leaf spot: tomato

bacterial spot

scab

Spanish:

mancha bacteriana del tomate
sarna bacteriana del tomate

French:

gale bactérienne de la tomate et du piment
tache bactérienne de la tomate

Germany:

Bakterielle: Tomate Schwarzfleckenkrankheit
Blattfleckenkrankheit: Paprika
Blattfleckenkrankheit: Tomate

Status dalam Peraturan (SK Menteri Pertanian atau peraturan dibawahnya) :

Belum tercantum di peraturan yang ada.

Deteksi

Gejala Di Lapangan :



Gejala bercak gelap seperti tersiram air panas pada daun (CABI, 2007)



Gejala malformasi dan bercak hitam tenggelam pada buah tomat (CABI,2007)

Identifikasi

Metode Diagnostic Agar (Schaad *et al*, 2001; McGuire and Jones, 1989)

Isolasi dari jaringan tanaman tomat dan paprika yang menunjukkan gejala bercak daun atau buah:

Pilih jaringan tanaman yang segar dengan lesion yang masih muda. Bagian tanaman yang sakit digerus sampai halus dalam air steril, inkubasikan 20 menit, lalu suspensi digoreskan pada media YDC. Inkubasi plate pada 25 – 27°C selama 3 hari atau lebih. Bila terdapat banyak koloni berwarna kuning, licin, atau lengket kemungkinan bakteri tersebut adalah bakteri target.

Resep media Yeast Extract Dextrose – CaCO₃ (YDC)

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

Untuk memperoleh media berwarna putih susu, CaCO₃ harus digerus halus, bila tidak CaCO₃ 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 CaCO₃ melarut sempurna.

Ekstraksi dan deteksi dari benih tomat :

Dua belas gram benih tomat (lebih kurang 5000 benih) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml berisi 100 ml buffer peptone steril (5,3 g KH₂PO₄; 8,61 g Na₂ HPO₄; 1 g bacto peptone; 1 L aquadestilata). Inkubasi benih dalam buffer pada 4°C selama 3 jam. Kemudian benih dikocok dengan rotary shaker selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah dikocok, 0,1 ml suspensi disebar pada permukaan media semi selektif Tween B. Inkubasi plate pada 28°C selama 4 – 5 hari. Koloni bakteri *X. campestris* pv. *vesicatoria* tumbuh bulat, tidak datar tetapi menonjol, berwarna kuning dikelilingi oleh zona kristal putih karena garam kalsium dari asam lemak dilepaskan dari Tween oleh enzyme lipolytic (McGuire and Jones, 1989).

Komposisi Media Tween B:

Peptone	10,0 g
KBr	10,0 g
CaCl ₂	0,25 g
H ₃ BO ₃	0,30 g
Agar	15,0 g

Aquadestilata 1000 ml

Setelah diautoklaf, secara aseptik tambahkan Tween 80, 10 ml/L; cycloheximide 100 mg/L; cephalixin 65 mg/L; 5-fluororacil 12 mg/L; dan tobramycin 0,4 mg/L

Konfirmasi harus dilakukan untuk memastikan isolat bakteri yang diperoleh dari isolasi menggunakan media YDC atau semi selektif media Tween B benar termasuk genus *Xanthomonas*, spesies *Xanthomonas campestris*.

Karakter Genus *Xanthomonas*:

Gram negative

Aerobik

Berbentuk batang (0,4 – 0,7 x 0,7 -1,8 µm)

Single polar flagellum

Katalase positif

Menghasilkan asam dari karbohidrat tetapi lemah

Koloni mukoi, konveks, dan berwarna kuning pada YDC

Menghasilkan pigmen Xanthomonadin yang tidak larut di air pada media mengandung glucose

Tabel 1. Karakter phenotip untuk membedakan *Xanthomonas* dari *Pseudomonas* dan bakteri penghasil pigmen berwarna kuning lainnya

Karakter	<i>Xanthomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pantoea</i>
Flagela	1, polar	>1, polar	Tidak ada	Peritrichous
Xanthomonadin	Ya	Tidak	Tidak	Tidak
Fluorescens	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
Litmus milk ^a	Alkalin	Alkalin	Tidak berubah	Tidak diketahui
Tumbuh pada 40°C ^b	Ya	Tidak	Ya	Ya
Levan dari Sucrose	Ya	Ya	Tidak	Tidak
H ₂ S dari Cysteine	Ya	Tidak	Tidak	Tidak
Oxidase	Negatif	Negatif ^c	Positif	Negatif
Fermentatif	Tidak	Tidak	Tidak	Ya
Tumbuh pada media 0,01% TTC	Tidak	Ya	Ya	Ya

^a *X. fragariae* tidak berubah

^b *X. fragariae* tidak tumbuh

^c *P. cichorii* positif

Tabel 2. Uji diagnostik membedakan beberapa *Xanthomonas* spp.

Pengujian	Campestris*	fragariae	albilineans	cassavae	hyacinthi	oryzae	pisii	transluentis
Nukloid pada YDC	+	+	-	+	+	+	+	+
Tumbuh pada 35°C	+	-	+	+	+	+	+	+
Tumbuh pada Media SX	+	-	-	-	-	-	+	-
Menghidrolisis pati	+	+	-	+	+	-	+	+
Menghidrolisis esculin	+	-	+	+	+	+	+	+
Protein digestion	+	-	-	+	+	+	+	+
Litmus milk	Alk	Alk	NC	Alk	NC	NC	Alk	Alk
Ice nucleation	-	+	-	-	-	-	-	+
Menhasilkan asam dari Arabinose	+	-	-	-	-	-	-	-
Memanfaatkan :								
Glycerol	+ ^D	-	+	-	-	-	+	-
Melibiose	V	-	-	-	-	-	+ ^D	-

* tipikal untuk pv. campestris, pathovar yang lain tiak iuji

+, berarti 80% atau lebih strain positif; V, 21-79% strain positif; - 80% atau lebih strain negatif; +^D, positif tetapi lambat atau lemah; ND, tidak diketahui; Alk, alkalin; NC, tidak berubah.

BADAN KARANTINA PERTANIAN
Lembar Kerja : 004-DB-08

Pseudomonas viridiflava

Ruang Lingkup :

Inang Utama

[Actinidia deliciosa](#) (kiwifruit), [Allium cepa](#) (onion), [Anethum graveolens](#) (dill), [Apium graveolens](#) (celery), [Apium graveolens var. dulce](#) (celery), [Brassica spp.](#), [Capsicum annuum](#) (bell pepper), [Cucumis melo](#) (melon), [Cucumis sativus](#) (cucumber), [Cucurbita maxima](#) (giant pumpkin), [Hydrangea](#) (hydrangeas), [Lycopersicon esculentum](#) (tomato)

Inang lain

[Actinidia chinensis](#) (Chinese gooseberry), [Allium fistulosum](#) (Welsh onion), [Brassica oleracea var. botrytis](#) (cauliflower), [Brassica oleracea var. capitata](#) (cabbage), [Brassica oleracea var. gemmifera](#) (Brussels sprouts), [Calendula officinalis](#) (Pot marigold), [Capsicum frutescens](#) (chilli), [Carthamus tinctorius](#) (safflower), [Chrysanthemum indicum](#) (chrysanthemum), [Cichorium endivia](#) (endives), [Citrus aurantium](#) (sour orange), [Citrus macrophylla](#) (alemow), [Citrus sinensis](#) (navel orange), [Cyclamen persicum](#) (cyclamens), [Eschscholzia californica](#) (california poppy), [Euphorbia pulcherrima](#) (poinsettia), [Eutrema wasabi](#) (Wasabi), [Forsythia suspensa](#), [Glycine max](#)

[\(soyabean\)](#), [*Lablab purpureus* \(hyacinth bean\)](#), [*Lotus corniculatus* \(bird's-foot trefoil\)](#), [*Lupinus angustifolius* \(lupin\)](#), [*Medicago sativa* \(lucerne\)](#), [*Nicotiana rustica* \(wild tobacco\)](#), [*Papaver* \(poppies\)](#), [*Papaver nudicaule* \(Iceland poppy\)](#), [*Passiflora edulis* \(passionfruit\)](#), [*Pastinaca sativa* \(parsnip\)](#), [*Petroselinum crispum* \(parsley\)](#), [*Petunia hybrida*](#), [*Phaseolus coccineus* \(runner bean\)](#), [*Phaseolus lunatus* \(lima bean\)](#), [*Phaseolus vulgaris* \(common bean\)](#), [*Pisum sativum* \(pea\)](#), [*Prunus armeniaca* \(apricot\)](#), [*Prunus avium* \(sweet cherry\)](#), [*Pseudopanax*](#), [*Pyrus communis* \(European pear\)](#), [*Rosa* \(roses\)](#), [*Sorghum bicolor* \(sorghum\)](#), [*Sorghum sudanense* \(Sudan grass\)](#), [*Tanacetum coccineum* \(common pyrethrum\)](#), [*Trifolium pratense* \(purple clover\)](#), [*Tropaeolum majus* \(common nasturtium\)](#), [*Vaccinium corymbosum* \(blueberry\)](#), [*Vicia faba* \(broad bean\)](#), [*Vigna angularis* \(adzuki bean\)](#), [*Vigna unguiculata* \(cowpea\)](#), [*Viola* \(violet\)](#), [*Vitis vinifera* \(grapevine\)](#), [*Zea mays* \(maize\)](#), [*Zinnia elegans* \(zinnia\)](#).

Inang lain (yang pernah dilaporkan namun informasi terbatas)

[*Brassica rapa* subsp. *pekinensis* \(Pe-tsai\)](#), [*Capsicum* \(peppers\)](#), [*Coriandrum sativum* \(coriander\)](#), [*Cryptotaenia canadensis* \(honestwort\)](#), [*Ocimum basilicum* \(basil\)](#), [*Raphanus sativus* \(radish\)](#).

Identitas Penyebab Penyakit :

Pseudomonas viridiflava (Burkholder 1930) Dowson 1939

Taksonomi :

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Pseudomonadales

Family: Pseudomonadaceae

Nama lain (sinonim) :

Bacterium viridiflavum (Burkholder) Burgvits 1935

Chlorobacter viridiflavus (Burkholder) Patel & Kulkarni 1951

Phytomonas viridiflava Burkholder 1930

Kode EPPO :

PSDMVF (*Pseudomonas viridiflava*)

English:

bacterial leaf blight of tomato (USA)

Hydrangea bud blight (USA)

bacterial leaf necrosis of basil (USA)

bacterial rot of lettuce (Korea Republic)

bacterial rot of Chinese cabbage (Korea Republic)

bacterial soft rot of tomato (USA, Crete)

bacterial blossom blight of kiwi (New Zealand)

Status dalam Peraturan (SK Menteri Pertanian atau peraturan dibawahnya) :

Kategori A1 Golongan 1 (Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian Nomor 28/KPTS/HK.060/1/2009 tanggal 22 Januari 2009).

Deteksi

Gejala Di Lapangan :



Giorgio M. Balestra Dept. of Plant Protection, Univ.

Gejala infeksi *P. viridiflava* pada daun (CABI, 2007)



Giorgio M. Balestra Dept. of Plant Protection, University of Tuscia, Via S. Camillo de Lellis, Viterbo, Italy

Gejala infeksi *P. viridiflava* pada bud (CABI, 2007)

Identifikasi :

Metode Diagnostic Agar (Schaad *et al*, 2001)

Media Semi Selektif untuk isolasi genus *Pseudomonas*:

A. Modifikasi Media KB

Pada 950 ml media KB (20,0 g Proteose pepton #3 Difco; 1,5 g K_2HPO_4 ; 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 15,0 ml Glycerol; 15,0 g Agar; 1000 ml Aquadestilata) yang telah diautoklaf, ditambahkan bahan-bahan antibiotik berikut :

- Cycloheximide 75 mg
- Penicilin 75 mg

- Novobiocin 45 mg

Campurkan ketiga antibiotik ke dalam 10 ml 95% ethanol dan kemudian encerkan dengan 40 ml aquadestilata steril, sebelum ditambahkan kedalam 950 ml media KB suhu sekitar 50°C.

Media modifikasi KB sesuai untuk isolasi semua *Pseudomonas* yang menghasilkan pigment fluorescens dari bahan tanaman. *Pseudomonas* menghasilkan diffusible pigment fluoresen berwarna kuning, hijau atau biru setelah 24 – 48 jam. Koloni fluoresens diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm.

Konfirmasi harus dilakukan untuk memastikan isolat bakteri yang diperoleh dari isolasi menggunakan media modifikasi KB termasuk spesies *Pseudomonas viridiflava*.

Karakter pembeda spesies *Pseudomonas* adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Identifikasi spesies *Pseudomonas*^a:

Karakter	<i>P. marginalis</i>	<i>P. tolaasii</i>	<i>P. agarici</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. fuscovagina</i> _e	<i>P. corrugata</i>
Diffusible fluorescent pigment	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Non-diffusible pigment	-	-	-	-	V (blue-green)	-	-	-	-
Levan	+	-	-	-	-	-	+ ^b	-	-
Oxidase	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Arginin dihidrolase	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Pectolytic activity	+	-	-	-	+	V	-	ND	-
Tobacco HR	V	-	+	+	+	+	+	-	ND
Tumbuh pada 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate menjadi N ₂	-	-	-	-	-	+	-	ND	+
PHB ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hidrolisis gelatin	ND	ND	ND	-	+	-	V	ND	+
Memanfaatkan :	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconate	+	+	+	+	+	+	+	-	ND
Mannitol	+	+	+	+	+	-	V	ND	+
Gerraniol	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Benzoate	-	-	+	-	-	-	-	ND	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	+	-	ND	-
Sorbitol	+	+	-	-	+	-	+	ND	-
Trehalose	+	V	-	-	-	+	-	ND	+

Sucrose	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Meso-tartrate	V	+	-	+	+	-	+	ND	ND
D(-)-tartrate	V	-	-	-	+	-	-	ND	V
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
L-rhamnose	V	ND	-	-	-	-	-	ND	ND
D-aspartate	-	ND	ND	+	-	-	-	-	-
Ice nucleation	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Menghasilkan IAA	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+, berarti 80% atau lebih strain positif; V, 21-79% strain positif; -, 80% atau lebih strain negatif; ; ND, tidak diketahui

^a Modifikasi dari Sand et al, 1970, Hildebrand et al, 1988, Holt et al, 1994, dan Yong & Triggs, 1994

^b Pathovar *delphini*, *populans* dan *passiflorae* negatif.

^c Poly β hydroxybutirate (PHB)

Oxidase :

Gunakan inokulum bakteri berumur 24 jam yang ditumbuhkan NGA. Pindahkan dan goreskan satu lup biakan bakteri menggunakan lup platinum/plastik steril (jangan menggunakan lup metal) pada kertas saring yang telah dilembabkan dengan 1% aq., w/v larutan NNN'N'-tetramethyl-p-phenylene- diamnine-dihydrochloride (fresh). Bila warna kertas saring pada goresan bakteri berubah menjadi ungu gelap dalam 10 - 60 detik menunjukkan reaksi positif; jika lebih dari 60 detik tidak berubah warna menunjukkan reaksi negatif.

Pectolytic activity:

Buat irisan kentang dengan ketebalan 7 – 8 mm dari kentang kupas yang telah dicuci, dcelupkan dalam alkohol dan dilewatkan pada api. Letakkan irisan kentang pada cawan Petri steril beralaskan kertas saring yang sudah dilembabkan dengan aquadestilata steril. Buat lubang kecil ditengah irisan kentang. Spot inokulasi dengan satu lup penuh suspensi bakteri. Inkubasi paling sedikit 24 jam pada suhu 22°C. Gunakan loop inokulasi untuk mengecek pada bagian yang diinokulasi apakah jaringan kentang telah hancur melewati titik inokulasi. Reaksi Positif bila jaringan kentang hancur lebih luas dari titik inokulasi.

Produksi Levan

Streak inokulasi nutrient agar (Beef extract 3,0 g; Peptone 5,0 g; agar 15 g; aquadestilata 1000 ml) ditambah dengan 5% sucrose. Inkubasi 3 – 5 hari. Levan diproduksi ketika koloni convex, putih, domed dan mucoid

Arginine dihydrolase :

Stab inokulasi tabung mengandung media Thornley: (peptone 1,0 g; naCl 5,0 g; K₂HPO₄ 0,3 g; Agar 3,0 g; Phenol red 1,0 mg; Arginine HCl 10 g, atur pH 7,2 (warna media pink sangat muda. Tutup dengan mineral oil steril atau agar air dan inkubasi 24 – 48 jam pada 28°C. Reaksi Positif bila ada perubahan warna dari pink sangat muda menjadi merah.

Ice Nucleation:

Teknik *droplet freezing* : Tumbuhkan bakteri 4-6 hari pada 18-24°C. Ambil satu koloni tunggal dari cawan petri dengan tusuk gigi dan campurkan ke dalam 0,1 ml aquadestilata untuk membuat suspensi pekat ($>10^8$ CFU/ml). Lakukan pengenceran serial dalam 10mM potassium phosphat buffer (PH7,0) dan bagi menjadi 20-40 tetesan kecil (masing-masing 10 μ l) pada suatu permukaan uji yang kemudian didinginkan pada temperatur -5 atau -10°C. Jumlah Ice Nucleation Actifity (INA) diamati secara visual. Perlu dilakukan pengujian beberapa pengenceran serial untuk mendapatkan satu atau lebih pengenceran dimana terjadi beberapa (tidak semua) tetesan menjadi beku. Permukaan uji adalah aluminium foil yang telah disemprot dengan 1% larutan parafin dalam xylene, kemudian hilangkan xylene dengan menyimpan aluminium foil dalam oven bersirkulasi pada suhu 55°C. Lipat aluminium foil menjadi seperti perahu berdasar datar, dan letakkan mengambang pada larutan air-methanol dan simpan pada -5 atau -10°C. Koloni mempunyai INA bila tetesan suspensi bakteri membeku dalam 30 detik. Tetesan beku umumnya opaque dan non-hemispherical kecuali bila yang diuji adalah suspensi pekat.

Pantoea ananas* pv. *ananas

Ruang Lingkup :

Inang Utama

[*Allium cepa* \(onion\)](#), [*Eucalyptus grandis* \(saligna gum\)](#), [*Eucalyptus nitens* \(shining gum\)](#)

Inang lain

[*Ananas comosus* \(pineapple\)](#), [*Cucumis melo* \(melon\)](#), [*Lycopersicon esculentum* \(tomato\)](#), [*Oryza sativa* \(rice\)](#), [*Sorghum sudanense* \(Sudan grass\)](#), [*Zea mays* \(maize\)](#).

Identitas Penyebab Penyakit :

Pantoea ananatis (Serrano, 1928) Mergaert et al., 1993

Taksonomi :

Domain: Bacteria
Phylum: Proteobacteria
Class: Gammaproteobacteria
Order: Enterobacteriales
Family: Enterobacteriaceae

Nama lain (sinonim) :

Pectobacterium ananas (Serrano) Patel & Kulkarni, 1951
Pantoea ananatis pv. *ananatis* (Serrano, 1928) Mergaert et al., 1993
Erwinia uredovora Pon et al., 1954
Pantoea ananatis pv. *uredovora* (Pon et al., 1954) Mergaert et al., 1993
Bacillus ananas Serrano 1928
Bacterium ananas (Serrano) Burgvits 1935
Chromobacterium ananas (Serrano) Krasil'nikov 1949
Erwinia herbicola var. *ananas* (Serrano) Dye 1969
Pectobacterium ananas (Serrano) Patel & Kulkarni 1951
Erwinia ananas pv. *uredovora* (Pon et al. 1954) Dye 1978
Erwinia urediniolytica Borders 1938
Xanthomonas uredovora
Pantoea ananas pv. *ananas* (Serrano 1928) Mergaert et al., 1993
Pantoea ananas pv. *uredovora* (Pon et al. 1954) comb. nov.

Kode EPPO :

ERWIAN (*Pantoea ananatis*)

English:

fruitlet rot of pineapple

pink disease of pineapple
brown rot of pineapple
marbling disease (of pineapple fruit)

Spanish:

marmoleado del fruto de la pina

French:

pourriture des jeunes ananas

Status dalam Peraturan (SK Menteri Pertanian atau peraturan dibawahnya) :

Kategori A1 Golongan 1 (Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian Nomor 28/KPTS/HK.060/1/2009 tanggal 22 Januari 2009).

Deteksi

Gejala Di Lapangan :



Gejala infeksi *P. ananatis* pada daun Eucalyptus (CABI 2007)

Identifikasi :

METODE DIAGNOSTIC AGAR (Schaad *et al*, 2001)

Isolasi menggunakan media diferensial dan media semi selektif

Media Luria-Bertani Agar (LB), Nutrient Agar (NA), Trypticase Soy Agar (TSA), Casamino acid-peptone glucose (CPG) dapat digunakan sebagai media isolasi. Metode isolasi sama dengan yang umum untuk bakteri pathogen tanaman. Karena genus *Pantoea* adalah salt-tolerant, sebaiknya menggunakan Buffered saline (0,01 M Potassium phosphate, pH 7,0; 0,8%

NaCl) untuk ekstraksi dan pengenceran. Suhu inkubasi 25 - 29°C. Pada LB dan NA menghasilkan koloni yang bulat, licin dan mengkilat. Pada LB koloni menghasilkan pigmen carotenoid berwarna kuning terang. Pada CPG menghasilkan koloni semi-mukoid.

Resep Media :

Media CPG :

Bacto casamino acid	1,0 g
Bacto peptone	10,0 g
Glocose	10,0 g
Agar,Purified	15,9 g
Aquadestilata	1000 ml

Media Luria-Bertani:

Tryptone	10, 0 g
NaCl	5,0 g
Yeast extract	5,0 g
Agar	15,0 g
Aquadestilata	1000 ml

Media NA:

Beef extract	3,0 g
Peptone	5,0 g
Agar	15,0 g
Aquadestilata	1000 ml

Tryticase soy Agar (media dehydrated dari BBL atau Difco)

Tabel 1. Uji determinasi membedakan *Pantoea* spp.

Uji	P. agglomerans	P. ananas	P.citrea	P. stewartii subsp. stewartii
HR pada tembakau	V ^a	-	+	+ ^a
Pigmen kuning	+	+	-	+
Pigmen Taupe pada YDC	-	-	+	-
Tumbuh pada 37°C	+	+	+	-
Menghasilkan H ₂ S dari cystein	+	V	+	-
Menghasilkan indole	V	+	-	-
Mereduksi nitrat	+	V	+	-
Mencairkan gelatin	+	+	-	-
Menghasilkan 2,5 di-keto-D-gluconate	-	-	+	-
Motility	+	+	-	-
Memanfaatkan :				
Citrate	+	+	-	-
Malonate	+	-	-	-

Tartrate	-	+	-	-
Menghasilkan asam dari :				
Cellobiose	V	+	-	-
Glycerol	-	+	+	-
Lactose	V	+	+	- ^b
Maltose	+	+	+	-
Melibiose	-	+	+	+
Raffinose	V	+	-	+
Rhamnose	+	+	-	-
Salicin	V	+	-	-
Sucrose	+	+	-	+
Meso-inositol	-	+	+	+
Mannitol	+	+	-	+
Sorbitol	-	+	-	V
Arbutin	ND	ND	-	-

+, berarti 80% atau lebih strain positif; V, 21-79% strain positif; -, 80% atau lebih strain negatif; ; ND, tidak diketahui

^a *P. agglomerans* strain saprofitik tidak menghasilkan HR positif pada tembakau, tetapi pv. *gypsophila* dan pv. *betae* positif.

^b *P.stewartii* subsp.*stewartii* tidak memanfaatkan lactose, tetapi β-galaktosidase positif

Reaksi Hypersensitif (HR) pada tembakau :

Tumbuhkan koloni bakteri pada CPG, lalu pindahkan pada media cair IM, tumbuhkan selama 6 jam, lalu diinfiltrasikan pada daun tembakau pada konsentrasi 10⁴ CFU/ml dengan syring dan jarum berukuran 25 gauge. HR positif bila kematian jaringan daun terjadi setelah 24 jam . Media IM mengandung 2 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄. 7H₂O, 100 mM MES, 0,1% cassamino acid, 1% sucrose. Atur pH 5,5 dengan 1N NaOH. Sucrose dan MgSO₄ di autoklaf terpisah.

Pigmen pada YDC :

Tumbuhkan koloni bakteri pada YDC. Resep media Yeast Extract Dextrose – CaCO₃ (YDC) adalah sebagai berikut :

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

Untuk memperoleh media berwarna putih susu, CaCO₃ harus digerus halus, bila tidak CaCO₃ 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 CaCO₃ melarut sempurna.

Menghasilkan H₂S dari cystein :

Tumbuhkan bakteri pada YS broth + cystein hydrochloride 0,1 g/L, atau YS broth + peptone 0,5 g/L selama 3, 6, dan 14 hari. Potongan kertas saring yang dilembabkan dengan 10% neutral lead acetat diposisikan diatas media pada jarak lebih kurang 5 mm diatas permukaan media. Adanya H₂S ditunjukkan dari perubahan warna kertas saring menjadi hitam.

Menghasilkan Indole:

Siapkan media mengandung 10 g tryptone, 1 g L-tryptone, dan 15 g Agar dalam 1000 ml aquadestilata. Stab inokulasi media dan inkubasi selama 48 jam pada 23-27°C. Bila telah tumbuh, uji dilakukan dengan meneteskan 2-3 tetes p-dimethylamino-cinnamaldehyde (1g dalam 100 ml 10% HCL) pada kertas saring dalam cawan Petri. Letakkan 1 lup bakteri dari koloni pada kertas saring. Perubahan warna kertas saring menjadi biru-hijau dalam 10 detik menunjukkan hasil positif. Reaksi negative ditunjukkan oleh tidak ada perubahan warna atau perubahan menjadi pink muda.

Reduksi Nitrat :

Siapkan media Nitrat Broth dengan komposisi berikut :

KNO ₃	1,0 g
Peptone	5,0 g
Yeast extract	4,0 g
Oxoid ion agar No.2	3,0 g

Atur pH 7,0 – 7,2. Bagi media kedalam tabung reaksi masing-masing 4 ml sebelum di autoklaf.

Inokulasi media dengan inokulum dan tumbuhkan selama 24-48 jam. Amati terbentuknya buih yang menunjukkan terbentuknya gas.

Siapkan reagen berikut :

0,6% (v/v) N₂N-dimethyl-1 naphthylamine (atau 0,5% alpha naphthylamine)

0,8% (v/v) sulfanilic acid

Catatan : kedua reagen dilarutkan dalam dalam 5N acetic acid (1 bagian glacial acetic acid dicampur dengan 2,5 bagian air)

Uji kultur bakteri pada beberapa waktu berbeda dengan cara menambahkan kedua reagen diatas masing-masing 1 ml kedalam setiap tabung. Perubahan warna broth menjadi pink atau merah menunjukkan terbentuknya nitrite (positif). Bila warna pink atau merah tidak terbentuk, tambahkan zinc dust kedalam tabung. Zinc dust akan bereaksi dengan nitrate menghasilkan warna pink. Ini menunjukkan hasil negatif. Tetapi bila tabung tidak menunjukkan warna pink, berarti telah terjadi denitrifikasi total, dan uji berarti positif. Sertakan tabung media steril (tidak diinokulasi) sebagai kontrol.

Catatan : **hati-hati bekerja dengan naphthylamine karena bersifat karsinogenik.**

Mencairkan gelatin:

Tambahkan 120 g gelatin kedalam 1000 ml aquadestilata, atur pH 7,0. Bagikan 10 ml media kedalam tabung reaksi, autoklaf, dinginkan segera (jangan dimiringkan). Inokulasi dengan menusukan satu lup inokulum kebagian tengah medi, kemudian inkubasi tabung pada suhu 20-22°C atau pada suhu ruang. Amati apakah terjadi pencairan gelatin.

Menghasilkan 2,5 di-keto-D-gluconate :

Bakteri digoreskan pada media MGY yang mengandung 20 g glucose. Setelah koloni tumbuh, tambahkan 4 ml 0,5% agar mengandung methylene blue (65µg/ml) dan eosin yellow (400µg/ml). Inkubasi selama 1 -5 menit pada 30°C, halo ungu disekeliling individual koloni menunjukkan aktifitas glucose dehydrogenase yang menghasilkan 2-ketogluconate dari glucose. Komposisi media MGY : Mannitol 10,0 g; L-glutamate 2,0 g; K₂HPO₄ 0,2 g; MgSO₄.7H₂O 0,2 g; yeast extract 0,2 g. Atur pH 7,0 dengan 3N NaOH.

Uji Motilitas:

Siapkan media motilitas pada tabung reaksi (jangan dimiringkan). Larutkan 10 g tryptone, 5 g sodium chloride, 5 g agar, dalam 1000 ml aquadestilata, atur pH 6,8-7,0 dan autoklaf. Inokulasi media yang telah steril dengan menusukkan satu lup inokulum ketengah media. Inkubasi dan amati setelah 8, 24, dan 48 jam. Motilitas ditunjukkan dengan adanya zona difusi pertumbuhan menyebar dari garis inokulasi. Difusi pertumbuhan bias menyebar keseluruhan media atau hanya pada jarak terbatas.

Memanfaatkan karbohidrat sebagai sumber karbon tunggal :

Sumber karbon tunggal (Citrates, malonate, tartrate) disetrilisasi dengan filter dan ditambahkan sampai konsentrasi akhir 0,1% (w/v) kedalam media garam mineral (Media Ayers) sebagai berikut :

NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Bromothymol blue (1,6% v/v dalam 95% ethanol)	1,0 ml
Agar	12,0 g
Aquadestilata	12,0 g

pH media diatur 7,2 sebelum diautoklaf. Bakteri di goreskan pada permukaan medium atau lakukan spot inokulasi, lakukan duplo, inkubasi pada 27° C selama 3, 7, dan 14 hari. Amati bila ada pertumbuhan bakteri (positif) dan bandingkan dengan plate yang tidak ditambah sumber karbon.

Menghasilkan asam dari karbohidrat dan alkohol:

Siapkan media agar miring C (Dye) dengan komposisi : 0,5 g NH₄H₂PO₄; 0,5 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O; 5g NaCl; 1 g yeast extract (Difco); 12 g agar; 1000 ml aquadestilata; 0,7 ml bromocresol purple(1,5% dalam alcohol), sterilisasi dengan autoklaf. Tambahkan sumber karbon atau alcohol dengan konsentrasi akhir 0,5% (v/v) secara aseptik dari larutan stok yang diserilisasi dengan filter. Beberapa sumber karbon seperti salicin sulit untuk difilter. Siapkan sumber karbon dengan melarutkannya dalam aquadestilata dan tambahkan ke dalam media C. Sterilkan media dengan mengukus secara berturut-turut selama 3 hari. Goreskan inokulum pada media miring C, amati produksi asam setelah 2, 4, 6, 21, dan 28 hari. Perubahan warna media menjadi kuning menunjukkan produksi asam.

Lethal Yellowing Phytoplasma

Ruang Lingkup :

Inang Utama

Cocos nucifera (coconut)

Inang lain

Arenga encleri, *Borassus flabellifer* (toddy palm), *Caryota mitis*,
Chrysalidocarpus cabadae, *Corypha utan* (gebang palm), *Dictyosperma*
album, *Howea forsteriana* (paradise palm), *Hyophorbe verschaffeltii* (spindle
palm), *Latania*, *Livistona chinensis* (chinese fan-palm), *Livistona rotundifolia*,
Phoenix canariensis (palm (Canary Island)), *Phoenix dactylifera* (date-palm),
Phoenix reclinata (senegal date palm), *Phoenix sylvestris* (east Indian wine
palm), *Trachycarpus fortunei* (chinese windmill palm), *Veitchia macdanielsii*,
Veitchia merrillii (christmas palm)

Identitas Penyebab Penyakit :

palm lethal yellowing phytoplasma

Taksonomi :

Domain: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Mollicutes

Order: Acholeplasmatales

Family: Acholeplasmataceae

Nama lain (sinonim) :

coconut lethal yellowing phytoplasma

coconut lethal yellowing mycoplasma-like organism

Kode EPPO :

PHYP56 (Coconut lethal yellowing phytoplasma)

English:

lethal yellowing of coconut

Spanish:

amarillamiento letal del cocotero

amarillez letal (Mexico)

podricion del cogollo (Cuba)

French:

pourriture du bourgeon terminal du cocotier

Status dalam Peraturan (SK Menteri Pertanian atau peraturan dibawahnya) :

Kategori A1 Golongan 1 (Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian Nomor 28/KPTS/HK.060/1/2009 tanggal 22 Januari 2009).

Deteksi

Gejala Di Lapangan :



Gambar gejala gugur buah kelapa akibat infeksi LY Fitoplasma (CABI, 2007)



Gambar gejala infeksi LY pada pohon kelapa (CABI, 2007)

Identifikasi :

Prosedur Kerja Identifikasi LY Fitoplasma dengan metode PCR dan Nested PCR :

1. Ekstraksi Sampel Uji.

Metode ekstraksi DNA sampel uji menggunakan prosedur kerja sesuai petunjuk dari produsen kit ekstraksi DNA (DNeasy[®] Plant Mini Kit (50) QIAGEN) dan metode ekstraksi Dellaporta.

- Menggunakan Qiagen Kit (DNeasy Plant Mini Kit) :

1. Timbang jaringan sebanyak 0,1 gram dan lakukan dua kali ulangan,
2. Letakkan sampel uji ke dalam mortar yang telah steril, tuang Nitrogen cair, lalu gerus menggunakan martil steril hingga seperti serbuk,
3. Tambahkan 400 ul buffer AP1 dan 4 ul RNase A stock solution, kemudian masukkan ke dalam tube 1,5 ml, dan vorteks untuk menghomogenkan larutan,
4. Inkubasi selama 10 menit pada penangas air bersuhu 65C, dan bolak-balik tube setiap 5 menit sekali,
5. Tambahkan 130 ul buffer AP2 kemudian vorteks. Inkubasi di dalam refrigerator selama 5 menit,
6. Sentrifugasi pada 14.000 rpm selama 5 menit,
7. Pipet supernatant (fase atas) lalu masukkan ke dalam Mini spin column (warna lila), dan sentrifugasi pada 14.000 rpm selama 2 menit,
8. Pindahkan fraksi yang ada di tabung bawah ke dalam tabung baru (2 ml) tanpa menyertakan pellet yang terbentuk,
9. Tambahkan 1,5 volume buffer AP3/E dan campur dengan menggunakan pipet (dengan cara menghisap dan mengeluarkan campuran menggunakan mikropipet),
10. Ambil 650 ul campuran tersebut, termasuk apabila terdapat endapan yang terbentuk, masukkan ke dalam DNeasy mini spin column (warna putih). Sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm. Buang cairan yang ada di tabung 2 ml,
11. Ulangi cara ke 11 terhadap sisa campuran, buang tabung berikut cairan yang ada di dalamnya,
12. Letakkan DNeasy mini spin column ke tabung baru (tersedia), tambahkan 500 ul buffer AW, dan sentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Buang larutan yang ada di tabung.
13. Tambahkan 500 ul buffer AW ke dalam DNeasy Mini Spin Column, lalu sentrifugasi selama 2 menit pada 14.000 rpm,
14. Pindahkan DNeasy Mini Spin Column ke tabung baru 1,5 ml, tambahkan 100 ul buffer AE dan masukkan langsung ke DNeasy membrane, inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit, lalu sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm,
15. Simpan pada rak tube yang sudah disediakan pada refrigerator bersuhu - 20°C.

2. Visualisasi DNA Genom total dengan gel elektroforesis.

Langkah ini digunakan untuk memastikan bahwa hasil ekstraksi telah benar dilakukan sesuai prosedur sebagai berikut :

Pembuatan Agarose Gel

a). Konsentrasi *Agarose gel* yang akan digunakan dalam proses elektroforesis adalah 1% untuk PCR dan 1.5% untuk nested PCR

Penghitungan :

$$\frac{1.5}{100} \times \text{kapasitas cetakan Agarose Gel (ml)} = \dots\dots\dots \text{ gr Agarose}$$

Contoh : untuk konsentrasi Agarose Gel 1.5% pada kapasitas cetakan 60 ml maka larutkan 0.9 gr serbuk Agarose dalam 60 ml larutan Buffer TAE 1X

b). Gunakan Buffer TAE 1X untuk melarutkan Agarose.

c). Panaskan larutan Agarose tersebut pada Microwave pada posisi High selama 2 menit. Dinginkan larutan tersebut hingga hangat-hangat kuku (suam-suam), kemudian tuang larutan dalam cetakan Agarose Gel yang telah dipasang *Comb* (sisir) sebanyak 10 lubang.

d). Setelah larutan Agarose mengeras, cabut *comb* dari Gel dan masukkan gel tersebut kedalam alat elektroforesis. Pastikan bahwa posisi *well* (lubang) berada di kutub negatif. Tuang Buffer TAE 1X kedalam alat elektroforesis hingga Agarose Gel terendam atau batas *fill line* yang tertera dalam tabung elektroforesis.

e). Siapkan bahan yang akan dielektroforesis (Genom total : DNA ekstrak dan *Loading Dye*; hasil PCR: DNA hasil Nested PCR, *Loading dye*, *Marker 100 bp*) Letakkan bahan tersebut diatas es agar kondisi DNA tetap terjaga kualitasnya. Siapkan potongan kertas parafilm. Teteskan *Loading dye* (2 μ l) diatas kertas parafilm dan teteskan DNA (10 μ l) diatas *Loading dye* kemudian resuspensi dan masukkan kedalam *well* (lubang) pada Agarose gel.

f). Program alat elektroforesis (75 Volt, mA : 400, waktu : 45 menit). Tutup tabung elektroforesis, kemudian jalankan elektroforesis sesuai dengan instruksi kerja masing-masing alat.

g). Setelah proses elektroforesis selesai, rendam *Agarose gel* didalam larutan *Ethidium Bromide* selama 20 menit kemudian bilas Agarose gel dengan Aquabidestilata.

h). Selanjutnya lihat penampakan DNA pada Geldoc XR.

3. Amplifikasi DNA sampel uji (PCR dan Nested PCR)

Sepasang primer general untuk Phytoplasma (P1/P7) yang digunakan akan menghasilkan produk berukuran 1800 bp. Urutan basa primer yang digunakan sebagai berikut :

P1 : 5'-AGCTCCCTAGCACAAGAAGG-3'

P7 : 5'-TCGAGCTAAGCTCATGTCGG -3'

Lakukan Nested PCR terhadap produk PCR yang telah Saudara hasilkan dengan menggunakan GE Bead (Ready to go PCR) dan sepasang primer dengan urutan sebagai berikut :

LY16sf : 5'- CAT GCA AGT CGA ACG GAA ATC-3'

LY16sr : 5'- GCT TAC GCA GTT AGG CTG TC-3'

Prosedur Kerja PCR dan Nested PCR

a). Nyalakan mesin Fast PCR Applied Biosystem sesuai IKABM 010.

b). Buat campuran (Cocktail) komponen-komponen reaksi PCR. Pencampuran dilakukan dalam kondisi steril didalam Laminar Air Flow (sesuai IKBM 012) dengan menggunakan mikrotube dan mikrotip steril juga.

Komponen reaksi PCR menggunakan GE Bead (Ready To go PCR), dengan komposisi reaksi sbb:

Komponen	Volume
Primer P1/LY16SrF	1 μ l
Primer P7/LY16SrR	1 μ l
Template (DNA)	5 μ l
ddH ₂ O (Aquabidestilata)	18 μ l
Total	25 μ l

- c). Masukkan mikrotube yang berisi campuran (cocktail) ke dalam mesin PCR.
Catatan : Sebelum mikrotube dimasukkan dalam mesin PCR, usahakan di sentrifugasi secara singkat (2.500 rpm, 10 detik) untuk menurunkan komponen PCR yang masih menempel pada dinding tabung reaksi.
- d). Program PCR yang digunakan (PHYT 1) :
- Pre-Denaturasi : 94^oC, 4 menit (1 siklus)
 - Denaturasi : 94^oC , 1 menit
 - Annealing : 59^oC, 1 menit
 - Extention : 72^oC , 1 menit, 30 detik
 - Final extention : 72^oC , 5 menit (~~1~~ siklus)
- Lanjutkan dengan proses Nested PCR, dengan program yang digunakan (LY1) :
- Pre-Denaturasi : 94^oC, 2 menit 30 detik (1 siklus)
 - Denaturasi : 94^oC , 30 detik
 - Annealing : 60^oC, 50 detik
 - Extention : 72^oC , 80 detik
 - Final extention : 72^oC , 10 menit (1 siklus)
4. Elektroforesis Hasil PCR
 Lihat prosedur kerja nomer 2.
 Hasil pengujian PCR dinyatakan positif apabila amplifikasi DNA menghasilkan produk sebesar 1800 bp. Hasil Nested PCR dinyatakan positif apabila amplifikasi DNA menghasilkan produk sebesar 1400 bp.

MEDIA PERTUMBUHAN BAKTERI

Nutrient Agar

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
Agar	20.0	g
Air suling	1000	ml

SNA (Sucrose Nutrient Agar/ Nutrient agar + 5% sucrose)

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
Agar	20.0	g
Sucrose	50.0	g
Air suling	1000	ml

Nutrient Broth

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
Air suling	1000	ml

Growth Factor Medium (GF)

KH_2PO_4	0.4	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	g
NaCl	0.1	g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5	g
FeCl_3	0.01	g
Yeast Extract	3.0	g
Agar	20.0	g
Air Suling	1000	ml

Dilarutkan dengan pemanasan dan kemudian diautoclave

King's medium B

Proteose peptone No.3	20.0	g
Glycerol	15.0	ml
K ₂ HPO ₄	1.5	g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	1.5	g
Agar	20.0	g
Air suling	1000	ml

Sesuaikan pH hingga mencapai 7,2 sebelum media diautoclave

NBY (Nutrient Broth Yeast Extract Medium)

1.

Nutrient Broth	8.0	g
Yeast extract	2.0	g
K ₂ HPO ₄	2.0	g
KH ₂ PO ₄	0.5	g
Agar	20.0	g
Air suling	950	ml

2.

Glucose	5.0	g
Air suling	50.0	ml

3.

Mg SO ₄ . 7H ₂ O	1 ml dari 1 M – membuat larutan 1 M dengan melarutkan 2,46 g Mg SO ₄ . 7H ₂ O di dalam 10 ml air suling
--	---

Ketiga larutan tersebut diautoclave secara terpisah dan kemudian dicampur.

YDC (Yeast Dextrose Calcium Carbonate Agar)

1.

Yeast extract	10.0	g
Calcium carbonate, light power (CaCO ₃)	20.0	g
Agar	20.0	g
Air suling	950	ml

2.

Dextrose (L-glucose)	20.0	g
Air suling	50	ml

Kedua larutan diautoclave secara terpisah dan kemudian dicampur dengan baik ketika temperature media 40° – 50° C.

MEDIA SELEKTIF/SEMISELEKTIF

NSCA (Nutrient Starch Cycloheximide Agar)

Semi selektif untuk *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
Soluble potato starch	15.0	g
Agar	20.0	g
Air suling	1000	ml

Autoclave dan tambahkan Cycloheximide secara steril

Cycloheximide	200 mg – 2 ml larutan yang mengandung 100 mg/ml, dilarutkan didalam 75% ethanol
---------------	---

NSCAA (Nutrient Starch Cycloheximide Antibiotic Agar)

Semi selektif untuk *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
Soluble potato starch	15.0	g
Agar	20.0	g
Air suling	1000	ml

Autoclave dan tambahkan bahan berikut ini secara steril

Cycloheximide	200 mg – 2 ml larutan yang mengandung 100 mg/ml, dilarutkan didalam 75% ethanol
Nitrofuraton	10 mg – 2 ml larutan yang mengandung 5 mg/ml, di larutkan didalam 50% dimethylformanide
Vancomycin	0.5 mg – 2 ml aqueous solution yang mengandung 0.25 mg/ml

BSCAA (Basal Starch Cycloheximide Antibiotic Agar)

Semi selektif untuk *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Soluble potato starch	10.0	g
Glycine	0.2	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
KH ₂ PO ₄	1.0	g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0.2	g
Methyl green	2.0	0,2 ml dari 1 % aqueous solution
Agar	20.0	g
Air suling	1000	ml

Autoclave dan tambahkan bahan berikut ini secara steril

Cycloheximide	200 mg –	2 ml larutan yang mengandung 100 mg/ml, dilarutkan didalam 75% ethanol
Nitrofuraton	2 mg –	0.4 ml larutan yang mengandung 5 mg/ml, di larutkan didalam 50% dimethylformanide
Vancomycin	0.1 mg –	0,4 ml aqueous solution yang mengandung 0.25 mg/ml

SX (Selektif untuk *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)

Soluble potato starch	10.0	g
Beef extract	1.0	g
K ₂ HPO ₄	2.0	g
NH ₄ Cl ₄ (ammonium chloride)	5.0	g
Methyl violet B	10.0	g
Methyl green	20.0	g
Agar	20.0	g
Air suling	1000	ml

Autoclave dan tambahkan Cycloheximide secara steril

Cycloheximide	250 mg –	2,5 ml larutan yang mengandung 100 mg/ml, dilarutkan didalam 75% ethanol
---------------	----------	--

PTS (Peptone Tyrosine Starch Medium)

Semi selektif untuk *Xanthomonas phaseoli var. fuscans*

Peptone	10.0	g
Tyrosine	1.0	g
Starch (hydrolyzed)	2.0	g
NaCl	5.0	g
Agar	20.0	g
Air suling	1000	g

MSP

Semiselektif untuk *Pseudomonas syringae pv. syringae*

Sucrose	20.0	g
Peptone	5.0	g
K ₂ HPO ₄	0.5	g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0.2	g
Bromthymol blue	15.0	mg – 1 ml larutan yang mengandung 0.15 g/10 ml, dilarutkan di dalam 50% ethanol
Agar	20.0	g
Air suling	1000	ml

Sesuaikan hingga mencapai 7.2 – 7.4, autoclave, dinginkan hingga mencapai 45 derajat celcius dan tambahkan bahan berikut ini secara steril

Cycloheximide	200 mg –	2 ml larutan yang mengandung 100 mg/ml, dilarutkan didalam 75% ethanol
Cephalexin	80 mg –	8 ml larutan yang mengandung 10 mg/ml dilarutkan didalam 75% ethanol
Vancomycin	10 mg –	1 ml aqueous solution mengandung 10 mg/ml

KBC

Semi selektif untuk *P.syringae pv.phaseolicola*

1.

Proteose peptone No.3	20.0	g
Glycerol	15.0	ml
K ₂ HPO ₄	1.5	g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	1.5	g
Agar	20.0	g
Air suling	900	ml

2.

Boric acid (H ₃ BO ₃)	1.5	g
Air suling	100	ml

Media diseterilisasi dengan autoclave dan larutan H₃BO₃ secara terpisah, didinginkan sampai 45°C, tambahkan larutan H₃BO₃ steril ke dalam media secara steril, kemudian tambahkan bahan berikut ini ke dalam campuran tersebut .

Cycloheximide	200 mg –	2 ml larutan yang mengandung 100 mg/ml, dilarutkan didalam 75% ethanol
Cephalexin	80 mg –	8 ml larutan yang mengandung 10 mg/ml dilarutkan didalam 75% ethanol

MXP

Semiselektif for *X.campestris pv.phaseoli*

K ₂ HPO ₄	0.8	g
KH ₂ PO ₄	0.6	g
Yeast extract	0.7	g
Soluble potato starch	8.0	g
KBr	10.0	g
Glucose	1.0	g
Agar	20.0	g
Air suling	1000	ml

Autoclave, dinginkan hingga suhu mencapai 40° – 50 ° dan tambahkan ke dalam media bahan-bahan berikut ini :

Chlorotalonil (Daconil 500)	15 mg –	1 ml aqueous solution yang mengandung 0.3 ml di dalam 10 ml
--------------------------------	---------	---

Cephalexin	20 mg –	2 ml larutan yang mengandung 10 mg/ml, dilarutkan didalam 75% ethanol
Kasugamycin	20 mg –	2 ml aqueous solution mengandung 10 mg/ml
Gentamycin	2 mg –	0,2 ml larutan yang mengandung 10 mg/ml, dilarutkan di dalam 75%
Methyl violet 2 B	30ug –	0,3 ml aqueous solution yang mengandung 0,01 g di dalam 100 ml
Methyl green	60ug –	0,6 ml larutan yang mengandung 0,01 g di dalam 100 ml

XTS

Semi selektif untuk *X. campestris* pv. *undulosa*

1.

Peptone	5	g
Beef extract	3	g
Agar	2	g
Air suling	950	ml

2.

Glucose	5	g
Air suling	50	ml

Dua larutan diatas disterilisasi dengan autoclave secara terpisah dan kemudian dua larutan tersebut dicampur secara steril.

Ketika media sudah dingin dan mencapai 45°C tambahkan bahan-bahan berikut ini secara steril :

Cycloheximide	200 mg –	2 ml larutan yang mengandung 100 mg/ml, dilarutkan didalam 75% ethanol
Gentamycin	8 mg –	0,8 ml larutan yang mengandung 10 mg/ml, dilarutkan di dalam 75% ethanol
Cephalexin	10 mg –	1 ml larutan yang mengandung 10 mg/ml dilarutkan didalam 75% ethanol

Nigrosin

Semi selektif untuk *Erwinia stewartii*

Yeast	1	g
Glycerine	30	ml
Sodium taurocholate	3	g
Sodium chloride	15	g
Nigrosin	20	ml dari 1 % aqueous solution
Agar	20	g
Air suling	1000	ml

Dilarutkan, dan sesuaikan pH hingga mencapai 6,7, autoclave dan tambahkan bahan berikut ini secara steril :

Nystatine 200 mg – 10, 0 ml aqueous solution yang mengandung 20 mg/ml

Nystatin yang dipergunakan harus merupakan bahan yang masih layak guna

SCM

Semi selektif untuk *C. michiganensis subsp. michiganensis*

K ₂ HPO ₄	2.0	g
KH ₂ PO ₄	0.5	g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25	g
Boric acid	1.5	g
Sucrose	20.0	g
Yeast extract	0.1	g
Agar	20.0	g
Air suling	1000	ml

Autoclave, dinginkan hingga suhu mencapai 45 -50 derajat celcius dan tambahkan bahan –bahan berikut ini :

Nicotinic acid	100 mg –	10 ml aqueous solution mengandung 10 mg/ml
Nalidixic acid (sodium salt)	30 mg –	3 ml larutan yang mengandung 10 mg/ml, dilarutkan di dalam 0,1 N NaOH
Cycloheximide	200 mg –	2 mg larutan yang mengandung 100 mg/ml, dilarutkan di dalam 75% ethanol
Potassium tellurite	10 mg –	1 ml Chapman K larutan tellurite 1% dari Difco

SNA + antibiotics

Semiselektif untuk *P.syringae pv.pisi*

1.	Peptone	5.0	g
	Beef extract	3.0	g
	Sucrose	50.0	g
	Agar	20.0	g
	Air suling	900	ml
2.	Boric acid	1.5	g
	Air suling	100	ml

Setelah media disterilisasi dengan autoclave, dinginkan hingga suhu mencapai 40 – 50 derajat celcius, campur dengan larutan boric acid dan ditambahkan dengan bahan-bahan berikut ini :

Cephalexin	80 mg	–	8 ml larutan yang mengandung 10 mg/ml, dilarutkan didalam 75% ethanol
Cycloheximide	200 mg	–	2 mg larutan yang mengandung 100 mg/ml, dilarutkan di dalam 75% ethanol

S-PG

Semiselektif untuk *P.glumae*

KH ₂ PO ₄	1.3	g
Na ₂ HPO ₄	1.2	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0	g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25	g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.024	g
EDTA- Fe	0.010	g
D-sorbitol	10.0	g
Cetrimide	0.010	g
L-cystine	10.0	ug – 0,1 ml larutan aqueous yang mengandung 0,01 g di dalam 100 ml, panaskan hingga melarut
Phenol red	0.020	g
Methyl violet	1.0	mg – 1 ml aqueous solution dari 0.01 g didalam 100 ml
Agar	20.0	g
Air suling	1000	ml

Autoclave, dinginkan hingga mencapai 45 -50 derajat celcius dan tambahkan bahan-bahan berikut ini :

Ampicillin sodium	10 mg	–	tambahkan 1 ml larutan yang mengandung 10 mg/ml di dalam 75% ethanol
Pheneticillin potassium	50 mg	–	tambahkan 5 ml aqueous solution mengandung 10 mg/ml

MEDIA LAIN DAN REAGENT

Water Agar + NaN_3

Agar	20.0	g
Orange G	0.1	g – 10 ml dari 1% aqueous solution
NaN_3	0.2	g
NaCl	8.5	g
Air suling	990	ml

pH disesuaikan hingga mencapai 7.0 - 8.0

Starch Medium

Soluble starch	2.0	g
Nutrient agar	28.0	g
Air suling	1000	ml

Larutkan bubuk nutrient agar di dalam air dengan pemanasan. Larutkan starch/kanji di dalam 10 ml air suling dan tambahkan agar cair.

Lugols iodine

Iodine	5	g
KI	10	g
Air suling	500	ml

Larutkan dengan cara distir / digerak-gerakan di dalam wadah tertutup selama beberapa jam untuk melengkapi pelarutan

Gelatin medium

Yeast extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Gelatin	120.0	g
Air suling	1000	ml

Larutan tersebut akan memadat, jika di diamkan di dalam air selama 15 menit, jika memadat, kemudian media tersebut dilarutkan dengan cara pemanasan. Atur derajat keasaman sampai kira-kira mencapai p H 7.0. Setelah itu media tersebut dituang ke dalam beberapa tabung uji dengan kedalaman 5 cm. Lalu disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121 derajat celcius selama 15 menit.

Tween 80 agar

Media dasar :

Peptone	10.0	g
NaCl	5.0	g
CaCl ₂ .H ₂ O	0.1	g
Agar	15.0	g
Air suling	1000	ml

Larutkan media dengan cara pemanasan dan sesuaikan pH hingga mencapai 7,2 – 7,4. Sterilisasi media diatas dan Tween 80 secara terpisah pada suhu 121 derajat celcius selama 15 menit. Dan tambahkan Tween 80 ke dalam media cair tesebut untuk memberikan konsentrasi akhir 0,1 %, kemudian dikocok dengan baik dan tuangkan ke dalam cawan petri.

Nitrate medium

KNO ₃	1.0	g
Peptone	5.0	g
Yeast extract	3.0	g
Oxoid agar No.3	3.0	g
Air suling	1000	ml

Sesuaikan pH hingga mencapai 7 – 7,2. Kemudian media tersebut dituangkan kedalam beberapa tabung uji, sebanyak 8 ml untuk masing-masing tabung. Lalu disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121 derajat celcius selama 15 menit.

Follet and Ratcliff's Reagent

Glacial acetic acid	50.0	ml
Air suling	360.0	ml
Sulphanilic acid	0.25	g
α – naphtol	0.20	g
10% (v/v) aqueous 0,88 larutan ammonium	90.0	ml

Tambahkan acetic acid ke dalam air, campur, hangatkan hingga suhu mencapai 50°C dan tuangkan kedalam botol kaca gelap yang mengandung sulphanilic acid. Kemudian campuran yang telah dilarutkan ini ditambahkan α – naphtol, lalu dilarutkan. Dinginkan ke dalam suhu ruang dan kemudian tambahkan larutan ammonium. Simpan di dalam tempat yang tidak terkena cahaya/ tempat yang gelap pada suhu 4°C.

Arginine medium

Peptone	1.0	g
NaCl	5.0	g
K ₂ HPO ₄	0.3	g
Phenol red	0.01	g
L – arginine HCl	10.0	g
Agar	3.0	g
Air suling	1000	ml

Campur dan larutkan dengan cara pemanasan (pH 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.

Sorbitol medium

Beef extract	1.0	g
Peptone	10.0	g
NaCl	5.0	g
Phenol red	0.018	g
Sorbitol	10.0	g
Air suling	1000	ml

Bagikan ke dalam tabung uji masing-masing sebanyak 10 ml.

Ayers, Rupp dan Johnson Base (media dasar untuk pemanfaatan karbohidrat dan asam organik)

Media dasar :

NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0	g
KCl	0.2	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2	g
Oxoid agar No. 3 (optional)	12.0	g
Air suling	1000	ml

Sesuaikan derajat keasaman hingga mencapai pH 7,2. Distribusikan larutan tersebut ke dalam jumlah yang tepat dan sterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121 ° C selama 15 menit. Untuk memperlihatkan produksi asam, tambahkan 0,0016 (w/v) bromocresol purple.

Larutan karbohidrat

Larutan karbohidrat yang ditambahkan ke dalam media dasar cair yang steril sebagai berikut :

1. Non- fluorescent pseudomonas :0,2%, karbohidrat lainnya pada 0,1%
2. Fluorescent pseudomonas :0,5%, karbohidrat lainnya pada 0,1%

Arginine differential culture medium

Pada 1000 ml media dasar Ayers et.al ditambahkan :

Bromothymol blue (1,6% cairan alcohol)	1 ml
---	------

Bacteriological agar (Oxoid No.1)	12 g
--------------------------------------	------

Sesuaikan ph hingga mencapai 7,2, autoclave dan tambahkan secara steril bahan berikut ini :

L- arginine hydrochloride (Sigma No. A-5131)	1 g	- 10 ml aqueous solution yang mengandung 1 g/ 10 ml
---	-----	---

Glycerol agar

Peptone	5	g
Yeast extract	3	g
Glycerol	20	MI
Agar	10	g
Air suling	1000	MI

Sesuaikan pH hingga mencapai 7,2

Molten agar

Peptone	0.5	g
Beef extract	0.3	g
Agar	0.7	g
Air suling	100	ml

Tuangkan ke dalam beberapa tabung uji masing-masing 3 ml.