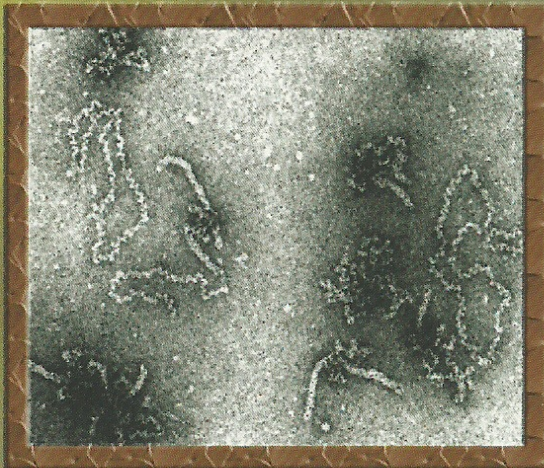
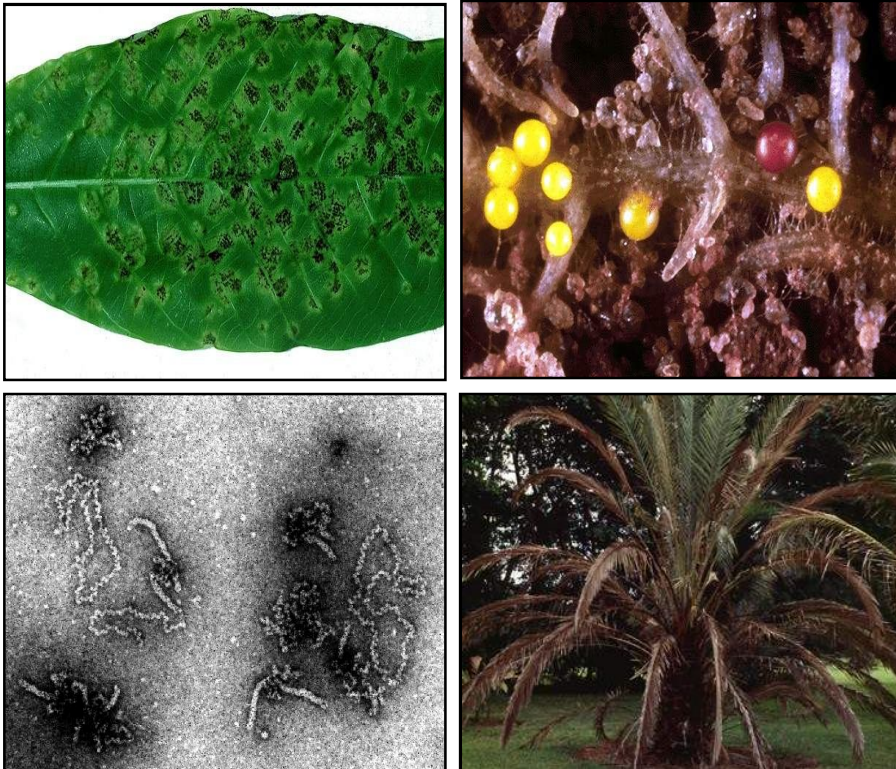


# **PEDOMAN PEMBUATAN DAN PENGELOLAAN KOLEKSI PENYAKIT TUMBUHAN**



**PUSAT KARANTINA TUMBUHAN  
BADAN KARANTINA PERTANIAN  
TAHUN 2009**

# PEDOMAN PEMBUATAN DAN PENGELOLAAN KOLEKSI PENYAKIT TUMBUHAN



PUSAT KARANTINA TUMBUHAN  
BADAN KARANTINA PERTANIAN  
DEPARTEMEN PERTANIAN  
TAHUN 2009

## KATA PENGANTAR

Pembuatan koleksi spesimen penyakit tumbuhan dan spesimen serangga hama/arthropoda dewasa ini sudah menjadi kebutuhan, sekaligus merupakan kewajiban bagi setiap negara anggota *World Trade Organization* (WTO) untuk melakukannya, sebagaimana tertuang di dalam *International Standard for Phytosanitary Measure* (ISPM) nomor 6 dan nomor 17.

Indonesia sebagai salah satu negara anggota WTO tidak bisa melepaskan diri dari tuntutan tersebut, sehingga cepat atau lambat “koleksi spesimen penyakit tumbuhan dan serangga hama/arthropoda” harus dibuat dan harus dimiliki.

Untuk membantu bagaimana hal tersebut bisa terwujud, Pusat Karantina Tumbuhan berupaya mencari informasi untuk dituangkan ke dalam bentuk buku pedoman yang dapat digunakan oleh Petugas Karantina Tumbuhan dalam membuat dan mengelola koleksi penyakit tumbuhan atau koleksi serangga hama.

Dengan berbagai keterbatasan, pedoman pembuatan dan pengelolaan koleksi ini hanya membahas penyakit tumbuhan. Mudah-mudahan tahap berikutnya pedoman pembuatan dan pengelolaan koleksi serangga hama dan arthropoda lainnya juga bisa diwujudkan.

Sebagian besar isi dan format buku ini disadur dari buku “Management of Plant Pathogen Collections” yang diterbitkan oleh Department of Agriculture, Fisheries and Forestry-Australian Government. Sebagian kecil diantaranya disesuaikan dan bagian yang lain ditambahkan untuk lebih mudah difahami.

Perlu disampaikan bahwa pedoman pembuatan dan pengelolaan koleksi penyakit tumbuhan ini hanya untuk memenuhi kebutuhan internal Badan Karantina Pertanian.

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 .....	v
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1. Latar Belakang .....	1
2. Tujuan .....	2
BAB II KOLEKSI PENYAKIT TUMBUHAN .....	3
1. Herbarium .....	3
2. Koleksi Kultur ( <i>Culture Collection</i> ) .....	3
3. Daftar Organisme Pengganggu Tumbuhan .....	4
BAB III MEMBANGUN KOLEKSI .....	8
1. Penambahan Koleksi.....	8
2. Pengumpulan Spesimen dari Lapangan.....	9
3. Penanganan Spesimen .....	11
3.1 Penanganan Daun, Batang, dan Buah .....	12
3.2 Penanganan Akar dan Tanah .....	14
3.3 Penanganan Cendawan <i>Basidiomycetes</i> .....	15
4. Pelabelan Spesimen .....	16
5. Survei dan Pengambilan Sampel .....	17
BAB IV PENGUJIAN SPESIMEN .....	19
1. Pewarnaan Cendawan dan Bakteri .....	19
2. Mikroskop Cahaya .....	22
3. Fotografi .....	23
3.1 Pemberian Nama File dan Pengelolaannya .....	23
BAB V ISOLASI CENDAWAN, BAKTERI, DAN NEMATODA .....	24
1. Isolasi Cendawan .....	25
1.1 Menumbuhkan Cendawan dalam Sungkup Lembab .....	26
1.2 Menumbuhkan Cendawan dengan Teknik Pengenceran .....	27
1.3 Pertumbuhan Cendawan dan Sporulasi .....	28
2. Isolasi Bakteri .....	29
3. Isolasi Nematoda .....	30
3.1 Ekstraksi Nematoda dari Sampel Tanah .....	31
3.2 Ekstraksi Nematoda dari Sampel Tanaman .....	34
3.3 Pengawetan dan Pembuatan Preparat .....	35
4. Media Tumbuh .....	38
BAB VI. MENGAWETKAN DAN MENYIMPAN SPESIMEN .....	41
1. Spesimen Herbarium .....	41
1.1 Spesimen Kering .....	41
1.2 <i>Type Specimen</i> .....	43
1.3 Biakan Kering .....	44

1.4	Preparat .....	45
1.5	Pengemasan dan Pengiriman .....	46
2.	Kultur .....	46
2.1	Menumbuhkan di Media Agar .....	47
2.2	Menyimpan di dalam Minyak Mineral .....	47
2.3	Menyimpan di dalam Air .....	48
2.4	Menyimpan pada Kondisi Kering-Beku .....	48
2.5	Menyimpan Biakan dalam Tanah .....	48
2.6	Menyimpan pada Silika Gel .....	49
2.7	Menyimpan pada Kertas Saring .....	49
2.8	Menyimpan dengan Metode <i>Cryopreservation</i> .....	50
2.9	Menyimpan dalam Nitrogen Cair .....	50
BAB VII IDENTIFIKASI PATOGEN .....		51
1.	Identifikasi Cendawan .....	51
1.1	Patogen Menyerang Akar .....	52
1.2	Patogen Menyerang Batang .....	53
1.2.1	Layu Pembuluh ( <i>vascular wilt</i> ) .....	53
1.2.2	Kanker ( <i>canker</i> ) .....	53
1.2.3	Puru ( <i>gall</i> ) .....	53
1.2.4	Sapu Setan ( <i>witches' broom</i> ) .....	53
1.2.5	Kerak Pink .....	54
1.3	Patogen Menyerang Daun .....	54
1.3.1	Antraknosa ( <i>anthracnose</i> ) .....	54
1.3.2	Karat Putih ( <i>white rust</i> ) .....	54
1.3.3	Hawar ( <i>blight</i> ) .....	54
1.3.4	Lodoh ( <i>scald</i> ) .....	55
1.3.5	Blas ( <i>blast</i> ) .....	55
1.3.6	Kudis ( <i>scab</i> ) .....	55
1.3.7	Embun Tepung ( <i>downy mildew</i> ) .....	55
1.3.8	Embun Tepung ( <i>powdery mildew</i> ) .....	56
1.3.9	Embun Jelaga ( <i>sooty mould</i> ) .....	56
1.3.10	Embun Hitam ( <i>black mildew</i> ) .....	56
1.4	Patogen Menyerang Buah dan Biji .....	56
1.4.1	Ergots .....	57
1.4.2	Cendawan Karat ( <i>rust fungi</i> ) .....	57
1.4.3	Cendawan Gosong ( <i>smut fungi</i> ) .....	58
2.	Identifikasi Bakteri .....	59
3.	Identifikasi Fitoplasma ( <i>Phytoplasmas</i> ) .....	60
4.	Identifikasi Virus dan Viroid .....	61
4.1	Spesies Virus .....	61
4.2	Gejala Disebabkan Virus .....	63
5.	Identifikasi Nematoda .....	66
5.1	Pentingnya Identifikasi .....	66
5.2	Mengenal Nematoda Parasit Tumbuhan .....	67
5.3	Identifikasi Spesies .....	67
6.	Teknik Diagnosis .....	68
6.1	Mikroskop Elektron/ <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM) .....	68

6.2	Teknik Biokimia dan Molekuler .....	68
6.3	Serologi/Imunologi .....	69
6.4	Metode Berbasis Asam Nukleat ( <i>Nucleic Acid-Based Method</i> ) .....	69
BAB VII	MEMELIHARA CATATAN SPESIMEN .....	71
1.	Database .....	71
BAB VIII	MEMELIHARA KOLEKSI .....	72
1.	Fasilitas Herbarium .....	72
2.	Pengendalian Serangga Perusak .....	72
3.	Pengendalian Tungau .....	73
4.	Spesimen Herbarium Pinjaman ( <i>Loans</i> ) .....	74
5.	Keamanan .....	75
5.1	Keamanan Fisik .....	75
5.2	Etika dan Tanggungjawab .....	75

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Hal</b>
Gambar 1. Koleksi Hidup Cendawan <i>Psathyrella</i> sp. di Cornell Plant Pathology Herbarium, AS .....	4
Gambar 2. Diagram Slide Culture Technique .....	23
Gambar 3. Diagram penggoresan suspensi bakteri di atas medium agar .....	30
Gambar 4. Diagram metode Whitehead .....	32
Gambar 5. Diagram metode Baermann Funnel .....	33
Gambar 6. Diagram metode pengabutan .....	35
Gambar 7. Diagram preparat awetan dengan perekat lilin .....	37

# I. Pendahuluan

## 1. Latar Belakang

Nilai penting koleksi biologi, termasuk herbaria dan koleksi kultur penyakit tumbuhan, telah menjadi subyek bahasan dalam sejumlah tulisan dan *review* yang dipublikasi dalam berbagai literatur ilmiah. *International Plant Protection Convention (IPPC)* dan *SPS Agreement* memberlakukan kewajiban pada negara pengekspor untuk menyediakan informasi tentang daftar Organisme Pengganggu Tumbuhan (OPT) yang berpotensi berasosiasi dengan komoditas yang diekspor kepada negara pengimpor. IPPC menetapkan kewajiban untuk memberikan informasi teknis dan biologi yang diperlukan untuk *pest-risk analysis* dalam rangka pengakuan informasi spesifik mengenai status OPT suatu produk.

Dalam rangka memenuhi kewajiban tersebut, dan juga untuk melakukan *pest-risk analyses* dan menetapkan peraturan mengenai kesehatan tanaman untuk mencegah pemasukan ataupun penyebaran dari suatu OPT, semua negara, termasuk Indonesia diharuskan melakukan pengelolaan rekaman OPT yang dapat dipercaya (*reliable*) dalam bentuk pembuatan dan pengelolaan koleksi OPT.

Berdasarkan *International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM)* nomor 8 disebutkan bahwa, “ .... ketetapan rekaman OPT yang dapat dipercaya dan penentuan status OPT merupakan komponen penting dari sejumlah kegiatan di bawah lingkup IPPC dan dengan prinsip yang tercantum dalam ISPM nomor 1 mengenai prinsip karantina tumbuhan terkait dengan perdagangan internasional, dan standar internasional untuk pengukuran kesehatan tanaman yang dikembangkan di dalamnya”. ISPM nomor 8 menyatakan bahwa semua negara dapat menggunakan informasi status OPT untuk : tujuan *pest-risk analysis*, perencanaan program pengendalian OPT secara internasional, nasional dan regional, menetapkan daftar OPT nasional, dan penetapan dan pengelolaan daerah bebas OPT.

Informasi tentang keberadaan OPT di suatu negara merupakan hal yang sangat penting di masa sekarang. Dalam lingkup perdagangan internasional, rekaman (*records*) yang didasarkan pada *voucher specimen*<sup>1</sup> yang dilakukan secara teliti dapat menghasilkan bukti yang terpercaya mengenai status kesehatan tumbuhan suatu negara. Selain itu, spesimen dan materi lain yang terdapat dalam koleksi biologi OPT akan dapat menjadi kekuatan untuk meningkatkan posisi tawar dalam pasar internasional.

---

<sup>1</sup> *Voucher specimen* merupakan spesimen yang didapatkan dalam lingkup biologi, baik survei maupun riset, dan diawetkan untuk memberi kesempatan dilakukannya verifikasi dan studi lebih lanjut ([ilmbwww.gov.bc.ca](http://ilmbwww.gov.bc.ca))

## **2. Tujuan**

Pedoman teknis pembuatan dan pengelolaan koleksi penyakit tumbuhan dimaksudkan sebagai acuan bagi petugas karantina tumbuhan di Unit Pelaksana Teknis (UPT) lingkup Badan Karantina Pertanian dalam melaksanakan kegiatan pembuatan dan pengelolaan koleksi penyakit tumbuhan, baik dari golongan cendawan, nematoda, bakteri, dan virus.

Tujuannya adalah dalam rangka mensosialisasikan pembuatan dan pengelolaan koleksi penyakit tumbuhan, baik yang diperoleh dari hasil intersepsi teknis operasional karantina maupun hasil pemantauan daerah sebar OPT/OPTK.

## II. Koleksi Penyakit Tumbuhan

### 1. Herbarium

Herbarium adalah tempat untuk menyimpan koleksi spesimen biologi yang sudah mati, sudah dikeringkan, dipres (*pressed*) atau diawetkan berikut dengan organisme penyebab penyakitnya, dan dilengkapi dengan informasi (data) yang menyertainya. Oleh sebab itu, herbarium penyakit tumbuhan pada dasarnya terdiri dari dua bentuk koleksi, yaitu koleksi spesimen tanaman inang dan koleksi spesimen dari organisme penyebab penyakit (patogen), seperti: cendawan, bakteri, virus, viroid, nematoda, fitoplasma dan organisme menyerupai rickettsia (*rickettsia-like organism*).

Herbarium cendawan beserta informasinya dimanfaatkan oleh para taksonomis, *plant pathologist* (ahli penyakit tanaman) dan para ilmuwan yang menekuni bidang kesehatan tanaman, petugas karantina, *bioprospector* dan para pembuat kebijakan, untuk berbagai kepentingan, seperti *biosecurity* dan konservasi keanekaragaman hayati. Beberapa lembaga yang menangani herbarium antara lain Herbarium Bogoriense, *CABI Bioscience*, UK Center dan lain sebagainya. Setiap koleksi hendaknya dilengkapi dengan sistem penomoran yang spesifik sehingga mudah untuk ditelusuri, didahului oleh singkatan dari nama herbarium tersebut, sebagaimana contoh dalam boks di bawah ini:

P.BAS000001.R01

P artinya penyakit  
BAS berarti cendawan basidiomycetes sebagai patogen  
000001 berarti nomor koleksi  
R01 berarti ruang satu

Setiap lembaga pengelola harus memiliki buku pedoman yang berisikan indeks herbarium dan dipublikasikan untuk memudahkan proses pencarian spesimen. Berdasarkan data (Indeks Herbarium), koleksi yang sudah ada dewasa ini jumlahnya mencapai lebih dari 3000 herbaria di seluruh dunia, dengan jumlah tenaga yang menanganinya lebih dari 9000 orang. Indeks herbarium tersedia secara *online* dan informasinya bisa diperoleh berdasarkan singkatan nama institusi, nama staf atau nama peneliti spesialisnya. Indeks herbarium adalah proyek kerjasama antara ***The International Association for Plant Taxonomy*** dengan ***New York Botanical Garden***.

### 2. Koleksi Kultur (*Culture Collection*)

Koleksi kultur adalah suatu upaya untuk mempertahankan isolat mikroorganisme patogen seperti cendawan atau bakteri agar tetap dalam kondisi hidup, dengan cara menumbuhkannya pada suatu medium, sehingga selalu tersedia bilamana diperlukan. Teknik pengawetan kultur ada beberapa macam, mulai dari menumbuhkan secara terus menerus hingga metode dimana metabolisme biakan dikurangi atau bahkan dihentikan sama sekali.

***The World Federation for Culture Collections*** (WFCC) adalah lembaga internasional yang berperan penting dalam hal koleksi, mempertahankan keaslian, perawatan dan distribusi kultur mikroorganisme maupun biakan sel. Lembaga ini berfungsi untuk membantu pihak tertentu dalam membuat koleksi kultur dan memberi pelayanan terkait lainnya, serta menjamin agar biakan mampu bertahan lama. Disamping itu, juga berfungsi sebagai penghubung antara koleksi kepada penggunanya (*user*) dengan membangun

jejaring informasi. WFCC juga memiliki *database* berkaitan dengan sumber koleksi kultur (*culture resources*) yang tersebar di seluruh belahan dunia. *Database* ini dikelola oleh **National Institute of Genetic** yang berkedudukan di Jepang dan telah tercatat hampir 500 jenis koleksi kultur yang berasal dari 62 negara. Catatan atau data yang tersedia berisikan tentang organisasi, manajemen, pelayanan yang diberikan serta arti penting koleksi dari segi keilmuan.



**Kode:** CUP-LP-205a

**Nama Koleksi:**

*Psathyrella* sp.

**Deskripsi:** rotten wood

**Genus:** *Psathyrella*

**Species:** sp.

**Tanggal:** 7/24/1999

**Tempat:** Lindsay-Parsons  
Biodiversity Preserve,  
West Danby, NY.

**Kreator:** K.E. Loeffler

Gambar 1. Koleksi Hidup Cendawan *Psathyrella* sp. di  
Cornell Plant Pathology Herbarium, AS

### 3. Daftar Organisme Pengganggu Tumbuhan (*Pest List*)

Daftar Organisme Pengganggu Tumbuhan (OPT) merupakan kompilasi jenis-jenis OPT yang sudah didata pada suatu negara atau area tertentu di dalam suatu negara. OPT yang didata adalah spesies-spesies yang menyebabkan dampak secara ekonomi pada suatu jenis tanaman inang.

Informasi berkaitan dengan status kesehatan tanaman budidaya maupun tumbuhan hutan, baik spesies lokal maupun spesies yang didatangkan dari luar memiliki banyak kegunaan, antara lain diperlukan pada saat suatu negara merencanakan untuk mengeksport komoditas pertaniannya ke pasar internasional.

Daftar OPT dianggap dapat dipercaya apabila dilengkapi dengan *voucher specimen*, sedangkan daftar OPT yang hanya didasarkan pada laporan dan tidak dilengkapi dengan koleksi dinilai kurang bisa dipercaya. Tingkat kepercayaan juga bisa didasarkan kepada tingkat keahlian dari kolektor dan petugas yang melakukan determinasi, termasuk metode yang digunakan dalam identifikasi serta tingkat publikasinya. Laporan hasil kegiatan yang dipublikasikan pada jurnal internasional misalnya, akan lebih dipercaya dibandingkan dengan laporan atau tulisan yang tidak dipublikasikan atau tidak divalidasi.

Sumber-sumber informasi yang dapat digunakan dalam penyusunan daftar OPT antara lain:

- Koleksi OPT yang dimiliki oleh lembaga/instansi bidang pertanian, lembaga penelitian, universitas dan institusi lainnya;
- Literatur utama, seperti jurnal ilmu pengetahuan, laporan hasil penelitian, buku-buku, laporan karantina, hasil koresponden dengan pihak yang memiliki kewenangan berkaitan dengan kesehatan tanaman dan karantina;
- Literatur sekunder, seperti *CABI Crop Protection Compendium*;
- Prosiding, pamflet dan hasil analisis risiko OPT (AROPT);
- Informasi lain, seperti hasil konsultasi dengan ilmuwan, laporan surat kabar serta sumber informasi yang berbasis elektronik (internet).

Selanjutnya bagaimana format daftar OPT yang akan dibuat sangat tergantung kepada keinginan si penyusun atau kegunaan dari daftar OPT itu sendiri. Berikut ini adalah contoh daftar OPT pada tanaman pepaya.

#### CARICACEAE

*Carica papaya* L.

*Alternaria tenuis* Nees – Leather fruit spot

*Ascochyta caricae* Pat. – Black spot

*Botryosphaeria rhodina* (Ber. & M.A. Curt.) Arx – Fruit rot

*Colletotrichum acutatum* (J.H. Simmonds) – Ripe fruit spot

*Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curt) C.T. Wei – Leaf spot

*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk – Ripe fruit spot

*Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. – Stem girdling

*Phytophthora cinnamomi* Rands – Root rot

*Sclerotium rolfsii* Sacc. – Damping-off

*Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk – Damping-off

*Verticillium dahliae* Kleb. - Wilt

Daftar OPT umumnya disusun berdasarkan hasil kegiatan, diantaranya:

- a. Pemantauan/surveilan;
- b. Pengumpulan spesimen;
- c. Spesimen awetan yang dikelola dengan baik;
- d. Hasil survei yang dilaksanakan dengan baik sesuai dengan target komoditi dan area yang relevan;
- e. Hasil kerjasama dengan lembaga/instansi lain.

Berdasarkan pengalaman, penyusunan daftar OPT merupakan pekerjaan yang sulit. Hal tersebut disebabkan karena informasi yang dibutuhkan biasanya tersebar pada berbagai institusi, misalnya:

- a. Lembaga/Instansi bidang pertanian dan atau kehutanan;
- b. Museum Biologi (*Museum of Natural History*);
- c. Lembaga-lembaga penelitian tanaman;
- d. Lembaga-lembaga akademik yang melakukan penelitian.

Mengingat pentingnya informasi yang menyertai suatu herbarium penyakit tanaman dan koleksi patogen, data sebaiknya dimasukan dan disimpan ke dalam *database*, sehingga informasi secara elektronik dapat dengan mudah ditemukan oleh yang memerlukannya. Dewasa ini sudah tersedia sistem teknologi informasi yang memberi kemudahan, kenyamanan dan kecepatan. Pengadaan program dimana dibutuhkan kegiatan-kegiatan seperti ini kemungkinan tidak terlalu mahal, akan tetapi biaya yang lebih besar biasanya akan dibutuhkan pada saat proses penambahan data ke dalam *database*. Data biasanya sulit diperoleh dan tersebar dimana-mana, sehingga sering menjadi hambatan pada tahap awal pembuatan *database*. Beberapa informasi yang diperlukan dalam data OPT (*pest record*) hasil modifikasi ISPM No.8.

Dewasa ini masih banyak negara yang belum memiliki pusat informasi terkait dengan kesehatan tanaman dan koleksi referensi berikut catatan penyakit di dalamnya. Hal tersebut dikarenakan informasi masih tersebar di beberapa institusi. Kondisi seperti ini mengakibatkan informasi sulit diperoleh pada saat diperlukan. Namun demikian, perkembangan teknologi informasi yang begitu pesat mulai dapat mengatasi permasalahan-permasalahan, sehingga berbagai *database* yang terisolasi secara geografi dapat

dihubungkan satu sama lain (*linked*), dan dapat di akses melalui satu portal. Selanjutnya, dengan bantuan teknologi dapat dibuat *database* dalam lingkup nasional atau regional, dan informasi yang ada didalamnya dapat diperbaharui secara regular. Dengan demikian data tentang penyakit tumbuhan dapat diakses melalui situs (*website*) yang dipublikasikan oleh pembuatnya/pemilikinya, walaupun terkadang diperlukan ijin untuk mengaksesnya atau dilindungi *password*.

- a. Nama ilmiah (genus, spesies, *infraspecies*);
- b. Stadium hidup;
- c. Group taksonomi;
- d. Metode identifikasi (termasuk nama yang melakukan identifikasi)
- e. Tanggal pengambilan bahan koleksi (termasuk nama yang melakukan pengambilan);
- f. Uraian lokasi tempat pengambilan bahan koleksi:
  - Nama tempat (kota, kabupaten, provinsi);
  - Nama negara;
  - *Global Positioning System* (GPS) untuk menggambarkan koordinat (*latitude & longitude*);
- g. Nama ilmiah tanaman inang (genus, spesies, *infraspecies*);
- h. Kerusakan yang terjadi pada tanaman inang;
- i. Prevalensi<sup>2</sup>;
- j. Pustaka.

Pengelola informasi dengan sistem *database* memiliki kemampuan untuk mengintegrasikan beragam data dari berbagai institusi, dengan ketentuan:

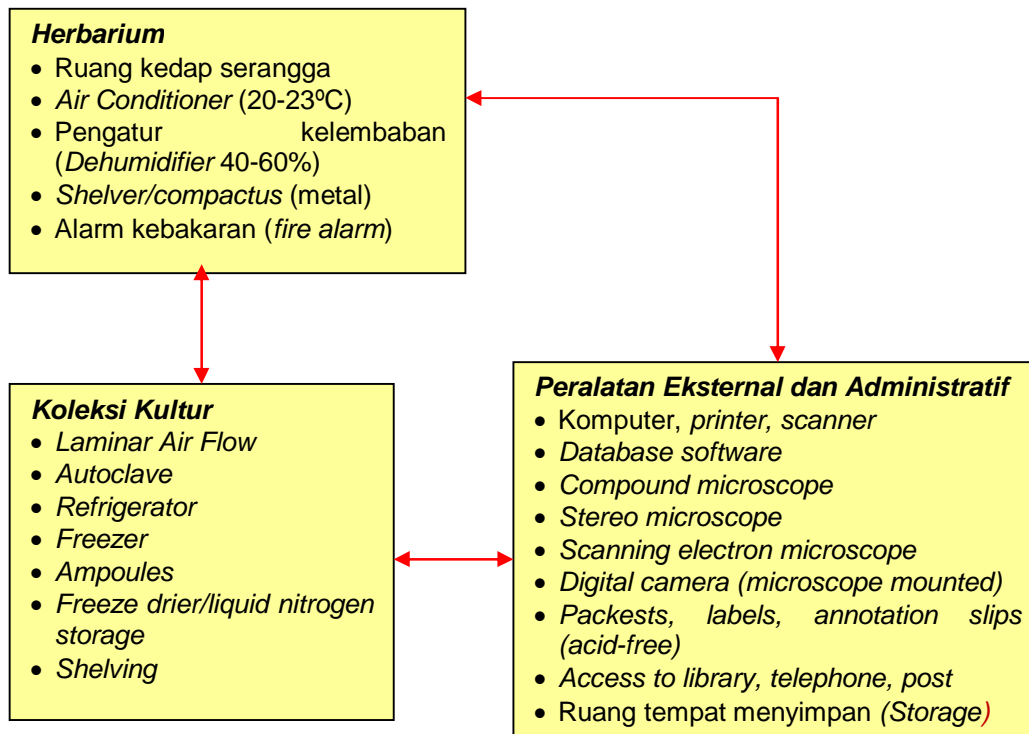
- Data-data penyakit tanaman yang dikelola oleh suatu institusi harus disimpan dalam bentuk elektronik *database* dan dapat dihubungkan dengan internet.
- Pengelola informasi harus dapat mengembangkan dan mengadaptasikan sistemnya ke portal yang spesifik (*specific gateway*) atau broker sehingga diperlukan *software/program* yang mampu menghubungkan seluruh data dari berbagai sumber.
- Setiap institusi bersedia untuk saling tukar-menukar data dan memiliki komitmen untuk secara terus-menerus memelihara koleksinya sebagai bagian dari jejaring informasi.

---

<sup>2</sup> Prevalensi merupakan jumlah kejadian/kasus penyakit di suatu populasi pada waktu tertentu atau jumlah kejadian/kasus penyakit di suatu populasi dibagi dengan jumlah individu pada populasi tersebut ([en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org))

### III. Membangun Koleksi

Penanganan spesimen-spesimen yang disimpan di dalam herbaria berbeda dengan spesimen yang disimpan dalam bentuk koleksi kultur, sehingga peralatan yang diperlukan berbeda. Namun untuk peralatan yang bersifat administratif atau eksternal dapat menggunakan peralatan yang sama, misalnya *specimen database* dari seluruh koleksi. Peralatan pokok yang sebaiknya dimiliki oleh herbaria dan koleksi kultur ditampilkan pada bagan 1.



Bagan 1. Peralatan pada herbarium penyakit tumbuhan dan koleksi kultur

#### 1. Penambahan Koleksi

Sumber utama spesimen untuk membangun suatu koleksi penyakit tumbuhan biasanya berasal dari para ilmuwan yang bekerja di laboratorium diagnostik. Umumnya laboratorium diagnostik berada di bawah instansi pemerintah, seperti pusat-pusat penelitian dan universitas. Spesimen yang berasal dari lapangan, terutama hasil survei biasanya dikirim ke laboratorium diagnostik. Di laboratorium ini akan diputuskan apakah spesimen akan disimpan sebagai koleksi atau tidak. Spesimen-spesimen dengan catatan sebagai patogen baru atau inang yang baru atau lokasi yang baru sebaiknya disimpan pada herbarium yang sudah dikenal. Beberapa herbaria memiliki staf di bidang diagnosis dan spesialis yang dapat melakukan determinasi terhadap identitas suatu patogen.

Spesimen seringkali diperoleh dari staf perguruan tinggi atau mahasiswa dan pusat-pusat penelitian, terutama jika dalam karya yang dipublikasi dipersyaratkan mencantumkan nama herbarium dimana spesimen-spesimen hasil suatu kajian disimpan. Identitas suatu patogen sebagai hasil survei atau hasil penelitian harus diverifikasi (secara ekologi, epidemiologi, pilogenetik, morfologi dan molekuler) dengan benar.

Penambahan jumlah spesimen bisa diperoleh dari hasil tukar menukar spesimen antar herbaria. Penambahan juga bisa diperoleh dari hadiah/cinderamata, bantuan atau dengan cara membeli. Bantuan secara permanen dapat berupa pinjaman koleksi tanpa batas waktu dari suatu institusi kepada institusi lain dapat dilakukan dengan maksud untuk menyelamatkan spesimen koleksi. Hal tersebut dapat terjadi karena institusi pemberi bantuan sudah tidak mampu mengelola spesimen yang diberikan.

## 2. Pengumpulan Spesimen dari Lapangan

Sebagian besar koleksi spesimen penyakit tumbuhan diambil dari areal pertanian atau dari lingkungan alami. Spesimen penyakit tumbuhan dapat dikenali dengan melihat gejala dan tanda dari suatu penyakit. Gejala penyakit didefinisikan sebagai adanya perubahan penampilan yang dapat diamati pada suatu tanaman atau bagian tanaman yang disebabkan oleh suatu penyakit (Tabel 1). Gejala dapat juga disebabkan oleh terjadinya gangguan, seperti fotosintesis yang tidak efisien, gangguan pada reproduksi bagian-bagian tanaman, gangguan penyerapan air dan gangguan pada sistem translokasi nutrien. Sedangkan tanda suatu penyakit diartikan sebagai adanya struktur patogen yang berasosiasi dengan suatu penyakit, seperti adanya tubuh buah cendawan atau struktur lain.

Beberapa struktur yang disebut sebagai tanda penyakit antara lain:

- Askomata, aservuli, konidiofora, piknidia, yaitu tubuh buah cendawan berukuran kecil dimana konidia diproduksi.
- Basidiokarp, yaitu tubuh buah dari cendawan golongan polypore atau agarik.
- Miselium, yaitu masa hifa atau benang-benang cendawan.
- Ooze, yaitu eksudat berupa lendir yang keluar dari luka atau lubang alami lainnya.
- Rhizomorf, yaitu hifa cendawan yang nampak seperti untaian tali.

Tabel 1. Beberapa bentuk gejala berikut deskripsinya

Gejala	Deskripsi
• <i>Anthraco</i>	Bercak nekrotik berwarna hitam disebabkan oleh <i>Colletotrichum</i>
• <i>Black mildew</i>	Tumpukan koloni cendawan yang berwarna hitam ( <i>Meliolales</i> ) biasanya terdapat di permukaan atas daun dan sering ditemukan pada tanaman di daerah tropik
• <i>Blight</i>	Kematian jaringan tanaman yang terjadi sangat cepat dan meluas
• <i>Canker</i>	Lesio nekrotik berlekuk biasanya terjadi pada batang berkayu, ranting atau akar
• <i>Damping-off</i>	Rebah kecambah disebabkan oleh terjadinya pembusukan pada bagian dekat permukaan tanah yang diakibatkan oleh cendawan seperti <i>Pythium</i> dan <i>Rhizoctonia</i>
• <i>Dieback</i>	Kematian (defoliasi) bagian cabang dan ranting yang dapat diikuti oleh kematian seluruh tanaman
• <i>Downy mildew</i>	Tumpukan sporangiosphore dan sporangia cendawan (kelompok <i>Peronosporales</i> ) berwarna keputihan pada permukaan daun maupun batang.
• <i>Enation</i>	Pertumbuhan abnormal/berlebihan jaringan tumbuhan, seringkali berbentuk pipih dan biasanya terjadi pada daun dan bunga.
• <i>Fasciation</i>	Pertumbuhan tunas kecil-kecil, bengkok dan bergerombol
• <i>Gall</i>	Pembengkakan abnormal atau tumor
• <i>Gummosis</i>	Keluarnya cairan (gum)/bocor dari jaringan tumbuhan
• <i>Lesion</i>	Jaringan tanaman sakit yang sifatnya terbatas (luka)
• <i>Mosaic</i>	Variasi warna antara hijau gelap dan hijau muda (belang) pada daun, merupakan gejala yang biasanya disebabkan oleh virus.
• <i>Phyllody</i>	Perubahan bentuk bunga menyerupai daun.

• <i>Powdery mildew</i>	Tumpukan miselium, conidia dan conidiophore cendawan (kelompok Erysiphales) pada permukaan tanaman yang berwarna putih
• <i>Pustule</i>	Melepuh pada tempat dimana cendawan penyebab penyakit berada
• <i>Root knot</i>	Pembengkakan atau gall yang terjadi pada akar disebabkan oleh beberapa jenis nematoda (misalnya <i>Meloidogyne</i> )
• <i>Rot</i>	Pembusukan pada jaringan tumbuhan disebabkan oleh enzim yang dihasilkan oleh organisme patogen (gejala dapat berupa busuk kering, busuk lunak, busuk basah berwarna hitam/putih)
• <i>Rust</i>	Pustule yang disebabkan oleh kelompok cendawan penyebab penyakit karat (kelompok Uredinales)
• <i>Scab</i>	Gejala menyerupa kudis yang terjadi di permukaan jaringan tumbuhan
• <i>Scald</i>	Gejala yang tampak seperti terseduh air panas
• <i>Shothole</i>	Gejala nekrotik yang bersifat lanjut berupa lobang pada daun sebagai akibat jaringan sakit terlepas dari bagian yang masih sehat
• <i>Smut</i>	Kumpulan spora cendawan (kelompok Ustilaginomycetes) berwarna hitam pada permukaan daun, bunga atau batang.
• <i>Sooty mould</i>	Kumpulan masa cendawan saprofit (Capnodiales) berwarna hitam pada permukaan batang atau daun yang hidup dari eksudat yang dikeluarkan oleh kutu daun ( <i>Aphid</i> atau <i>Scale</i> )
• <i>Virescence</i>	Terbentuknya warna hijau pada bagian tumbuhan yang seharusnya tidak berwarna hijau, terutama terjadi pada bunga
• <i>Wilt</i>	Hilangnya turgiditas dan gugurnya/rontoknya bagian tumbuhan
• <i>Witches' broom</i>	Pertumbuhan tunas atau ranting di tempat yang berdekatan (bergerombol)

### 3. Penanganan Spesimen

Spesimen yang akan digunakan dalam diagnosis penyakit tanaman maupun untuk keperluan taksonomis harus ditangani secara hati-hati. Jika suatu penyakit sedang berlanjut dan organisme patogen penyebabnya masih aktif, maka sampel tanaman yang paling baik adalah bagian tanaman yang menunjukkan gejala pada tingkat awal hingga tingkat menengah. Sampel tanaman dengan gejala penyakit sudah terlalu berat seringkali tidak berguna. Hal tersebut dikarenakan organisme patogen penyebabnya sudah tidak dapat dilihat lagi disebabkan oleh tumbuhnya organisme saprofit pada jaringan nekrotik, sehingga isolasi organisme penyebab penyakitnya sulit dilakukan. Dengan demikian, pengambilan sampel merupakan hal penting. Disamping itu, pengetahuan dasar tentang gejala penyakit dan bagaimana gejala tersebut terjadi sangat dibutuhkan, sehingga yakin bahwa bagian tanaman yang diambil sebagai sampel adalah bagian yang benar-benar terserang oleh patogen.

Dalam beberapa kasus, suatu gejala penyakit terlihat di suatu bagian tanaman namun organisme penyebabnya bisa saja berada di tempat lain; sebagai contoh: gejala layu biasanya mudah terlihat pada daun, walaupun patogen penyebabnya berada pada sistem pembuluh di dalam batang atau di dalam akar.

Tabel 2. Peralatan yang digunakan dalam pengambilan spesimen penyakit.

Gunting pemangkas rumput Lensa tangan Gunting Peta <i>Global Positioning System</i> (GPS) Tas plastik	Alat pres Sekop Pulpen / spidol Gergaji Literatur Pensil	Kertas koran Tas kertas Amplop Parang Label Kotak es/ <i>ice box</i>
---	---	---

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pengambilan dan penanganan spesimen penyakit tanaman adalah:

- Mengetahui identitas tanaman inang. Jika identitas tanaman inang tidak diketahui maka material tanaman, terutama bunga dan buah perlu diambil sebagai bahan identifikasi.
- Gunakan kantong kertas sebagai tempat spesimen. Menggunakan kantong plastik untuk menyimpan spesimen tanaman segar tidak dianjurkan karena akan menyebabkan sampel menjadi basah sehingga mendorong tumbuhnya organisme saprofit serta mempercepat pembusukan. Kantong plastik hanya digunakan untuk menyimpan spesimen jangka waktu pendek dan hanya digunakan untuk spesimen yang menghendaki kondisi lembab.
- Spesimen dikemas sedemikian rupa agar tidak rusak akibat benturan dan menghindari terjadinya kondensasi.
- Gunakan pensil untuk menulis label. Menulis dengan pulpen tinta tidak dianjurkan karena jika kondisinya lembab akan luntur.
- Pada situasi tertentu pengiriman spesimen/sampel adakalanya memerlukan ijin dari suatu institusi atau suatu lembaga. Dalam hal ini, ijin pengiriman sebaiknya sudah dimiliki terlebih dahulu sebelum dilakukan pengiriman, sehingga pengiriman akan berjalan lancar.

### 3.1. Penanganan Daun, Batang dan Buah

Pengambilan spesimen daun dianjurkan pada saat permukaan daun dalam keadaan kering. Bila hal tersebut tidak memungkinkan, maka dapat digunakan kertas koran atau bahan penyerap air lain untuk mengeringkan permukaan daun. Setelah dikeringkan, spesimen diletakkan atau dijepit diantara dua lembar kertas koran. Pengeringan permukaan daun dengan kertas tisu tidak dianjurkan karena serat-serat kertas tisu akan menempel pada spesimen dan sulit dibersihkan. Selanjutnya spesimen daun dijepit atau dipres dan dikeringkan. Di dalam proses pengeringan dipastikan bahwa spesimen daun tidak terlipat atau tumpang tindih. Pengeringan spesimen daun yang banyak mengandung air (misalnya daun-daun yang tebal), penggantian kertas koran dilakukan setiap hari sampai spesimen benar-benar kering.

Pengambilan spesimen batang dapat berupa potongan-potongan batang, namun perlu diperhatikan bahwa potongan yang diambil sebaiknya terdiri dari jaringan yang masih sehat dan jaringan yang sakit. Selanjutnya setiap potongan dibungkus dengan kertas koran satu persatu. Penggabungan potongan-potongan dalam satu bungkus tidak dianjurkan untuk menghindari kerusakan.

Pengambilan spesimen yang banyak mengandung air seperti buah, sebaiknya dipilih sampel yang menunjukkan gejala penyakit pada fase awal atau fase pertengahan. Pengambilan spesimen dengan gejala penyakit sudah pada fase lanjut akan menyulitkan diagnosis penentuan penyebab penyakitnya, dikarenakan adanya organisme saprofit. Selanjutnya spesimen buah dibungkus dengan kertas koran satu persatu. Penggunaan kantong plastik tidak dianjurkan.

### **Penyakit Karat dan Gosong (*Rust dan Smut*)**

Pada pengambilan spesimen penyakit karat, pengamatan kedua permukaan daun diperlukan untuk mengetahui adanya teliospora yang berwarna hitam kecoklatan dan urediospora berwarna oranye kekuningan. Penyakit gosong biasanya terjadi pada tanaman dari golongan rumput-rumputan, merusak organ pembungaan atau sebagian dari organ tersebut. Identitas tanaman inang harus diketahui dengan benar untuk membantu mengidentifikasi organisme penyebabnya. Dalam mengoleksi kedua jenis penyakit tersebut maka spesimen sebaiknya disimpan ke dalam lipatan kertas koran agar spora cendawan tidak lepas dan berhamburan.

### **Penyakit-Penyakit Disebabkan Oleh Bakteri**

Sampel tanaman yang diduga terserang oleh bakteri biasanya lebih sulit untuk diambil dan dikirim ke laboratorium, karena kerusakan jaringan tanaman biasanya berlangsung cepat. Oleh karena itu, spesimen dimasukkan ke dalam kantong kertas, kemudian dibungkus dengan kertas koran lembab untuk mencegah agar spesimen tidak kering. Spesimen sebaiknya disimpan dalam kondisi sejuk dan terhindar dari sinar matahari apabila memungkinkan. Spesimen daun dengan gejala bercak (*leaf spot*) atau hawar daun (*blight*) yang sudah dikeringkan atau dipres agar dipertahankan sebagai material herbarium, dan dapat digunakan sebagai sumber referensi. Sejumlah bakteri patogen tanaman dapat bertahan selama beberapa bulan bahkan hingga beberapa tahun jika disimpan dalam bentuk material kering pada suhu ruang.

### **Penyakit-Penyakit Disebabkan Oleh Virus**

Material tanaman yang diduga terinfeksi virus diambil dan diawetkan dengan cara dikeringkan di dalam *desicator* sementara. *Desicator* sementara dibuat dari kantong plastik berukuran kecil yang diisi dengan bahan penyerap air seperti kristal kalsium klorida ( $\text{CaCl}_2$ ) atau *silica gel* sebanyak satu per tiga bagian dari volume kantong plastik. Spesimen dipisahkan dari bahan penyerap dengan cara meletakkan kapas diantara kedua bahan. Teknik semacam ini sangat baik dilakukan pada suhu 0-4°C.

Pengambilan sampel dilakukan dengan memotong jaringan daun menggunakan gunting atau pisau potong. Jika permukaan daun kotor, atau tertutup embun jelaga, atau tertutup oleh kutu daun maka permukaan daun terlebih dahulu dibersihkan dengan mengelap permukaan daun menggunakan air atau alkohol. Potongan jaringan daun harus diambil dari bagian tengah helai daun dengan ukuran 3-5 mm<sup>2</sup> dan 5-10 potongan diletakan pada setiap *desicator*. Setiap selesai digunakan, gunting atau pisau potong disterilkan dengan alkohol atau larutan sodium hipoklorit 10% ( $\text{NaOCl}$ ) untuk menghindari kontaminasi silang antar sampel.

Alternatif lain yang bisa dilakukan adalah memasukan spesimen ke dalam kantong plastik yang sudah diisi kertas lembab kemudian dimasukan ke kotak es atau *ice box*, untuk selanjutnya dikirim ke laboratorium. Dengan cara tersebut, kesegaran spesimen dapat dipertahankan lebih lama.

## **3.2. Penanganan Akar dan Tanah**

Seringkali jaringan akar yang terserang penyakit atau struktur patogen yang berasosiasi pada akar berukuran sangat kecil. Oleh sebab itu pengambilan sampel akar tanaman dengan cara mencabut sangat tidak dianjurkan, karena jaringan akar atau organisme patogen yang berada di dalam akar akan tersapu, akibatnya diagnosis

akan sulit dilakukan. Alat penggali seperti skop dan sejenisnya dapat digunakan untuk mengambil spesimen akar sehingga kerusakan dapat dihindari.

Tanah yang melekat pada akar dapat dibersihkan dengan cara digoyang atau dicuci dengan air secara hati-hati. Jika akan dilakukan pengujian terhadap nematoda maka akar tidak perlu dibersihkan. Berbagai macam mikro-organisme saprofit biasanya terdapat di dalam tanah dan berasosiasi dengan jaringan akar yang sudah mati, sehingga sering mengaburkan penentuan organisme patogen penyebab penyakit. Apabila tanah harus dibersihkan dari akar, maka sebaiknya dilakukan dengan hati-hati agar jaringan akar yang sakit tidak rusak. Akar yang sudah bersih dibungkus dengan kertas koran lembab untuk dibawa ke laboratorium.

Dalam pengambilan sampel tanah, penentuan jumlah sampel yang dianggap mewakili atau memenuhi syarat harus menjadi pertimbangan dan disesuaikan dengan kondisi penyakit. Faktor pembatas dalam pengambilan sampel adalah berat dan volume sampel tanah. Ketersediaan waktu dan ruang untuk memproses hendaknya juga diperhitungkan.

Patogen-patogen tular tanah (*soil-borne pathogens*) tidak selalu tersebar merata di dalam tanah, namun cenderung berkelompok atau beragregasi di lingkungan yang sesuai atau di sekitar daerah infeksi. Oleh karena itu, strategi dan metode pengambilan sampel perlu diperhitungkan. Dengan demikian, semakin banyak sampel yang diambil maka penilaian terhadap suatu penyakit akan semakin akurat.

Jumlah sampel yang harus diambil bervariasi tergantung pada keadaan yang dihadapi. Walau demikian, sampel harus diambil satu persatu sehingga diperoleh jumlah sampel yang memadai. Sampel yang sudah digabungkan agar dicampur dan diaduk sedemikian rupa, kemudian diambil sebagian kecil sebagai sub sampel. Sampel tanah dalam rangka pengujian nematoda hendaknya ditangani secara hati-hati agar tidak menimbulkan kerusakan secara fisik bagi nematoda yang dikehendaki.

Pengambilan sampel tanah yang terlalu basah atau terlalu kering harus dihindari. Sampel tanah sebaiknya diambil sekurang-kurangnya pada kedalaman 5-10 cm dari permukaan tanah di sekitar daerah perakaran dimana populasi patogen cenderung lebih banyak. Pertanaman yang menunjukkan gejala botak-botak (*patch symptom*) berupa pertumbuhan tanaman yang kurang baik diantara tanaman yang sehat, maka sampel tanah harus diambil dari area tanaman sehat dan dari area tanaman sakit, dan kedua sampel agar dipisahkan sehingga bisa dilakukan perbandingan. Sampel tanah diambil satu persatu kurang-lebih 250-300g.

Jika memungkinkan, sampel akar sebaiknya diikutsertakan atau diambil secara terpisah. Untuk tanaman perdu (*herbaceous*), jumlah sampel akar kira-kira 25-100 g. Jumlah sampel yang lebih kecil berlaku untuk tanaman sayuran, sedangkan jumlah yang lebih banyak diperlukan untuk tanaman yang memiliki ukuran akar lebih besar, misalnya tanaman pisang. Pengambilan sampel akar tanaman berkayu dilakukan dengan menggali tanah hingga kedalaman 30 cm sampai ditemukan akar yang memperlihatkan gejala jaringan akar sehat dan sakit.

Sampel tanah harus disimpan ke dalam kantong plastik yang kokoh dan diberi label. Sampel hendaknya dijaga agar suhunya tetap sejuk, terhindar dari sinar matahari langsung atau tidak diletakkan di dalam mobil di bawah terik matahari. Sampel tanah agar ditangani dengan hati-hati dan sedapat mungkin diproses secepatnya. Jika proses tidak mungkin segera dapat dilakukan, maka sampel harus disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4-8°C untuk mencegah kerusakan selama beberapa hari.

### 3.3. Penanganan Cendawan Basidiomycetes

Cendawan dari klas Basidiomycetes (yang memiliki tubuh-buah besar) khususnya kelompok Agaricales biasanya lebih mudah ditemukan. Oleh karena strukturnya yang lunak, maka penanganannya menjadi lebih sulit. Untuk mengoleksi cendawan jenis ini, spesimen yang diambil harus dalam kondisi sehat dan segar, sedapat mungkin terdiri dari beberapa tingkatan dari fase perkembangannya. Pengambilan cendawan dilakukan dengan cara mencongkel dari medium tumbuh sehingga seluruh bagian tubuh buah dapat terangkat. Pengambilan dengan cara mencabut tidak dibenarkan, karena dapat merusak batang tubuh-buah, atau bagian lainnya. Cendawan yang sudah diambil selanjutnya dibungkus dengan kertas koran satu persatu dan diletakkan dengan hati-hati ke dalam tempat yang kokoh sehingga tidak akan merusak tubuh buahnya.

Perlu diketahui bahwa kelompok cendawan ini dapat dikeringkan dengan cepat, antara lain:

- Menggunakan oven yang dilengkapi kipas, pada suhu 45°C selama satu malam;
- Menggunakan pengering buah elektrik;
- Menggunakan sumber panas lain, seperti: api unggun, pemanas gas, lampu minyak atau dijemur.

Didalam identifikasi, karakter spora yang dikenal dengan istilah **spore prints** atau sidik spora, termasuk warna spora merupakan hal penting. *Spore prints* dibuat dengan cara memotong tudung cendawan (*cap*) kemudian diletakan di atas sepotong kertas berwarna putih selama 15 menit sampai beberapa jam dengan posisi lembaran-lembaran tudung (*gills*) menghadap ke bawah. Pembuatan *spore prints* bisa tidak berhasil jika terganggu oleh hembusan angin. Hal tersebut dapat dihindari dengan menutup spesimen selama proses berlangsung. Kelompok cendawan yang memiliki warna spora putih, potongan kertas yang digunakan hendaknya berwarna hitam, sehingga spora nampak lebih jelas. Pembuatan *spore prints* tidak saja memperjelas warna spora namun juga dapat menggambarkan karakteristik *gills*.

### 4. Pelabelan Spesimen

Pelabelan merupakan hal penting dalam pembuatan spesimen koleksi. Spesimen yang diberi label dengan tidak semestinya menjadikan spesimen tidak memiliki nilai. Hal-hal yang perlu dicantumkan pada label spesimen koleksi antara lain:

- Nama tanaman inang dan bagian tanaman yang terserang;
- Lokasi, desa, kecamatan, kabupaten, provinsi, negara (termasuk posisi garis lintang, garis bujur, ketinggian dari permukaan laut). Untuk memudahkan pencarian data koordinat dan informasi lain dapat digunakan GPS.
- Tanggal pengambilan spesimen;
- Nama orang yang melakukan pengambilan (kolektor);
- Gejala penyakit dan berat-ringannya penyakit (misalnya jumlah tanaman yang terserang dalam suatu populasi).

Setiap spesimen yang akan dikirim ke suatu herbarium harus diberi label dengan baik. Nama orang atau petugas yang menyerahkan spesimen termasuk data diri (misalnya nomor telepon, alamat kantor, alamat email dan lain sebagainya) juga merupakan hal penting supaya bisa dihubungi jika diperlukan. Alasan atau latar belakang pengiriman spesimen juga harus jelas, misalnya sebagai spesimen untuk diuji/diagnostik, sebagai contoh atau untuk disimpan sebagai koleksi.

Informasi yang sebaiknya dicantumkan dalam label, sebagai berikut:

Genus: .....  
Species: .....  
Genus tanaman inang: .....; species: .....  
Varietas/cultivar: .....  
Nama umum: .....  
Gejala: .....  
.....  
Kolektor: .....  
Tanggal diambil: .....  
Nama petani: .....  
Lokasi (Desa:....., Kec.: ..... Kab.: .....  
Provinsi: .....)  
Koordinat (Garis Lintang: ....., Garis Bujur: .....)  
Informasi tambahan: .....  
.....

## 5. Survei dan Pengambilan Sampel

Survei adalah kegiatan yang dilakukan dalam rangka mengetahui bagaimana tipe dan beratnya suatu penyakit dapat menimbulkan kerusakan pada tanaman inang.

Tujuan survei antara lain:

- Mengetahui distribusi/penyebaran organisme pengganggu tumbuhan (OPT) dan statusnya pada suatu area. Dengan kegiatan survei, maka keberadaan OPT tertentu dalam suatu area dapat diketahui, dan hal tersebut merupakan persyaratan dalam membangun *pest free area* (PFA);
- Menyusun skala prioritas terhadap penanganan penyakit dan pengelolaannya, sehingga akan memudahkan alokasi sumber daya perlindungan;
- Mendeteksi munculnya penyakit asing/*exotic pest*;
- Menilai besarnya kerugian yang ditimbulkan dan menentukan tingkat kesehatan tanaman;
- Memahami dinamika OPT;
- Mengetahui preferensi OPT terhadap tanaman inang;
- Mengevaluasi metode pengendalian yang telah dilakukan;
- Mengetahui prevalensi suatu OPT dikaitkan dengan kerusakan yang ditimbulkannya;
- Mengetahui musuh alami OPT bersangkutan.

Survei suatu OPT dapat bersifat kualitatif atau kuantitatif. Survei yang bersifat kualitatif dilakukan untuk mengetahui keberadaan OPT pada suatu area. Sedangkan survei yang bersifat kuantitatif bertujuan untuk mengetahui seberapa banyak kejadian penyakit dan besarnya kerusakan yang ditimbulkan.

Dalam melakukan survei, penentuan tempat (*sites*) yang dianggap mewakili suatu satuan wilayah (*region*) harus menjadi pertimbangan untuk memenuhi persyaratan tingkat akurasinya. Perlu diperhatikan bahwa, dengan memahami maksud atau tujuan dilakukan suatu survei maka harus diketahui pula peralatan, teknik dan keahlian yang dibutuhkan dalam kegiatan tersebut. Selanjutnya seberapa banyak informasi yang dikumpulkan dan seberapa besar derajat akurasi yang diinginkan, akan menentukan luasan wilayah yang disurvei.

Hal mendasar yang perlu diperhatikan dalam prosedur pengambilan sampel adalah sederhana namun sampel yang diambil harus mewakili dan dapat dipercaya. Perkiraan kasar jumlah sampel yang akan diambil dapat diperoleh melalui survei pendahuluan. Dengan survei pendahuluan intensitas suatu penyakit pada berbagai tingkat sampel dapat diketahui. Berpedoman pada hasil survei pendahuluan yang sudah ada, maka banyaknya sampel yang akan diambil pada kegiatan survei yang sesungguhnya dapat ditentukan.

Seperti diketahui bahwa suatu OPT memiliki beberapa macam pola penyebaran, yaitu : rambang/acak, reguler/merata, atau berkelompok/kluster. Dengan pola penyebaran yang demikian maka metode pengambilan sampel yang akan dilakukan perlu diperhitungkan. Dari sejumlah metode pengambilan sampel, maka pengambilan sampel secara rambang (*random sampling*) dianggap cara yang dapat memberikan hasil yang baik. Walaupun demikian, sewaktu-waktu pengambilan sampel dengan metode sistematis atau dengan cara kelompok juga diperlukan.

Informasi tambahan sangat diperlukan untuk survei yang dilakukan secara khusus, misalnya dikaitkan dengan ketepatan waktu, mempertimbangkan bagian tanaman sebagai indikator suatu penyakit dan sebagainya.

## IV. Pengujian Spesimen

Pengujian spesimen diawali dengan pengamatan gejala serangan OPT secara makroskopis, kemudian dilanjutkan dengan pengamatan di bawah mikroskop stereo. Tahap berikutnya adalah membuat *slide* (misalnya cendawan), kemudian diamati di bawah mikroskop kompon untuk melihat struktur cendawan. Jika nama cendawan yang diamati tidak atau belum diketahui dengan pasti, maka yang perlu dilakukan antara lain mengukur struktur yang diamati (misalnya spora), membuat gambar dan foto. Gambar dan foto sebaiknya disimpan bersama spesimen herbarium tanaman inangnya. Pengukuran, pembuatan gambar dan foto akan membantu dalam proses identifikasi selanjutnya.

### 1. Pewarnaan Cendawan dan Bakteri

Sebagian besar cendawan dan bakteri dapat diamati secara mikroskopis di medium air (dalam bentuk preparat), tetapi preparat yang dibuat dengan cara seperti ini hanya mampu bertahan sementara. Supaya struktur cendawan dapat bertahan lama dalam bentuk preparat, maka medium yang digunakan adalah larutan yang mengandung asam laktat, misalnya laktofenol. Cendawan-cendawan yang memiliki struktur bening atau tidak berwarna, dapat dilakukan pewarnaan dengan menambahkan bahan pewarna seperti *cotton blue* atau *lacto-fuchsin* sebagai campuran medium preparat. Dengan cara ini, struktur cendawan menjadi lebih mudah diamati.

#### ***Cotton blue (Trypan blue)***

<i>Cotton blue (Trypan blue)</i>	: 0,1 g
<i>Lactic acid</i> (asam laktat)	: 25,0 ml
Gliserol	: 50,0 ml
Air destilasi	: 25,0 ml

#### ***Lacto-fuchsin***

Acid-fuchsin	: 0,1 g
<i>Lactic acid</i> (asam laktat)	: 100,0 ml

Pengamatan bakteri di dalam jaringan tanaman dapat digunakan *Toluidine blue O* cair 0,1%, dengan meletakkan sepotong kecil jaringan tanaman di atas objek gelas steril selanjutnya ditambahkan satu tetes pewarna *Toluidine blue O*, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Pastikan bahwa potongan jaringan tanaman yang diamati terdiri dari setengah bagian jaringan yang masih sehat dan setengah bagian jaringan sakit. Selanjutnya pengamatan dilakukan di bawah mikroskop kompon pada pembesaran 400x. Jika jaringan tanaman mengandung bakteri, maka akan terlihat pergerakan sel-sel bakteri berwarna biru di pinggiran potongan jaringan.

#### ***Toluidine blue O***

<i>Toluidine blue O</i>	: 0,05 g
Air destilasi	: 50,0 ml

Bakteri patogen tanaman dapat dibagi ke dalam dua kelompok. Kelompok pertama adalah bakteri gram-positif, yaitu kelompok bakteri yang mampu menyerap dan mengikat kristal violet dan *iodine* walaupun dibilas dengan etanol/alkohol 95%. Kelompok kedua adalah bakteri gram-negatif, yaitu kelompok bakteri yang tidak dapat menahan kristal violet dan *iodine* dari bilasan etanol/alkohol 95%. Oleh sebab itu, untuk memperjelas pengamatan sel-sel bakteri gram-negatif digunakan larutan safranin counterstain.

#### **Larutan kristal violet**

Kristal violet	: 2,0 g
Etanol/alkohol 95%	: 20,0 ml
Ammonium oksalat	: 0,8 g
Air destilasi	: 80,0 ml

Cara pembuatan:

- Larutkan 2 g kristal violet ke dalam 20 ml etanol 95%;
- Larutkan 0,8 g ammonium oksalat ke dalam 80 ml air destilasi;
- Campurkan kedua larutan.

**Larutan *Lugol's iodine***

<i>Iodine</i>	: 1,0 g
<i>Potassium iodine</i> (KI)	: 2,0 g
Air destilasi	: 300,0 ml

Cara pembuatan:

- Gerus *iodine* dan *potassium iodine* secara bersama-sama;
- Larutkan gerusan ke dalam air (dalam wadah tertutup) dan diaduk selama beberapa jam, agar keduanya larut dengan sempurna.

***Safranin counterstain***

Safranin O	: 2,5 g
Etanol/alkohol 95%	: 20,0 g

Cara pembuatan:

- Larutkan 2,5 g safranin O ke dalam 100 ml etanol 95%;
- Jika akan digunakan, encerkan larutan ke dalam air dengan perbandingan 1 : 10;
- Larutan siap digunakan.

Prosedur Pewarnaan Gram:

- Buat suspensi bakteri dengan memasukan koloni bakteri (biasanya berumur 24-48 jam) ke dalam air steril;
- Oleskan suspensi pada permukaan objek gelas steril seluas kira-kira 2 cm<sup>2</sup> kemudian dikering-anginkan;
- Agar sel-sel bakteri benar-benar melekat pada objek gelas, maka lakukan fiksasi dengan melewati objek gelas di atas pembakar bunsen beberapa kali; olesan/smear bakteri usahakan agar posisinya di atas;
- Genangi olesan bakteri dengan kristal violet selama 1 menit;
- Tuang genangan kristal violet dan bilas olesan dengan air mengalir secara hati-hati sehingga sebagian besar pewarna terbuang;
- Genangi kembali olesan bakteri dengan larutan *Lugol's iodine* selama 1 menit;
- Bilas olesan bakteri dengan air mengalir secara hati-hati, kemudian dikeringkan dengan menempelkan bahan penyerap (misalnya kertas tisu);
- Bilas olesan bakteri dengan menyemprotkan etanol selama beberapa detik, kemudian dikeringkan dengan menempelkan bahan penyerap. Pembilasan tidak boleh lebih dari 30 detik;
- Genangi kembali olesan bakteri dengan *safranin counterstain* selama 20 detik;
- Bilas olesan dengan air mengalir, kemudian keringkan dengan menempelkan bahan penyerap.
- Lakukan pengamatan hasil pewarnaan di bawah mikroskop kompon pada pembesaran 1000x menggunakan minyak immersi. Sel-sel bakteri gram-positif akan tampak

berwarna violet kebiru-biruan, sedangkan sel-sel bakteri gram-negatif akan tampak berwarna pink kemerah-merahan.

Reaksi gram dapat dikonfirmasi dengan uji kelarutan pada potassium hidroksida (KOH).

#### Prosedur pengujian:

- Ambil koloni bakteri yang berumur muda sebanyak satu loop dan campurkan ke dalam 1 tetes larutan (KOH) 3% di atas objek gelas steril;
- Aduk larutan hingga homogen;
- Angkat loop beberapa sentimeter dari objek gelas. Apabila terbentuk benang-benang lendir, maka bakteri yang diuji tergolong bakteri gram-negatif, dan apabila larutan tidak berubah atau tetap encer, maka bakteri yang diuji tergolong bakteri gram-positif. Terbentuknya lendir menunjukkan luruhnya dinding sel bakteri disebabkan oleh larutan KOH, diikuti oleh larutnya DNA ke dalam larutan. DNA inilah yang menyebabkan terbentuknya benang-benang berlendir. Sedangkan dinding sel bakteri gram-positif tahan terhadap larutan KOH.

## **2. Mikroskop Cahaya**

Mikroskop stereo digunakan untuk pemeriksaan spesimen tahap awal, sedangkan mikroskop kompon dengan kemampuan pembesaran hingga 1000X digunakan untuk mengamati morfologi bakteri dan cendawan yang berukuran kecil.

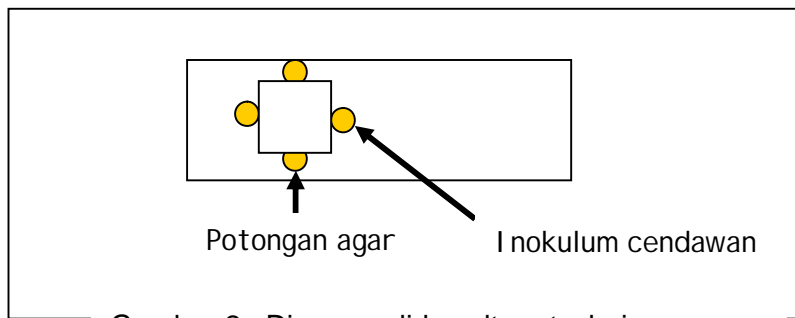
Untuk mengamati cendawan dan bagian kecil dari jaringan tanaman yang ditumbuhi cendawan, diambil dengan menggunakan jarum atau ujung scalpel yang runcing. Pengambilan jaringan tanaman dilakukan dengan bantuan mikroskop stereo. Potongan jaringan tanaman diletakkan pada objek gelas yang sudah diisi satu tetes *lacto-fuchsin* atau larutan pengawet seperti asam laktat, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Jika jaringan yang diamati menggumpal, maka lakukan sedikit tekanan pada kaca penutup sehingga objek pandang menjadi lebih jelas. Gelembung-gelembung udara seringkali terjadi dalam pembuatan preparat. Gelembung udara dapat dibuang dengan memanaskan objek gelas, dengan melewatkannya di atas pembakar bunsen.

Teknik pita rekat bening (*adhesive tape technique*) digunakan untuk mengamati susunan spora suatu cendawan, misalnya rantai spora dan bentuk konidiofora. Teknik ini dapat dilakukan dengan baik jika cendawan yang akan diamati dalam kondisi kering. Dengan menggunakan *forceps* potongan kecil pita rekat ditempelkan di atas koloni cendawan, selanjutnya potongan pita diletakkan pada objek gelas yang sudah diisi larutan pengawet, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan akan lebih baik apabila posisi bagian pita yang berpelekat menghadap ke atas. Pengamatan susunan spora dan bentuk konidiofora dilakukan di bawah mikroskop kompon.

Beberapa jenis cendawan memiliki untaian spora yang mudah lepas. Untuk mengamati untaian spora jenis cendawan yang seperti ini, dilakukan dengan menggunakan teknik pertumbuhan di atas objek gelas (*slide culture technique*). Cara yang dilakukan adalah dengan menginokulasikan cendawan pada potongan medium agar tipis dengan luas  $\pm 1 \text{ cm}^2$  yang diletakkan di atas objek gelas steril (Gambar 2). Inokulasi dilakukan pada keempat sisi potongan agar, kemudian ditutup dengan kaca penutup steril. Selanjutnya objek gelas diletakkan di dalam cawan petri yang sudah diisi kertas lembab. Untuk menghindari kontak langsung antara objek gelas dengan kertas lembab, digunakan potongan batang kaca sebagai penyangga objek gelas. Setelah beberapa hari, pertumbuhan cendawan dapat diamati di bawah mikroskop kompon.

Sifat spesifik akibat hubungan yang terbentuk antara patogen dengan jaringan tanaman inangnya atau posisi konidiofora di dalam tubuh buah, menjadi karakter taksonomi penting bagi beberapa jenis cendawan patogen. Karakter tersebut dapat dilihat dengan mengamati

potongan kecil jaringan tanaman yang terinfeksi di bawah mikroskop kompon. Pematangan dapat dilakukan secara manual atau menggunakan mikrotom.



Gambar 2. Diagram slide culture technique

Bakteri patogen tanaman yang berukuran sangat kecil, agar pengamatan di bawah mikroskop menjadi lebih jelas diperlukan metode tertentu, misalnya mewarnai dengan menggunakan *Toluidine blue O* atau melalui pewarnaan gram.

### 3. Fotografi

Gambar-gambar tentang penyakit merupakan bagian penting dalam memperkaya informasi suatu koleksi penyakit tanaman. Oleh sebab itu perlu pengambilan foto dengan film slide berwarna atau dengan menggunakan kamera digital. Pengambilan foto sebaiknya dilakukan sejak pengambilan spesimen di lapangan, sehingga karakter gejala penyakit yang sebenarnya (sebagaimana terjadi di alam) dapat didokumentasikan. Pengambilan foto dilakukan beberapa kali, sehingga diperoleh gambar atau foto yang bagus. Disamping itu, setiap pengambilan gambar agar dicatat untuk menghindari kekeliruan dalam penanganan selanjutnya.

#### 3.1. Pemberian Nama File dan Pengelolaannya

Pengambilan foto dengan menggunakan kamera digital dapat secara otomatis merekam nama file foto bersangkutan, misalnya IMG-001.jpg dan lain sebagainya. Pemberian nama secara otomatis tersebut masih kurang membantu dalam menemukan kembali foto yang ada, jika sewaktu-waktu diperlukan. Oleh sebab itu, setiap foto sebaiknya diberi nama baru sesuai dengan spesifikasi gambar/foto tersebut, misalnya "**antraknosa pada mangga**" dan lain sebagainya. Jika file gambar/foto memiliki jenis dan jumlah yang banyak, sebaiknya disimpan ke dalam folder terpisah dengan memberikan nama yang sesuai, misalnya menurut nama tanaman inang, jenis patogen atau penyakitnya.

Dewasa ini sudah banyak program/software yang bisa digunakan untuk menangani atau mengelola foto-foto dengan berbagai fasilitas untuk berbagai kebutuhan, seperti mengedit, mencetak dan sebagainya.

## V. Isolasi Cendawan, Bakteri dan Nematoda

Spesimen-spesimen yang baru tiba dari lapangan harus segera ditangani atau disiapkan untuk pengujian laboratorium. Dengan memperhatikan perbedaan sifat dari masing-masing patogen maka perlu dibuat daftar prioritas dalam menangani setiap jenis patogen. Spesimen yang mudah rusak atau cepat busuk, seperti cendawan-cendawan dengan tubuh-buah besar dan lunak serta patogen-patogen yang harus segera diisolasi agar ditangani terlebih dahulu. Patogen lain yang tidak cepat mengalami perubahan selama waktu tertentu, seperti cendawan karat (*rust*) dan cendawan gosong (*smut*) dapat dilakukan pengeringan dengan alat penjepit (*pres*) kemudian disimpan pada suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 7 hari dan pengujian dapat dilakukan kemudian.

Bakteri dan cendawan patogen seringkali harus diisolasi dan ditumbuhkan terlebih dahulu sebelum diidentifikasi. Beberapa diantaranya dapat tumbuh layaknya organisme saprofitik (parasit fakultatif atau nekrotrop) sehingga dapat langsung ditumbuhkan pada suatu medium, namun beberapa diantaranya memerlukan syarat tertentu untuk menumbuhkannya (*fastidious*).

Isolasi cendawan dilakukan dengan meletakkan sepotong kecil jaringan tanaman sakit di atas medium tumbuh, umumnya berupa medium agar yang sesuai. Isolasi juga dapat dilakukan dengan mengambil spora cendawan kemudian diletakan di atas medium agar.

Sejumlah cendawan dan bakteri saprofitik seringkali tumbuh sebagai kontaminan atau *secondary invader* pada permukaan jaringan tanaman yang sakit. Oleh sebab itu, untuk menghindari tumbuhnya organisme kontaminan maka sterilisasi permukaan mutlak diperlukan.

Sterilisasi juga perlu dilakukan terhadap meja dan peralatan yang akan digunakan. Permukaan meja dapat disterilisasi dengan alkohol 70% menggunakan kapas atau kertas tisu. Sementara peralatan seperti forcep, scalpel, jarum isolasi dan sejenisnya disterilkan dengan cara mencelupkan ke dalam cairan alkohol 95% kemudian dibakar di atas pembakar bunsen hingga merah untuk kemudian dapat digunakan.

Sterilisasi permukaan jaringan tanaman sakit dilakukan dengan cara mengelap permukaan jaringan menggunakan kapas atau tisu yang mengandung alkohol 70%, atau mencelupkan ke dalam cairan alkohol 70%. Larutan sodium hipoklorit juga banyak digunakan untuk sterilisasi permukaan jaringan tanaman. Cairan pemutih yang mengandung 10-14% klorin juga dapat digunakan dengan merendam jaringan tanaman selama 1-5 menit. Larutan klorin sebaiknya disimpan di dalam refrigerator untuk menjaga daya sterilisasinya, atau membuat larutan yang baru setiap 2-3 minggu.

## 1. Isolasi Cendawan

Prosedur umum untuk mengisolasi cendawan patogen dari jaringan tanaman adalah sebagai berikut:

- a. Cuci jaringan tanaman dengan air mengalir untuk membuang tanah, debu dan kotoran lainnya;
- b. Jika jaringan tanaman ditumbuhi oleh organisme saprofit, maka lakukan sterilisasi permukaan dengan alkohol 70%;
- c. Potong jaringan tanaman pada pinggiran bagian yang sakit;
- d. Letakkan/rendam potongan jaringan tanaman ke dalam cairan alkohol 10% yang mengandung 1% sodium hipoklorit selama 1-5 menit;
- e. Angkat jaringan tanaman dari cairan sterilisasi, dibilas dengan air destilasi steril dan dikeringkan dengan kertas tisu steril. Selanjutnya jaringan tanaman dipotong-potong ( $\pm$  2x2 mm) dan ditanam di atas medium water agar (WA) atau potato dextrose agar (PDA) di dalam cawan Petri, kemudian diinkubasikan;
- f. Selama masa inkubasi, cawan Petri sebaiknya diletakkan dalam posisi terbalik (tutupnya di bawah) untuk menghindari kondensasi air di permukaan agar; Kebanyakan cendawan patogen dapat tumbuh dengan baik pada suhu 25 °C;
- g. Biakan murni biasanya segera diperoleh pada isolasi pertama jika inokulum berasal dari spora tunggal atau dari ujung hifa cendawan. Inokulum spora tunggal didapat dengan cara menyebarkan suspensi spora di atas permukaan medium water agar atau medium lain yang sesuai, kemudian diinkubasikan pada ruang gelap selama 24 jam. Setelah 24 jam spora cendawan yang disebarkan di atas medium diamati di bawah mikroskop stereo. Dengan menggunakan jarum isolasi steril, spora tunggal yang sudah berkecambah dipindahkan pada medium agar yang sesuai.

### ***Isolasi cendawan dari jaringan daun***

#### Cara kerja:

- a. Pilihlah daun dengan gejala lesion yang masih muda, karena pada fase ini cendawan lebih aktif;
- b. Dengan menggunakan gunting steril, potong sebagian kecil jaringan daun (di bagian pinggir lesion);
- c. Lakukan sterilisasi permukaan dengan merendam potongan jaringan daun ke dalam cairan sodium hipoklorit 10%, kemudian dibilas dengan air steril dan dikeringkan dengan kertas hisap steril;
- d. Letakkan potongan jaringan daun di atas medium agar.

### ***Isolasi cendawan dari jaringan batang***

#### Cara kerja:

- a. Jika lesion terjadi di bagian dalam organ (misalnya pada jaringan pembuluh), sebaiknya inokulum diambil dari bagian dalam, dengan demikian sterilisasi permukaan tidak lagi diperlukan. Spesimen dibelah memanjang (*longitudinal*) dimulai dari bagian yang masih sehat;
- b. Dengan menggunakan forcep steril, ambil sepotong kecil jaringan sakit (panjang  $\pm$  3-5 mm) untuk selanjutnya diletakkan di atas medium agar;
- c. Jika lesion terdapat di permukaan atau pada batang yang sangat kecil sehingga tidak mungkin mengambil jaringan batang bagian dalam, maka proses isolasi dapat dilakukan sebagaimana isolasi cendawan dari jaringan daun.

### ***Isolasi cendawan dari jaringan akar***

#### Cara kerja:

- a. Cuci potongan kecil akar untuk menghilangkan tanah, selanjutnya letakkan potongan akar ke dalam cawan petri yang berisi air sehingga bagian yang sakit menjadi lebih mudah dilihat;
- b. Dengan menggunakan scalpel atau gunting steril, potong jaringan akar pada pinggir bagian yang sakit  $\pm$  5 mm;
- c. Untuk jaringan akar yang teksturnya keras, sterilisasi permukaan dilakukan dengan cara direndam ke dalam larutan sodium hipoklorit 10% selama  $\pm$ 1 menit; sedangkan untuk jaringan akar yang lunak cukup dilakukan pencucian dengan air mengalir yang bersih. Pencucian dilakukan dengan meletakkan potongan akar di atas saringan, kemudian dicuci dengan mengalirkan air bersih selama 30-90 detik;
- d. Potongan akar selanjutnya diletakkan di atas medium water agar atau medium agar lain yang sesuai.

### **1.1. Menumbuhkan Cendawan Dalam Sungkup Lembab (*Moisted Chamber*)**

Kadang kala gejala suatu penyakit bisa dilihat dengan jelas namun patogen penyebabnya tidak nampak atau sulit ditemukan. Keadaan tersebut menyebabkan isolasi patogen menjadi sulit dilakukan. Untuk mengatasi hal yang demikian, maka jaringan tanaman harus diinkubasi terlebih dahulu di dalam sungkup lembab, dengan tujuan memacu pertumbuhan cendawan patogen penyebab penyakit. Permasalahan yang sering muncul adalah beberapa jenis cendawan saprofit biasanya ikut terpacu untuk tumbuh di permukaan jaringan yang sama. Oleh sebab itu, sterilisasi permukaan sebagaimana telah diuraikan sebelumnya perlu dilakukan.

Sungkup lembab sebaiknya diinkubasikan pada suhu di bawah 25 °C dengan penerangan cahaya matahari alami namun tidak terpapar sinar matahari langsung.

Pengamatan dilakukan setiap hari, dan apabila cendawan patogen sudah tumbuh, maka isolasi dapat dilakukan dengan menumbuhkan spora pada medium agar.

Sungkup yang dimaksud dalam tulisan ini dapat berupa cawan petri atau kantong plastik bening dimana kelembaban udara di dalamnya bisa dipertahankan. Cawan petri biasanya digunakan untuk menginkubasikan spesimen-spesimen berukuran kecil dan pipih. Sedangkan untuk spesimen yang berukuran besar dapat digunakan kantong plastik steril dengan berbagai ukuran (d disesuaikan dengan kebutuhan) yang di dalamnya sudah diletakkan kertas saring lembab steril.

## **1.2. Menumbuhkan Cendawan Dengan Teknik Pengenceran**

Selain dari permukaan jaringan tanaman (seperti daun, bunga dan buah), cendawan juga dapat diisolasi dari tanah. Proses isolasi diawali dengan pencucian (*washing*) dilanjutkan dengan pengenceran suspensi (hasil pencucian) sehingga memungkinkan untuk memperoleh koloni tunggal setelah ditumbuhkan pada medium agar, misalnya water agar. Penggunaan medium yang kaya nutrisi tidak dianjurkan, karena cenderung mendorong pertumbuhan vegetatif dari pada pembentukan spora. Untuk mencegah tumbuhnya bakteri, dianjurkan menambahkan antibiotik (misalnya streptomycin sulphate) ke dalam medium.

Pengenceran berseri dilakukan dengan merendam sejumlah tanah yang sudah disaring/diayak atau jaringan tanaman ke dalam 10 ml air steril di dalam botol McCartney kapasitas 20 ml. Suspensi tanah diaduk secara perlahan sehingga spora maupun tubuh buah cendawan yang terikat partikel tanah terlepas ke dalam air.

Pengenceran suspensi dilakukan dengan mencampurkan 1 ml suspensi dari botol pertama ke dalam 9 ml air steril pada botol kedua. Demikian seterusnya hingga diperoleh tingkat pengenceran yang dikehendaki.

Koloni tunggal dapat diperoleh dengan menyebarkan suspensi (hasil pengenceran terakhir) di atas permukaan medium water agar. Penyebaran suspensi bisa menggunakan batang kaca steril, selanjutnya cawan petri diinkubasikan hingga cendawan membentuk koloni. Apabila spora cendawan tumbuh membentuk koloni tunggal, maka koloni tunggal cendawan tersebut segera dipindahkan/ditumbuhkan pada medium agar yang sesuai.

Didalam prakteknya, kadang-kadang spora cendawan sangat sulit ditemukan. Tubuh-buah cendawan yang sering ditemukan antara lain askokarp (*Ascomycetes*) atau piknidium (*Deuteromycetes*). Untuk memperoleh spora dari kedua jenis tubuh buah cendawan tersebut, tubuh buah cendawan direndam kedalam 1 tetes air steril sampai spora keluar. Suspensi spora tersebut selanjutnya digoreskan di atas medium water agar, dan koloni yang tumbuh dipindahkan/ditumbuhkan kembali pada medium agar yang sesuai.

## **1.3. Pertumbuhan Cendawan dan Sporulasi**

Sebagian besar cendawan patogen menggunakan spora sebagai alat reproduksi dan penyebaran secara alamiah. Dengan metode inkubasi akan diketahui kondisi yang dibutuhkan oleh cendawan patogen untuk bersporulasi dengan baik. Sporulasi suatu cendawan sangat diperlukan dalam proses identifikasi, serta sebagai sumber inokulum dalam uji patogenisitas. Sebagian besar cendawan tumbuh dengan baik pada suhu ruang di laboratorium.

Kondisi lingkungan yang tidak alamiah, misalnya di dalam inkubator dengan suhu yang hangat dan gelap serta medium yang kaya nutrisi merupakan kondisi yang tidak ideal bagi kebanyakan cendawan patogen untuk menghasilkan spora. Oleh sebab itu, sporulasi dapat dirangsang dengan menambahkan material yang berasal dari

tanaman inangnya seperti jerami, daun dan sebagainya, atau menggunakan medium yang miskin nutrisi, seperti water agar.

Sporulasi dari banyak jenis cendawan juga dapat dirangsang dengan penyinaran *near ultraviolet (black light)*. Walaupun *black light* dapat mempengaruhi pigmentasi cendawan (morfologi dan spora) namun hal tersebut tidak sampai mengganggu proses identifikasi.

Berikut adalah beberapa petunjuk penggunaan NUV (*black light*) untuk memacu sporulasi:

- Lampu tabung fluorescent NUV (*black light*) telah dijual secara komersial, antara lain: 20 W, 40 W, 80 W dengan berbagai ukuran panjang. Lampu tabung fluorescent putih (*cool white daylight fluorescent*) dapat digunakan jika lampu tabung black light tidak ada, namun pancaran radiasi NUV yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan black light. Kadang-kadang kombinasi antara kedua lampu dapat digunakan, misalnya satu lampu NUV diantara 2 lampu tabung fluorescent putih.
- Sporulasi juga dapat dirangsang dengan mengatur penyinaran dalam satu hari, misalnya 12 jam diterangi lampu NUV dan 12 jam dalam keadaan gelap. Pengaturan penyinaran dapat dilakukan secara otomatis dengan memasang alat pengatur (*switch*).
- Agar dapat menghasilkan spora, beberapa jenis cendawan membutuhkan kondisi gelap selama periode tertentu. Untuk memenuhi hal tersebut, ruang inkubasi harus dibuat tidak tembus cahaya.
- Penyinaran lampu *black light* sebaiknya dimulai dari hari 1-4 setelah inokulasi cendawan ke atas medium, diteruskan sampai akhir masa pertumbuhan.
- NUV tidak akan memberikan pengaruh terhadap beberapa jenis cendawan apabila suhu di dalam ruang inkubasi cukup tinggi.
- Radiasi NUV merambat dengan baik jika digunakan cawan petri plastik, atau bahan lain yang terbuat dari plastik.

## 2. Isolasi Bakteri

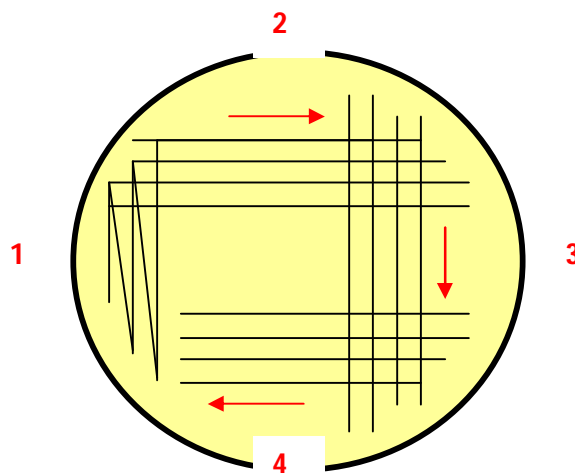
Individu bakteri patogen dalam jumlah besar dapat ditemukan di dalam jaringan tanaman sakit, khususnya pada bagian yang menunjukkan gejala lanjut.

Prosedur dasar untuk mendeteksi dan mengisolasi bakteri patogen dari jaringan tanaman adalah sebagai berikut:

- a. Sampel jaringan tanaman dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan permukaan jaringan dari tanah, debu dan kotoran lainnya. Sterilisasi permukaan tidak diperlukan kecuali sampel jaringan tanaman sebelumnya tidak ditangani dengan benar. Sterilisasi permukaan tidak dianjurkan untuk sampel jaringan tanaman yang kondisinya kering atau mendekati kering. Hal tersebut dikarenakan akan mempercepat penetrasi bahan sterilisasi ke dalam jaringan dan dikhawatirkan akan membunuh bakteri yang dikehendaki. Apabila sterilisasi ternyata diperlukan, maka cukup dicelupkan ke dalam larutan sodium hipoklorit 10% dan segera dibilas dengan air steril. Sterilisasi sampel tanaman yang berdaging tebal dapat dilakukan dengan mencelupkan ke dalam larutan alkohol 70% dan memanaskannya di atas Pembakar bunsen sebelum dilakukan isolasi.
- b. Buat potongan kecil jaringan tanaman dengan mengambil setengah bagian jaringan yang sehat dan setengah bagian jaringan yang sakit. Potongan jaringan tanaman diletakkan di atas *glass slide* steril yang sudah diisi 1 tetes air steril lalu diamati dengan mikroskop fase kontras pada pembesaran 400x. Pencahayaan mikroskop diatur sedemikian rupa sehingga aliran masa bakteri dari dalam jaringan tanaman dapat diamati. Isolasi bakteri dilakukan dengan menggoreskan suspensi bakteri (pada *glass*

slide yang diamati) ke atas medium agar yang sesuai. Untuk mendapatkan suspensi dengan jumlah sel bakteri yang memadai terkadang dibutuhkan waktu yang lebih lama, dengan membiarkan jaringan tanaman terendam hingga beberapa jam baru kemudian dilakukan penggoresan suspensi ke atas medium agar.

- c. Penggoresan suspensi harus menggunakan loop platinum standar, yaitu dengan menggoreskan 1 loop penuh suspensi di atas permukaan medium agar. Terdapat beberapa cara menggoreskan bakteri di atas medium agar untuk mendapatkan koloni tunggal. Cara pertama adalah dengan goresan zigzag pada pinggiran lingkaran medium. Goresan berikutnya adalah goresan searah ( $\pm 90^\circ$  tegak lurus dari goresan pertama), tiap-tiap goresan harus menyentuh atau berawal dari goresan pertama. Demikian seterusnya sampai pada kelompok goresan keempat (gambar 2). Cara kedua adalah dengan menggoreskan suspensi di seluruh permukaan medium agar dari atas ke bawah secara perlahan-lahan, selanjutnya buat goresan kesamping dengan gerakan goresan yang cepat.
- d. Medium yang digunakan harus sesuai dengan bakteri patogen yang diduga. Setelah isolasi, permukaan medium dijaga agar tetap kering dengan membalik posisi cawan Petri atau membuka cawan petri di dalam laminar air flow selama 30 menit.



Gambar 3. Diagram penggoresan suspensi bakteri di atas medium agar

Setelah proses penggoresan selesai, cawan petri diinkubasikan pada suhu ruangan dan diamati setiap hari selama periode 4-5 hari. Pengamatan bakteri patogen yang tergolong tumbuh lambat bisa memakan waktu 10-14 hari. Bagi yang berpengalaman, identifikasi bakteri patogen dapat segera diketahui dengan menghubungkan karakter koloni bakteri pada medium agar dengan karakter gejala yang ditemukan di lapangan. Apabila ternyata terdapat berbagai macam koloni tumbuh di atas medium, maka diperlukan pengujian lebih lanjut, kecuali jenis-jenis yang sudah diketahui, misalnya bakteri saprofit.

### 3. Isolasi Nematoda

Nematoda adalah salah satu kelompok dari sekian banyak hewan mikroskopis. Nematoda bisa ditemukan pada berbagai keadaan dimana terdapat air, walaupun air tersebut hanya ada sewaktu-waktu saja. Nematoda mendapatkan makanannya dari berbagai sumber dan banyak diantaranya berlaku sebagai spesialis parasit. Banyak sekali jenis tanaman dan hewan menjadi inang satu atau lebih species nematoda parasit, dan memberi dampak kerugian secara ekonomi. Namun demikian, banyak species nematoda diketahui sebagai pemakan cendawan dan bakteri. Nematoda jenis ini dikenal sebagai *free-living* dimana

secara ekologis memiliki peranan yang sangat penting. Sebagai contoh, *free-living nematode* berperanan di dalam siklus nutrisi pada ekosistem di dalam tanah.

Nematoda parasit tumbuhan dibagi ke dalam dua kelompok penting; kelompok pertama adalah jenis nematoda yang hidupnya senantiasa berpindah-pindah baik di luar maupun di dalam jaringan akar inangnya (*migratory nematode*); kelompok kedua adalah jenis-jenis nematoda yang hidupnya tidak berpindah-pindah (*sedentary*). Nematoda *sedentary* berperilaku memacu tanaman inangnya untuk membentuk struktur sehingga memudahkan dalam mendapatkan sumber makanan sekaligus sebagai tempat berlindung.

Untuk keperluan identifikasi, dibutuhkan pengetahuan tentang ekstraksi dan pengawetan spesimen baik dari tanah maupun dari tanaman.

### 3.1. Ekstraksi Nematoda Dari Sampel Tanah

Sampel tanah dari sistem perakaran tanaman yang diduga terserang nematoda sangat diperlukan untuk keperluan diagnostik maupun koleksi nematoda. Apabila di dalam suatu kelompok pertanaman dijumpai adanya gejala botak-botak (*patchy symptom*), dianjurkan agar tanah diambil dari area yang terserang dan juga dari area yang diduga tidak terserang sebagai pembandingan.

Dianjurkan untuk mengambil sampel tanah yang kondisinya lembab. Hal tersebut dikarenakan tanah kering dimana nematoda-nematoda dorman yang biasanya terdapat di dalamnya akan rusak pada saat pengambilan sampel atau pada penanganan selanjutnya. Sampel tanah disimpan di dalam kantong plastik dan dipertahankan agar suhunya tetap sejuk selama dalam perjalanan. Sampel tanah sedapat mungkin segera diproses. Sampel tanah yang tidak dapat segera diproses dapat disimpan di dalam lemari pendingin. Walaupun demikian, agar diperhatikan bahwa tidak semua jenis nematoda dapat disimpan ditempat yang dingin.

Terdapat beberapa macam cara untuk mendapatkan nematoda dari dalam sampel tanah maupun dari jaringan tanaman. Metode ekstraksi nematoda yang akan digunakan sebaiknya mempertimbangkan jenis nematoda yang dikehendaki. Beberapa jenis nematoda tergolong aktif bergerak sedangkan lainnya sangat lamban. Nematoda-nematoda yang bergerak aktif dapat diekstraksi dengan menggunakan metode *Whitehead tray* atau *Baermann funnel*. Kedua metode ini sudah barang tentu memberikan hasil yang kurang memuaskan jika digunakan untuk mengekstraksi nematoda yang bergerak lamban atau nematoda yang ukuran tubuhnya besar.

Metode lain yang digolongkan sebagai metode pasif antara lain, penyaringan (*sieving*), dekantasi (*decanting*) dan pengapungan (*flotation*). Terlepas dari kekurangan dan kelebihanannya, maka dalam aplikasinya metode-metode tersebut bisa dikombinasikan. Oleh sebab itu, pengalaman ekstraksi adalah hal yang juga sangat berperan penting dalam mengaplikasikan berbagai metode ekstraksi.

#### ***Ekstraksi Dengan Metode Whitehead Tray***

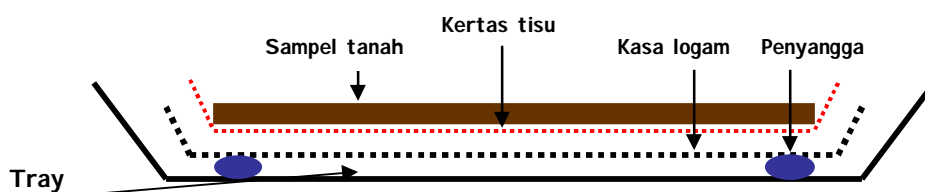
Cara kerja:

- a. Sejumlah sampel tanah disebar-ratakan di atas kertas tisu atau kain halus yang di bawahnya sudah dipasang alas kasa logam tahan karat (*mesh*);
- b. Kasa berikut material di atasnya diletakkan di dalam bak plastik (*tray*) dan dibawahnya disangga dengan batang kaca atau batang plastik;
- c. Secara perlahan-lahan tuangkan air bersih melalui pinggiran tray hingga seluruh permukaan sampel tanah terendam (gambar 4); biarkan sampel terendam 1-4

- hari. Dengan cara ini nematoda akan bergerak ke bawah menembus kertas tisu atau kain dan tertampung di dasar tray.
- Untuk mengumpulkan nematoda, secara perlahan-lahan angkat kasa logam berikut sampel tanah di atasnya, kemudian air yang tertinggal dipindahkan ke dalam tabung gelas atau gelas ukur. Biarkan suspensi beberapa jam agar nematoda berkumpul di bagian dasar tabung. Gunakan aspirator untuk mengurangi jumlah air di dalam tabung. Pengambilan air agar dilakukan dengan hati-hati supaya nematoda tidak ikut terbawa.
  - Identifikasi nematoda dilakukan dengan mengamati ciri morfologinya dibawah mikroskop.

Catatan:

Banyak atau sedikitnya jumlah sampel tanah yang diuji tergantung kepada ukuran tray yang digunakan. Tray dengan ukuran 450x300 mm dapat menampung sebanyak 200g tanah.

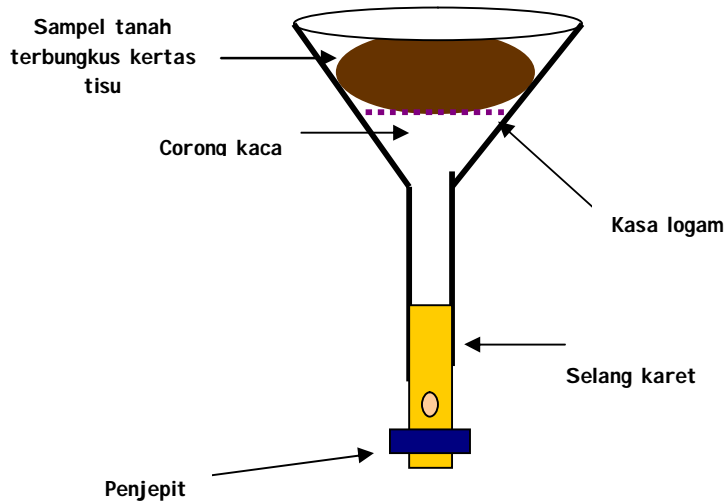


Gambar 4. Diagram metode Whitehead

### ***Ekstraksi Dengan Metode Baermann Funnel***

Cara kerja:

- Sejumlah sampel tanah diletakkan pada kertas tisu atau kain halus dan dialas dengan kasa logam tahan karat;
- Kasa beserta material di atasnya diletakkan di mulut corong gelas, sedangkan ujung leher corong disambung selang karet. Agar air tidak keluar maka pada ujung selang karet dipasang penjepit (gambar 5);
- Tuangkan air bersih ke dalam corong secara perlahan-lahan hingga seluruh material terendam, kemudian biarkan 1-2 hari;
- Untuk mengumpulkan nematoda, kasa logam berikut sampel tanah di atasnya diangkat secara perlahan-lahan. Buka penjepit, kemudian air yang terdapat pada leher corong ditampung ke dalam tabung kaca. Biarkan suspensi beberapa saat agar nematoda berkumpul di bagian dasar tabung. Bila perlu gunakan aspirator untuk mengurangi jumlah air di dalam tabung. Pengambilan air agar dilakukan dengan hati-hati sehingga nematoda tidak ikut terbawa.
- Identifikasi nematoda dilakukan dengan mengamati ciri morfologinya dibawah mikroskop



Gambar 3. Diagram metode Baermann Funnel

### ***Ekstraksi Dengan Metode Penyaringan dan Sentrifugasi***

#### Cara kerja:

- a. Sejumlah sampel tanah yang sudah dibersihkan dari kotoran dilarutkan dengan air di dalam baskom kapasitas 4 l, dan biarkan beberapa menit agar ikatan partikel-partikel tanah terlepas satu sama lain. Setelah beberapa lama sampel tanah diaduk perlahan-lahan kemudian dibiarkan sehingga material yang berat akan mengendap pada bagian dasar, sedangkan nematoda ada di bagian atas;
- b. Secara perlahan-lahan larutan dituangkan ke dalam baskom lain (baskom kedua) melalui saringan 45  $\mu\text{m}$ . Saringan dibilas dengan air mengalir (posisi miring  $\pm 45^\circ$ ) dan air yang tertinggal pada dasar saringan ditampung ke dalam tabung sentrifus;
- c. Air hasil saringan pertama pada baskom kedua dituangkan kembali ke dalam baskom ketiga melalui saringan 38  $\mu\text{m}$ . Kemudian saringan dibilas dengan air mengalir (posisi miring  $\pm 45^\circ$ ) dan air yang tertinggal pada dasar saringan ditampung ke dalam tabung sentrifus. Lakukan penyaringan penyaringan seperti proses di atas untuk mendapatkan nematoda yang lebih banyak;
- d. Suspensi nematoda di dalam tabung selanjutnya disentrifugasi. Setelah sentrifugasi cairan bagian atas dibuang secara perlahan-lahan hingga hanya tertinggal nematoda dan sedikit air;
- e. Masukkan larutan gula (450g/L) ke dalam tabung sentrifus dan diaduk perlahan-lahan;
- f. Nematoda di dalam larutan gula kembali disentrifugasi. Setelah dilakukan sentrifugasi lalu buang kotoran yang terdapat di bagian atas larutan, kemudian sisa larutan berikut nematoda yang terdapat didasar tabung dibilas dengan air melalui saringan 38  $\mu\text{m}$ . Nematoda yang terperangkap di dasar saringan dikumpulkan untuk diidentifikasi atau dikoleksi.

### ***Ekstraksi Nematoda Sista***

#### Cara kerja:

- a. Sampel tanah yang sudah dikering-anginkan dilarutkan didalam glas beaker kapasitas 4 l dan dibiarkan selama  $\pm 10$  detik agar partikel tanah mengendap;
- b. Larutan dituangkan melalui 2 buah saringan dengan ukuran lubang yang berbeda, masing-masing 710  $\mu\text{m}$  dan 250  $\mu\text{m}$  (saringan dengan ukuran lubang lebih besar berada di atas);

- c. Material yang tertampung pada saringan kedua (250  $\mu\text{m}$ ) dituangkan di atas kertas saring di dalam corong Buchner pada kondisi vakum;
- d. Amati material pada kertas tisu untuk memperoleh nematoda sista. Apabila corong Buchner tidak tersedia, maka material pada kertas saring direndam ke dalam alkohol 70%. Dengan cara ini nematoda sista akan mengapung dan terkumpul pada pinggiran bagian atas kertas tisu.

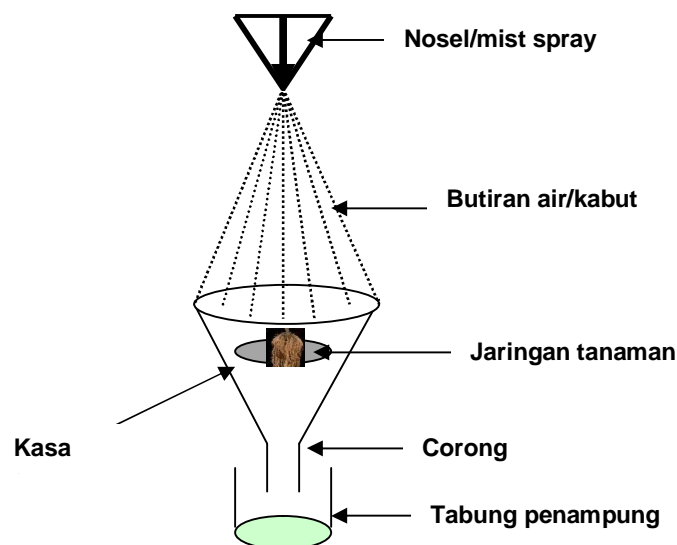
### 3.2. Ekstraksi Nematoda Dari Sampel Tanaman

Nematoda parasit tumbuhan dapat ditemukan pada akar, batang, daun dan biji. Oleh sebab itu, metode ekstraksi yang akan digunakanpun akan bervariasi tergantung pada jenis sampel dan species nematoda yang dikehendaki. Ekstraksi nematoda endoparasit migratori akan diperoleh hasil yang lebih baik jika menggunakan alat pengkabutan (*mister*), walaupun metode *Whitehead tray* atau metode *Baermann funnel* juga dapat digunakan. Untuk nematoda-nematoda yang bersifat menetap (*sedentary*) cara yang digunakan adalah dengan memotong dan membelah jaringan tanaman, atau nematoda diawetkan bersama dengan jaringan tanaman yang diserangnya.

#### ***Ekstraksi Dengan Metode Pengkabutan (Mist extraction)***

##### Cara kerja:

- a. Jaringan tanaman yang sudah dipotong-potong (panjang  $\pm 10$  mm) dimasukkan ke dalam wadah yang bagian bawahnya terdapat lubang-lubang kecil, atau ke dalam corong yang sudah dialas kasa (gambar 5). Di bawah wadah atau corong dipasang tabung kaca yang fungsinya menampung tumpahan air rendaman yang mengandung/ membawa nematoda;
- b. Wadah berikut tabung penampung dimasukkan ke dalam mister/alat pengkabut. Pengkabutan dilakukan selama 10 menit dengan interval 10 menit sekali;
- c. Nematoda di dalam tabung penampungan dapat dikumpulkan setiap 2-4 hari. Dengan metode pengkabutan diperoleh nematoda yang kondisinya segar disebabkan aliran air yang senantiasa baru dan kaya oksigen. Untuk memudahkan pengumpulan nematoda, air di dalam tabung penampungan dapat dikurangi terlebih dahulu dengan aspirador.



Gambar 6. Diagram metode pengkabutan

## **Metode Pembedahan (Dissection)**

### Cara kerja:

- a. Bagian tanaman yang diduga diserang nematoda dipotong-potong sehingga memungkinkan untuk dilakukan pengamatan di bawah mikroskop stereo;
- b. Potongan jaringan tanaman direndam dengan air bersih di dalam cawan Petri, kemudian dengan menggunakan jarum atau scalpel yang ujungnya runcing jaringan tanaman dirobek/dikais-kais sehingga akan mempermudah nematoda keluar dari dalam jaringan. Dengan merendam jaringan lebih lama, maka diharapkan akan diperoleh jumlah nematoda yang lebih banyak.

### **3.3. Pengawetan dan Pembuatan Preparat**

Tubuh nematoda sangat rapuh sehingga mudah rusak jika tidak ditangani dengan benar. Untuk mendapatkan spesimen awetan yang baik maka proses pembuatannya harus mengikuti prosedur yang benar, dimulai dari cara mematikan, fiksasi hingga pembuatan spesimen awetan atau awetan dalam bentuk preparat.

#### ***Mematikan Nematoda Dengan Pemanasan***

Sebelum dilakukan fiksasi, nematoda harus dimatikan terlebih dahulu dengan cara pemanasan agar struktur tubuhnya tidak rusak. Cara mematikan yang benar adalah dengan memberikan panas yang sifatnya mendadak ( $\pm 60$  °C), yaitu menyeduh dengan air panas atau dengan larutan fiksatif panas, kemudian segera didinginkan dengan menambahkan bahan yang sama. Mematikan nematoda dapat juga dilakukan dengan menuangkan air mendidih ke dalam kumpulan nematoda di dalam tempat yang sudah berisi air dengan volume sama dengan jumlah air yang dipanaskan. Mematikan nematoda dengan suhu yang berlebihan tidak dibenarkan karena dapat merusak struktur bagian dalam nematoda.

#### ***Fiksasi***

Metode fiksasi yang paling mudah dilakukan adalah dengan merendam spesimen nematoda di dalam larutan formalin 2-5%, atau mematikannya dengan larutan formalin panas. Spesimen direndam dalam larutan fiksatif paling sedikit selama 12 jam, namun yang paling baik adalah selama 2 minggu sebelum dilakukan proses berikutnya.

Larutan fiksatif lain yang biasa digunakan antara lain: TAF (formaldehide 3%, Triethanolamine 0,2% ditambah air destilasi), dan larutan FA 4:1 (formaldehide 4%, acetic acid 0,1% dan air destilasi). Kelemahan kedua jenis fiksatif tersebut adalah tidak bisa digunakan untuk menyimpan spesimen dalam waktu lama. Alkohol tidak bisa digunakan sebagai fiksatif jika akan melakukan kajian morfologi, namun dapat digunakan untuk analisis deoxyribonucleic acid (DNA).

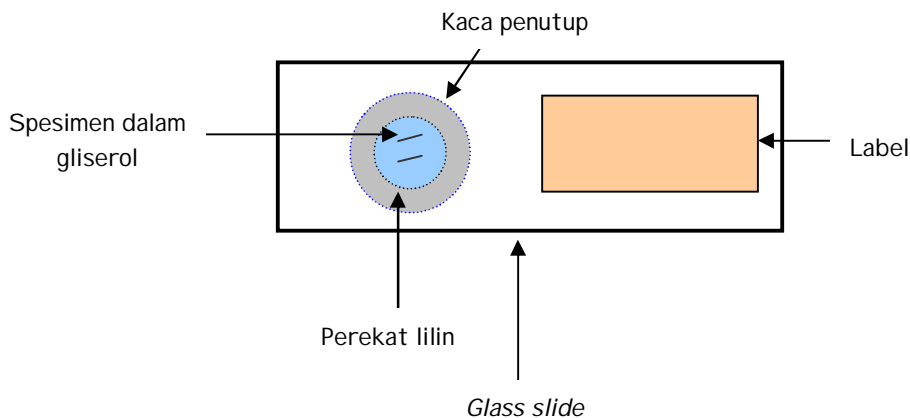
#### ***Pembuatan Preparat Awetan Permanen***

Spesimen awetan permanen dibuat dengan metode penguapan lambat (*slow evaporation method*), yaitu dengan memasukkan spesimen nematoda yang sudah difiksasi ke dalam larutan gliserol.

### Cara kerja:

- a. Masukkan spesimen ke dalam cawan petri kecil atau cawan hitung (*counting dish*) yang sudah diisi larutan gliserol 2-5% + air destilasi;
- b. Biarkan air di dalam larutan menguap secara perlahan selama satu minggu dengan memasukkan cawan Petri ke dalam oven pada suhu  $\pm 40$  °C, atau meletakkannya di dalam desikator. Agar penguapan berjalan lambat maka cawan petri harus ditutup namun tidak terlalu rapat;

- c. Pembuatan preparat dilakukan dengan memasukkan spesimen nematoda ke dalam larutan gliserol mengandung air (*anhydrous glyserol*) pada *glass slide* yang bersih. Sebaiknya setiap *glass slide* diisi lebih dari satu nematoda;
- d. Untuk menjaga agar spesimen tidak rusak maka diantara *glass slide* dengan kaca penutup dipasang 3-4 potongan serat kaca;
- e. Perekat kaca penutup dapat berupa cat kuku atau menggunakan lilin;
- f. Jika menggunakan lilin sebagai perekat, taburkan serbuk lilin di sekeliling spesimen/disekeliling larutan gliserol, kemudian letakan kaca penutup di atasnya. Letakkan *glass slide* di atas piringan pemanas (*hot plate*) dengan suhu  $\pm 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  hingga serbuk lilin mencair. Jika seluruh serbuk lilin sudah mencair, *glass slide* segera diangkat (gambar 7).



Gambar 7. Diagram preparat awetan dengan perekat lilin

#### 4. Media Tumbuh

Sebagian besar media tumbuh mikro-organisme dapat diramu sendiri atau didapat dengan membeli media siap pakai. Berdasarkan pengalaman (literatur) kualitas media tumbuh siap pakai (komersial) biasanya lebih konsisten dibandingkan dengan media tumbuh yang diramu dari bahan dasar alami.

##### **Potato Dextrose Agar (PDA)**

Medium PDA sangat cocok untuk menumbuhkan dan mengisolasi cendawan.

##### Bahan:

Kentang	: 200 g
Dextrose (glucose)	: 20 g
Agar	: 20 g
Air destilasi	: 1 l

##### Cara pembuatan:

- a. Kentang yang sudah dicuci bersih (tidak dikupas), diiris-iris dengan ketebalan  $\pm 1\text{ cm}$  kemudian direbus selama 1 jam;
- b. Sisa air rebusan kentang disaring kemudian dicampurkan dengan agar, dextrose dan air sehingga volume seluruhnya menjadi 1 l.
- c. Semua bahan dimasukkan ke dalam botol media dan diautoclave pada suhu  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit.

### **Tap Water Agar (TWA)**

Tap Water Agar atau sering juga disebut Water Agar (WA) sangat sesuai untuk mengisolasi berbagai jenis cendawan. Bahan yang berasal dari jerami, biji-bijian sereal dan tanaman lainnya dapat ditambahkan ke dalam medium agar untuk memacu cendawan berspora.

#### Bahan:

Agar	:	20 g
Tap water/air ledeng	:	1 l

#### Cara pembuatan:

Larutkan agar ke dalam 1 l air kemudian diautoclave pada suhu 121 °C selama 20 menit. Agar diperhatikan bahwa air ledeng yang mengandung bahan-bahan kimia seperti pembunuh kuman atau penghilang bau tidak dianjurkan untuk digunakan sebagai bahan campuran medium.

### **V-8 Juice Agar (V-8J)**

V-8 Juice Agar merupakan medium yang baik untuk menumbuhkan cendawan, khususnya cendawan dari genus *Phytophthora*.

#### Bahan:

V-8 juice	:	200 ml
CaCO <sub>3</sub>	:	3 g
Agar	:	20 g
Air destilasi	:	800 ml

#### Cara pembuatan:

Campurkan seluruh bahan, kemudian disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 20 menit. Apabila v-8 juice tidak tersedia, maka bahan tersebut dapat diganti dengan jus tomat, wortel atau celery.

### **King's B Agar**

King's B Agar adalah medium yang sesuai untuk mengisolasi bakteri patogen tanaman, terutama species bakteri fluorescent dari genus *Pseudomas* dan *Erwinia* spp.

#### Bahan-bahan:

Proteose peptone	:	20 g
Glycerol	:	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrous)	:	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	:	1,5 g
Agar	:	15 g
Air destilasi	:	1 l

#### Cara pembuatan:

Campurkan bahan-bahan kemudian diautoclave pada suhu 121 °C selama 25 menit. pH medium agar disesuaikan 7,2.

### **Nutrint Agar (NA)**

Nutrien Agar merupakan medium umum untuk mengisolasi bakteri.

#### Bahan:

Yeast extract	:	3 g
Peptone	:	5 g

NaCl	:	5 g
Agar	:	15 g
Air destilasi	:	1 l

Cara pembuatan:

Campurkan seluruh bahan kemudian diautoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. pH medium agar disesuaikan pada 7,4.

***Sucrose Peptone Agar (SPA)***

Sucrose Peptone Agar adalah medium yang baik untuk menumbuhkan dan mengisolasi berbagai jenis bakteri patogen tanaman.

Bahan:

Sucrose	:	20 g
Peptone	:	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrous)	:	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	:	0,25g
Agar	:	12 g
Air destilasi	:	1 l

Cara kerja:

- Bahan-bahan dicampur, kemudian diautoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. pH medium agar disesuaikan pada 7,2-7,4

***Malt Extract Agar (MEA)***

Malt Extract Agar sangat sesuai untuk menumbuhkan dan mengisolasi cendawan dan ragi.

Bahan:

Malt extract	:	2-20 g
Agar	:	20 g
Air destilasi	:	1 l

Cara kerja:

Seluruh bahan dicampur kemudian diautoclave pada suhu 121 °C selama 20 menit. Jumlah malt extract yang digunakan dapat divariasikan sesuai keinginan atau pengalaman.

***Glycerol Agar (GA)***

*Glycerol Agar* digunakan sebagai medium untuk biakan awetan kering sebagai spesimen herbarium.

Bahan:

Glyserol	:	25 ml
Agar	:	20 g
Air ledeng/tap water	:	1 l

Cara kerja:

- Setelah semua bahan dicampur maka medium disterilkan dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 20 menit.
- Biakan cendawan pada medium agar yang sudah kering sebagian diletakkan di atas medium GA dalam cawan Petri, kemudian dikeringkan selama 2-3 hari. Medium GA kering lebih kenyal dan lebih elastis dibanding medium agar kering lainnya.

## VI. Mengawetkan dan Menyimpan Spesimen

### 1. Spesimen Herbarium

Spesimen herbarium adalah tanaman atau bagian tanaman atau materia cendawan yang sudah dikeringkan dan diberi label serta disimpan dalam bentuk paket. Spesimen dapat juga berupa biakan kering, slide mikroskop, foto dan gambar/ilustrasi. Di dalam paket spesimen herbarium dapat disertakan lembar catatan (yang berhubungan dengan herbarium spesimen bersangkutan), catatan hasil korespondensi dan catatan-catatan relevan lainnya.

#### 1.1. Spesimen Kering

Tanaman atau bagian tanaman dan material cendawan yang akan dikeringkan dijepit diantara dua lembar kertas hisap (*blot paper*) atau kertas koran. Kertas hisap atau kertas koran selanjutnya dijepit diantara dua lembar kertas karton yang permukaannya bergelombang. Papan atau bahan lain dapat digunakan untuk menggapit/mempres kertas karton. Proses pengeringan memerlukan waktu beberapa hari dan akan lebih cepat jika kertas hisap diganti setiap hari, dijemur atau memanfaatkan sumber panas lainnya.

Spesimen harus tetap berada dalam penjepit sampai benar-benar kering supaya diperoleh hasil yang baik. Spesimen yang dibuka sebelum kering sering menyebabkan keriput dan mudah ditumbuhi cendawan. Kebanyakan tanaman yang dikeringkan dengan cara ini memerlukan waktu 5-10 hari. Sebelum disimpan di dalam herbarium sebaiknya spesimen difumigasi terlebih dahulu, atau diletakkan di dalam freezer selama beberapa jam untuk mencegah infestasi tungau dan serangga perusak.

Pengawetan cendawan golongan Basidiomycetes (bertubuh buah besar) khususnya kelompok Agaricales (bertubuh buah lunak) dilakukan dengan mengeringkannya sesegera mungkin. Pengeringan akan mempengaruhi warna, bentuk dan ukuran, namun pengelolaannya akan menjadi lebih mudah dibandingkan dengan spesimen yang disimpan dalam bentuk awetan basah. Cendawan bertubuh-buah besar juga dapat diawetkan dengan cara kering-beku. Cara ini dapat mempertahankan warna serta bentuk cendawan. Walaupun demikian, spesimen kering-beku menjadi sangat rapuh sehingga harus ditangani dengan hati-hati. Cendawan dengan tubuh- buah besar seringkali tidak bisa disimpan di dalam paket herbarium dan mudah sekali rusak. Hal tersebut dapat diatasi dengan cara menyimpan cendawan di dalam kotak karton yang diisi *silica gel* sehingga dapat bertahan dalam jangka waktu lama.

Spesimen herbarium kering dan biakan kering sebaiknya dibungkus dengan kertas bebas asam atau kantong kertas (*card packets*) dengan ukuran standar ( $\pm$  panjang x lebar = 10 cm x 10-15 cm). Sebelum dimasukkan ke dalam kantong, sebaiknya spesimen dimasukkan terlebih dahulu ke dalam kantong kertas tipis bebas asam. Sebaiknya kertas catatan yang akan diselipkan bersama spesimen seperti : label, lem, tinta dan plastik juga bebas asam untuk menghindari kerusakan spesimen akibat substansi yang bersifat asam.

Bagian depan setiap paket herbarium agar dicantumkan label yang berisi:

- a. Nomor pendaftaran/nomor telusur herbarium
- b. Nama ilmiah patogen
- c. Nama bahan atau nama tanaman inang
- d. Tempat/lokasi pengambilan: nama negara, provinsi, derajat berdasarkan garis lintang maupun garis bujur
- e. Nomor dan nama kolektor

- f. Tanggal pengambilan
- g. Nama orang yang melakukan identifikasi
- h. Referensi, yaitu publikasi dimana informasi yang berkenaan dengan spesimen bersangkutan diperoleh

QUEENSLAND DEPARTMENT OF PRIMARY INDUSTRIES PLANT PATHOLOGY HERBARIUM (BRIP)	
BRIP 39807	Uredinales
<i>Racospermyces digitatus</i> (G. Winter) J. Walker	
Tanaman inang	: Acacia mangium Willd.
Famili tan. Inang	: Mimosaceae
Gejala	: Pilodi karat
Lokasi	: Meunga, QJD Australia
Kolektor	: Ivory, M.H.
No. koleksi	: P9288
Tanggal koleksi	: 23 Oktober 1997
Determiner	: Shivas, R.G.
Duplikat	: --
Keterangan tambahan: .....	
.....	

Kolom di atas adalah contoh informasi yang harus dituliskan pada label spesimen koleksi.

Setiap spesimen dalam herbarium sebaiknya diberi nomor yang unik dan berbeda satu sama lain, agar memudahkan pencarian atau penelusuran. Pemberian nomor unik tersebut dapat dilakukan misalnya dengan menggabungkan nomor pendaftaran/nomor telusur dengan kode institusi yang memilikinya.

Sebaiknya setiap spesimen yang dimiliki dibuatkan duplikatnya. Pemberian nomor pada spesimen duplikat harus sama dengan nomor spesimen aslinya. Spesimen duplikat diperlukan sebagai bahan tukar menukar atau untuk disimpan di herbarium lain.

Kebanyakan spesimen koleksi penyakit tanaman di dalam herbarium adalah cendawan. Koleksi biasanya disusun menurut kelompoknya atau kelasnya kemudian diurut berdasarkan ordo sehingga menggambarkan evolusi (*phylogeny*) sejak dahulu hingga saat ini. Ascomycotina dan Basidiomycotina adalah kelompok yang dominan dari sekian banyak kelompok yang ada. Genus-genus cendawan di dalam satu ordo dapat disusun secara alpabet.

Cendawan-cendawan tingkat tinggi seperti cendawan penyebab penyakit karat (Uredinales), cendawan penyebab penyakit gosong (Ustilaginomycetes) dan cendawan penyakit embun tepung (Erysiphales) biasanya disusun berdasarkan nama tanaman inangnya. Hal tersebut dikarenakan ketiga jenis cendawan ini memiliki tanaman inang yang spesifik.

Pemberian nama untuk cendawan-cendawan anamorfik (Deuteromycetes/cendawan tidak sempurna/*fungi imperfecty*/ cendawan fase aseksual/cendawan fase konidia) sebaiknya ditulis berdasarkan nama fase teleomorfiknya, walaupun spesimen yang disimpan bukan fase teleomorfik.

Spesimen-spesimen yang ukurannya terlalu besar sehingga tidak memungkinkan untuk disimpan di dalam paket spesimen dapat disimpan ditempat lain. Sebagai penggantinya maka di dalam paket spesimen dimasukan lembar catatan yang menerangkan letak dimana spesimen yang sebenarnya disimpan. Demikian pula halnya bagi spesimen-spesimen yang diberikan kepada institusi lain.

## 1.2. *Type Specimen*

*Type specimen* adalah satu spesimen (atau ilustrasi) yang dijadikan dasar pemberian nama ilmiah suatu organisme. Apabila satu cendawan baru telah ditemukan kemudian diberi nama, maka spesimen herbarium cendawan tersebut dinyatakan sebagai referensi tetap untuk pemberian nama cendawan sejenis yang ditemukan di kemudian hari. *Type specimen* cendawan harus diawet-keringkan secara permanen. Kultur cendawan tidak dapat disebut sebagai *type specimen*, namun biakan cendawan yang disimpan dalam kondisi inaktif dan disimpan sebagai spesimen kering-beku atau secara *deep-freezing* dapat dikategorikan sebagai *type specimens*.

*Type specimen* secara tradisional disimpan di dalam paket berwarna merah atau paket dengan garis pinggir berwarna merah sehingga mudah dikenal diantara koleksi herbarium. Termasuk sebagai *type specimen* atau *type material* antara lain:

- *Holotype* adalah spesimen atau ilustrasi yang dibuat oleh authornya dan dinyatakan sebagai *type* untuk nama yang baru.
- *Isotype* adalah setiap spesimen hasil duplikasi dari *holotype*.
- *Lectotype* adalah spesimen atau ilustrasi yang dibuat dari material aslinya dan dinyatakan sebagai *type* disebabkan pada saat itu belum ada publikasi yang menyatakan *holotypenya*, atau *holotype* yang pernah ada hilang, atau spesimen tersebut dimasukan ke dalam anggota lebih dari satu takson.
- *Isolectotype* adalah setiap spesimen hasil duplikasi *lectotype*.
- *Syntype* adalah setiap spesimen yang tercantum dalam publikasi pertama (tempat pertama kali dipublikasikan) dan pada waktu itu belum ada *holotypenya*, atau jika pada saat yang bersamaan dua atau lebih spesimen dibuat sebagai *type*.
- *Paratype* adalah setiap spesimen yang tercantum dalam publikasi pertama (tempat pertama kali dipublikasikan) dimana pada saat itu belum ada *holotype*, *isotype* maupun *syntype*.
- *Neotype* adalah spesimen atau ilustrasi yang dipilih dan berfungsi sebagai *nomenclatural type* (*type acuan* untuk pemberian nama) dikarenakan seluruh material yang menjadi dasar pemberian nama suatu takson yang diambil telah hilang atau musnah.
- *Epitype* adalah spesimen atau ilustrasi yang dipilih dan berfungsi sebagai *interpretive type* dikarenakan *holotype*, *lectotype* atau *neotype* yang dibuat sebelumnya, atau seluruh material asli yang memuat nama yang sudah valid dan telah dipublikasikan ternyata bersifat *ambiguous* atau meragukan, dan tidak dapat diaplikasikan untuk mengidentifikasi secara tepat suatu takson.
- *Topotype* adalah setiap spesimen yang diambil dari tempat yang sama dengan *holotype*.

## 1.3. Biakan Kering

Ciri morfologi atau karakter morfologi biakan merupakan hal penting dalam mengkaji seluk beluk cendawan. Biakan kering adalah satu-satunya cara untuk mendapatkan

spesimen permanen isolat cendawan yang diperoleh dari dalam tanah, air atau dari tubuh binatang. Biakan cendawan kering juga dapat digunakan sebagai pelengkap jika sporulasi atau pertumbuhan cendawan pada spesimen tanaman inang sangat jarang. Oleh sebab itu, biakan cendawan kering dapat disimpan di dalam paket bersama-sama dengan spesimen kering tanaman inangnya.

Biakan kering diperoleh dengan cara menumbuhkan cendawan pada medium agar yang sesuai hingga mencapai fase yang dikehendaki. Biakan cendawan selanjutnya dikeringkan di dalam *laminar air flow* selama 2-3 hari sampai medium agar terlepas dari cawan petri. Setelah benar-benar kering, biakan di dalam cawan petri diambil dan dimasukkan ke dalam paket herbarium. Cendawan-cendawan yang memiliki struktur sangat lunak dapat disimpan di dalam cawan petri yang tipis.

Dalam praktek terkadang sulit diperoleh biakan kering yang bagus dan utuh. Biakan yang dikeringkan seringkali berkeriput atau pecah-pecah, untuk menghindari kerusakan maka digunakan medium *hot Glycerol Agar (GA)* sebagaimana telah diuraikan sebelumnya.

Spesimen biakan kering seringkali tidak mematikan cendawan yang ditumbuhkan. Beberapa jenis cendawan dapat menghasilkan spora dalam jumlah besar dan mudah sekali disebarkan oleh angin sehingga dapat mengkontaminasi biakan lainnya. Hal yang dapat dilakukan untuk mematikan biakan cendawan adalah dengan meletakkan biakan di dalam *desicator* yang sudah diisi formalin. Cara lain adalah dengan menuangkan  $\pm 1,5$  ml formalin pada tutup cawan petri yang diletakkan terbalik (tutup di bawah) kemudian disimpan di dalam *fumehood* selama 1-3 hari.

#### 1.4. Preparat (*Microscope Slide*)

Spesimen organisme patogen juga dapat disimpan dalam bentuk preparat atau *microscope slide*. Preparat yang sudah diletakkan di dalam medium pengawet (*mount solution*) kemudian ditutup dengan kaca penutup dapat disimpan dalam waktu lama. Penguapan dapat dihindari dengan merekatkan bagian pinggir kaca penutup dengan mengoleskan cat kuku 2-3 kali. Preparat bisa bertahan hingga bertahun-tahun dengan cara tersebut.

Jaringan tanaman atau cendawan yang banyak mengandung air dapat dibuat awetan permanen dengan membuang kandungan airnya terlebih dahulu (*dehidrasi*). Hal tersebut dapat dilakukan dengan cara merendam jaringan tanaman atau cendawan ke dalam larutan alkohol dengan konsentrasi berbeda selama beberapa menit. Perendaman dimulai dari konsentrasi paling rendah hingga konsentrasi paling tinggi, yaitu 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan terakhir pada larutan alkohol absolut. Selanjutnya spesimen dibersihkan dengan xylen kemudian dibuat preparat dengan medium *Canada Balsam*.

Sebaiknya preparat tidak disimpan di dalam paket herbarium, melainkan diletakkan di dalam kotak yang dirancang khusus untuk menyimpan preparat. Setiap preparat diberi label dengan mencantumkan nomor telusur untuk mempermudah mencari spesimen herbarium asalnya.

#### 1.5. Pengemasan dan Pengiriman

Perlu diingat kembali bahwa semua spesimen di dalam herbarium harus dibungkus dengan kertas atau kotak karton yang bebas asam. Spesimen-spesimen yang berukuran besar diletakkan di dalam kotak karton untuk menghindari kerusakan. Setiap bagian yang terdapat di dalam paket herbarium yaitu : lembar koleksi, catatan, gambar dan slide mikroskop diberi label nomor telusur yang jelas. Biakan kering

sebaiknya diletakkan di atas kertas saring (*filter paper*) kemudian dimasukkan ke dalam paket kertas yang transparan bersama-sama dengan spesimen tanaman.

Spesimen herbarium yang akan dikirim sebaiknya tetap berada di dalam pembungkus atau paket, kemudian bersama dengan spesimen lainnya dibungkus kertas koran atau pembungkus berbusa (*bubble wrap*), selanjutnya dimasukkan ke dalam kotak karton. Biakan kering-beku di dalam ampul atau *vial* sebaiknya dibungkus kain katun (*cotton wool*) kemudian dimasukkan ke dalam pembungkus karton yang bentuknya silindris.

## 2. Kultur (*Culture*)

Tujuan utama pembuatan kultur cendawan maupun bakteri untuk mempertahankan daya tumbuh/viabilitasnya dalam jangka waktu tertentu tanpa mengalami perubahan secara morfologi, fisiologi maupun secara genetik. Dengan demikian, kultur harus dijaga agar tetap hidup selama dilakukan kajian, bahkan kadang-kadang harus dipertahankan dalam jangka waktu yang tidak terbatas. Mempertahankan biakan dalam waktu lama menjadi penting terutama jika biakan tersebut berasal dari type spesimen atau type material serta sudah terdaftar di dalam publikasi.

Jika tidak tersedia kultur yang sudah diidentifikasi maka sangat mustahil untuk melakukan perbandingan taksonomi. Perbandingan taksonomi diperlukan dalam penentuan klasifikasi dan pemberian nama bagi takson yang baru.

Konvensi Keanekaragaman Biologi (*Convention of Biological Diversity*) yang ditandatangani oleh 180 negara juga mengatur tentang kultur, khususnya kultur yang dikoleksi sejak tahun 1995. Konvensi memberi hak sepenuhnya kepada negara tempat kultur suatu mikro-organisme berasal. Konvensi mengarahkan agar dalam pemanfaatannya dibentuk suatu kerjasama atau tukar menukar saling memberi manfaat dan bersifat terbuka terutama di dalam hal eksploitasi yang secara ekonomi memberikan keuntungan. Berkaitan dengan hal tersebut maka didalam kegiatan tukar menukar koleksi seringkali terlebih dahulu dibuat suatu kesepakatan (*Material Transfer Agreement*) sebelum kegiatan tukar menukar dilakukan.

Berikut ini beberapa contoh metode dalam mempertahankan viabilitas kultur.

### 2.1. Menumbuhkan pada Medium Agar

Biakan biasanya ditumbuhkan di dalam botol McCartney volume 20 ml. Sebaiknya digunakan botol yang memiliki leher agak lebar sehingga akan memudahkan pada saat dilakukan pembiakan ulang (*sub culturing*). Medium tumbuh seperti PDA sangat sesuai untuk berbagai jenis cendawan, dan Nutrien Agar untuk menumbuhkan bakteri. Beberapa jenis cendawan dan bakteri tertentu mungkin menghendaki medium khusus untuk pertumbuhannya.

Medium tumbuh dipersiapkan dengan cara menuang campuran bahan ke dalam botol sebanyak kira-kira setengah bagian volume botol, selanjutnya disterilisasi. Medium kemudian didinginkan dan botol diletakkan pada posisi miring sehingga pada saat membeku terbentuk permukaan medium yang lebih luas.

Pada saat inokulasi cendawan atau bakteri, inokulum diletakkan pada permukaan medium, yaitu di bagian sudut bawah. Setelah diinkubasi biakan harus disimpan di dalam tempat yang kondisinya dingin dan bersih. Biakan disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 5-8 °C. Cendawan dan bakteri yang sensitif terhadap suhu dingin dapat disimpan pada suhu 15 °C. Biakan sebaiknya diperiksa secara regular karena medium agar akan cepat kering jika disimpan di tempat yang udaranya kering. Kewaspadaan juga diperlukan dalam mempertahankan biakan cendawan, karena

beberapa jenis Arthropoda seperti tungau seringkali masuk ke dalam botol dan merusak biakan. Oleh sebab itu, sebaiknya botol ditutup rapat dengan plastik film. Sebaiknya viabilitas biakan dipertahankan dengan menumbuhkan ulang (*re-culturing*) pada medium yang baru setiap enam bulan. Namun perlu diingat bahwa *re-culturing* bisa mempercepat terjadinya perubahan morfologi, menurunkan patogenisitas dan mengurangi kemampuan menghasilkan spora.

## 2.2. Menyimpan di dalam Minyak Mineral (*Mineral Oil*)

Metode penyimpanan biakan di dalam minyak mineral sangat sesuai untuk daerah tropis karena dapat mencegah kekeringan dan menghindarkan biakan dari serangan tungau.

Penyimpanan biakan di dalam minyak mineral dilakukan dengan cara menuangkan minyak mineral steril di atas biakan (pada medium agar),. Perlu diperhatikan bahwa biakan masih dalam keadaan sehat dan segar, sedangkan untuk cendawan sebaiknya dalam kondisi berspora penuh. Minyak mineral dituangkan pada biakan hingga  $\pm 1$  cm di atas permukaan medium kemudian ditutup rapat.

Biakan yang disimpan di dalam minyak mineral dapat bertahan 2-40 tahun. Walaupun demikian, biakan sebaiknya diperbaharui setiap lima tahun sekali.

## 2.3. Menyimpan di Dalam Air

Potongan agar blok yang berisi biakan cendawan (berumur satu minggu) dimasukan ke dalam Wheaton vial 5 ml atau botol McCartney 20 ml kemudian direndam dengan air destilasi steril. Selanjutnya botol ditutup rapat dan disimpan pada suhu ruangan. Metode ini dapat digunakan untuk menyimpan biakan cendawan hingga beberapa tahun. Cara penyimpanan seperti ini sangat sesuai untuk cendawan *Pythium* spp. dan *Phytophthora* spp.

Berbagai jenis bakteri juga dapat disimpan dengan metode ini, yaitu dengan mencampurkan 1 *loop* biakan bakteri berumur 24-48 jam ke dalam air destilasi steril.

## 2.4. Menyimpan Pada Kondisi Kering-Beku

Spesimen kering-beku diperoleh melalui metode sublimasi, yaitu membuang kandungan air pada spesimen beku. Pada proses ini cairan beku di dalam biakan dirubah menjadi gas tanpa melalui fase cair. Proses ini berlangsung pada tekanan udara rendah.

Gelas ampul atau *vial* yang berisi spesimen kering selanjutnya ditutup rapat. Metode ini sangat sesuai untuk cendawan-cendawan yang manghasilkan spora dan bakteri; Dengan cara ini, viabilitas dapat dijaga hingga 10 tahun atau lebih. Salah satu keunggulan cara ini adalah biakan tidak perlu disimpan di dalam lemari pendingin setelah diproses, cukup disimpan pada suhu ruangan. Kelemahannya adalah dibutuhkan peralatan yang mahal dan tenaga berpengalaman. Perlu diingat bahwa setelah proses sublimasi selesai dilakukan, sebaiknya setiap biakan harus diuji viabilitasnya; karena tidak semua jenis cendawan atau bakteri dapat bertahan hidup melalui proses demikian.

## 2.5. Menyimpan Biakan dalam Tanah

Beberapa jenis mikroorganisme dapat dipertahankan viabilitasnya dengan menyimpannya di dalam tanah. Cara penyimpanannya adalah dengan memasukan tanah yang sudah diayak ke dalam botol McCartney sebanyak kurang lebih setengah bagian volume botol. Tanah beserta botol kemudian disterilkan dengan *autoclave*

pada suhu 121 °C selama 15 menit, Sebaiknya dilakukan sebanyak dua kali. Apabila tanah sudah dingin maka larutan spora (dalam air destilasi steril) dituangkan ke dalam tanah kemudian diinkubasikan pada suhu 20-25 °C selama 5-10 hari. Setelah diinkubasi maka biakan disimpan di dalam lemari pendingin. Cara tersebut dapat mempertahankan cendawan hingga beberapa tahun. Medium agar dapat digunakan untuk menghidupkan kembali cendawan di dalam tanah, yaitu dengan mengambil sejumlah kecil tanah dan meletakkannya di atas medium agar. Cara mengawetkan seperti ini sangat sesuai untuk cendawan *Fusarium* spp., karena cendawan *Fusarium* sering bermutasi apabila terus menerus ditumbuhkan pada medium agar.

## 2.6. Menyimpan pada Silica Gel

Viabilitas bakteri dan cendawan dapat dipertahankan dengan menyimpannya di dalam *silica gel*. Disyaratkan untuk menggunakan *silica gel* murni/tanpa bahan tambahan. Viabilitas dapat dipertahankan dengan cara menuang larutan bakteri atau sebanyak 5% (berat/volume) campuran spora di dalam skim milk ke atas *silica gel* steril di dalam botol. Setelah larutan bakteri atau spora cendawan dituangkan maka botol ditutup rapat kemudian disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4-6 °C. Dengan cara tersebut viabilitas dapat bertahan hingga 11 tahun. Jika ingin mengetahui daya tumbuh cendawan atau bakteri, sebarkan sejumlah kecil *silica gel* di atas medium agar (yang sesuai) untuk menumbuhkan cendawan atau bakteri bersangkutan.

## 2.7. Menyimpan Pada Kertas Saring

Kertas saring juga dapat dipergunakan sebagai medium untuk mempertahankan viabilitas beberapa jenis mikro-organisme patogen khususnya cendawan. Potongan medium agar (berisi biakan cendawan) diletakkan di atas kertas saring steril dan lembab di dalam cawan petri. Cawan petri diletakkan di dalam inkubator dengan suhu 25 °C hingga cendawan tumbuh di seluruh permukaan kertas saring. Jika kertas saring sudah kering (setelah ± 2-4 minggu setelah inokulasi) maka kertas saring dipotong-potong kecil, kemudian potongan kertas diletakkan di dalam botol vial steril dan ditutup rapat. Botol vial selanjutnya disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C. Apabila biakan cendawan yang diawetkan diperlukan kembali, potongan kertas diambil dan diletakkan di atas medium agar (misalnya PDA). Cara penyimpanan tersebut sangat cocok untuk cendawan *Fusarium* spp. Perlu diperhatikan bahwa seluruh kegiatan harus dilakukan dalam kondisi aseptik.

## 2.8. Menyimpan dengan Metode *Cryopreservation*

*Cryopreservation* adalah upaya untuk mempertahankan viabilitas mikro-organisme dengan menyimpan biakan mikro-organisme bersangkutan pada suhu dingin, yaitu pada suhu -20 sampai dengan -85 °C. Metode ini sangat baik untuk menyimpan biakan cendawan, bakteri dan berbagai jenis virus. Bahan yang diperlukan dalam metode *cryopresevation* adalah butiran-butiran keramik berpori (*cryobeads*) dan larutan gliserol sebagai medium. Inokulum bakteri atau cendawan dimasukan/diinokulasikan ke dalam larutan gliserol bercampur butiran keramik di dalam botol *vial* plastik. Setelah diinokulasi botol-botol *vial* disimpan di dalam *freezer*. Mikro-organisme yang disimpan di dalam botol *vial* dapat ditumbuhkan kembali dengan cara mengambil butiran keramik dan meletakkannya di atas medium agar yang sesuai atau menggosokkan cairan/larutan ke atas medium.

## 2.9. Menyimpan dalam Nitrogen Cair

Menyimpan mikro-organisme dalam nitrogen cair pada suhu sangat dingin -190 sampai dengan -196 °C juga merupakan salah satu bentuk *cryopreservation*. Metode ini sesuai untuk berbagai jenis cendawan dan bakteri. Sebelum pendinginan, biakan, jaringan tanaman atau spora cendawan direndam terlebih dahulu dengan bahan

*cryoprotectant* yaitu gliserol 10% sebelum dipindahkan secara aseptik ke dalam ampul. Selanjutnya ampul yang sudah berisi biakan disimpan pada suhu sangat dingin (*ultra low temperature*). *Cryoprotectant* untuk bakteri adalah campuran antara gliserol 10% dengan larutan *nutrient broth* yang dimasukkan secara aseptik ke dalam ampul selanjutnya disimpan pada suhu sangat dingin. Proses pendinginan harus dilakukan secara bertahap agar diperoleh hasil yang baik. Apabila mikro-organisme mampu bertahan dalam tahapan pendinginan maka viabilitasnya dapat dijaga sampai waktu yang tidak terbatas. Kelemahan dari metode ini adalah diperlukan peralatan yang mahal serta tenaga yang berpengalaman.

## VII. Identifikasi Patogen

Metode identifikasi patogen dapat dilakukan dengan menggunakan kunci identifikasi yang mengacu pada ciri-ciri taksonomis, ditambah dengan parameter uji lainnya. Dewasa ini kunci identifikasi yang ada belum tersedia untuk semua jenis organisme patogen. Oleh sebab itu, literatur yang berkenaan dengan organisme patogen menjadi sangat penting.

### 1. Identifikasi Cendawan

Sebagian cendawan patogen tanaman termasuk dalam kelompok Eukaryotik, memiliki ukuran sangat kecil (mikroskopis), biasanya berbentuk filamen, dapat menghasilkan spora, tidak memiliki klorofil, dinding sel mengandung kitin atau selulosa atau keduanya. Tubuh cendawan disebut miselium, tersusun dari individual filamen yang disebut hifa. Pertumbuhan miselium merupakan pertumbuhan ujung hifa.

Cendawan menghasilkan spora sebagai alat reproduksi. Spora dapat berupa sel tunggal (tanpa sekat) atau terdiri dari beberapa sel. Spora dapat diproduksi secara aseksual atau secara seksual. Pada cendawan-cendawan primitif, spora aseksual diproduksi di dalam kantong yang disebut sporangium. Sebagian spora yang dihasilkan memiliki kemampuan untuk bergerak (motile) disebut zoospora. Cendawan yang lain menghasilkan spora secara aseksual yang diproduksi oleh hifa khusus disebut konidiofora, dan spora yang dihasilkan disebut konidium. Konidium juga dihasilkan oleh struktur menyerupai kantong berdinding tebal disebut piknidium.

Reproduksi secara seksual terjadi pada sebagian besar cendawan, dan pada beberapa jenis bereproduksi melalui hasil penggabungan sel gamet membentuk zigot yang disebut zigospora. Jenis yang lain menghasilkan zigot yang disebut oospora.

Pada cendawan Ascomycetes, spora-spora seksual dihasilkan di dalam sel-sel zigot yang disebut askus, dan spora yang dihasilkan disebut askospora. Sedangkan pada cendawan Basidiomycetes, spora dihasilkan oleh sel zigot disebut basidium dan spora yang dihasilkan disebut basidiospora.

Diperkirakan jumlah jenis cendawan yang tergolong sebagai patogen tanaman mencapai 250.000 spesies. Sebagian besar dari species cendawan tersebut menghabiskan daur hidupnya pada tanaman inangnya, dan sebagian waktunya dihabiskan di dalam tanah atau pada sisa-sisa tanaman.

Secara taksonomi cendawan dibagi ke dalam tiga kingdom, yaitu Kingdom Fungi, Kingdom Protozoa dan Kingdom Chromista. Kingdom Protozoa terdiri dari cendawan-cendawan lendir (*slime moulds*), sedangkan Kingdom Chromista terdiri dari cendawan-cendawan Oomycetes termasuk diantaranya cendawan embun tepung (*downy mildews*), *Pythium* dan *Phytophthora*.

Cendawan juga dibagi menjadi empat filum penting, yaitu Zygomycota, Chytridiomycota, Ascomycota dan Basidiomycota.

Sebagian besar jenis cendawan memiliki kekhususan dalam menyerang tanaman inangnya. Itulah sebabnya identifikasi suatu jenis cendawan seringkali dapat dikenali melalui bagian atau organ tanaman yang diserang atau melalui gejala yang ditimbulkannya. Gejala penyakit yang ditimbulkan oleh cendawan antara lain: rebah kecambah (*damping-off*), busuk akar (*root rot*), layu pembuluh (*vascular wilt*), embun tepung (*downy* atau *powdery mildew*), bercak daun (*leaf spot*), hawar daun (*blight*), karat (*rust*), gosong (*smut*),

antraknosa (*anthracnose*), puru (*gall*), mati pucuk (*die-back*) dan penyakit-penyakit pasca panen.

### 1.1. Patogen Menyerang Akar

Adanya infeksi cendawan pada akar mengakibatkan penyerapan air dari dalam tanah dan translokasi nutrisi menjadi terganggu. Akibatnya tanaman menjadi kerdil, layu, dan terjadi diskolorasi (perubahan warna daun). Akar muda biasanya sangat rentan dari serangan cendawan. Luka pada akar yang terjadi saat kultivasi juga akan memperbesar kemungkinan terjadinya penyakit. Rendahnya kandungan nutrisi tanah, kadar keasaman dan salinitas yang tidak seimbang menyebabkan tanaman sangat mudah terserang penyakit akar.

Penyakit busuk akar seringkali sulit didiagnosis, karena suatu penyakit bisa disebabkan oleh lebih dari satu jenis mikro-organisme, misalnya *Fusarium*, *Pythium*, *Macrophomina* dan juga oleh nematoda. Tanah dengan kandungan air tinggi biasanya didominasi oleh cendawan *Phytophthora* dan *Pythium*. Sedangkan *Rhizoctonia* dan *Fusarium* lebih menyukai tanah dengan temperatur yang lebih hangat dan kaya bahan organik.

Selain *Fusarium* dan *Phytophthora*, beberapa genus cendawan Basidiomycetes juga diketahui sebagai penyebab penyakit busuk akar pada tanaman berkayu, antara lain *Armillaria*, *Ganoderma*, *Rigidoporus* dan *Phellinus*. Keempat genus cendawan tersebut dikenal sebagai perusak selulosa.

### 1.2. Patogen Menyerang Batang

#### 1.2.1. Layu Pembuluh (*vascular wilt*)

Patogen yang menyebabkan penyakit layu pembuluh biasanya hanya menyerang pembuluh xylem saja, dan gejala yang ditimbulkan antara lain menurunnya turgiditas, layu, perubahan warna daun. Pada serangan berat dapat menyebabkan tanaman menjadi rebah dan mati, selanjutnya cendawan akan berkembang ke jaringan lain untuk bersporulasi. Empat genus cendawan yang terkenal sebagai penyebab penyakit layu pembuluh antara lain *Fusarium*, *Verticillium*, *Ceratocystis* dan *Ophiostoma*.

Cendawan *Fusarium* menyerang berbagai jenis tanaman, meliputi tanaman sayuran, tanaman bunga, tanaman buah dan tanaman serat. Spesies-spesies yang sering ditemukan biasanya anggota dari *Fusarium oxysporum* complex. Cendawan ini memiliki sejumlah forma spesialis dan ras yang inangnya terbatas hanya pada tanaman tertentu saja.

#### 1.2.2. Kanker (*Canker*)

Penyakit kanker pada tanaman herbaceous disebabkan oleh cendawan seperti *Colletotrichum* dan *Phomopsis*, namun keduanya juga dapat menyerang daun dan buah. Sedangkan penyakit lesio pangkal batang pada tanaman legum disebabkan oleh cendawan *Rhizoctonia solani* dan *Corticium rolfsii*, dan miselium kedua jenis cendawan seringkali mudah diamati pada permukaan jaringan tanaman inangnya. Cendawan *Phytophthora* dan *Fusarium* sering ditemukan menyerang tanaman berkayu, namun berdasarkan gejala luar saja biasanya sulit mendeteksi penyebabnya.

### 1.2.3. Puru (*gall*)

Puru adalah pertumbuhan yang tidak normal atau pembengkakan yang diakibatkan oleh pembesaran jaringan tanaman secara *hyperplastic*. Terjadinya pembesaran disebabkan adanya stimulasi yang diakibatkan oleh serangga, bakteri, virus dan cendawan patogen, misalnya cendawan *Exobasidium* dan *Synchytrium*.

### 1.2.4. Sapu Setan (*witches' broom*)

Gejala sapu setan ditandai oleh pertumbuhan tunas-tunas atau akar dalam jumlah yang berlebihan. Tunas-tunas atau akar tumbuh berimpitan satu dengan yang lain sehingga menyerupai sapu namun kondisinya tidak kokoh. Contohnya adalah penyakit sapu setan pada tanaman coklat disebabkan oleh cendawan *Crinipellis perniciososa*.

### 1.2.5. Kerak Pink (*pink crust* atau *pink disease*)

Penyakit kerak pink disebabkan oleh cendawan *Corticium salmonicolor*. Penyakit ini ditandai oleh adanya kerak pada cabang atau ranting tumbuhan ber kayu, berbentuk pipih dan berwarna pink. Cendawan melakukan penetrasi dan masuk ke dalam jaringan tanaman menyebabkan kematian cabang atau ranting, dan infeksi pada daun menyebabkan daun-daun berkerut.

## 1.3. Patogen Menyerang Daun

Gejala penyakit pada daun sangat penting di dalam mendiagnosis suatu penyakit. Beberapa penyakit pada daun disebabkan oleh organisme saproba dan yang lainnya disebabkan oleh patogen obligat seperti cendawan patogen. Telah disinggung sebelumnya bahwa gejala penyakit yang sifatnya umum pada suatu tanaman dapat diakibatkan oleh patogen-patogen yang berbeda. Namun demikian, terdapat gejala penyakit yang sifatnya spesifik diakibatkan oleh hanya beberapa jenis patogen saja, antara lain sebagai berikut :

### 1.3.1. Antraknosa (*anthracnose*)

Antraknosa ditandai oleh bercak nekrotik, melekung atau cekung dan berwarna gelap, kadang-kadang dikelilingi oleh bagian jaringan yang sedikit menonjol. Di bagian nekrotik kadang-kadang ditemukan rangkaian aservuli cendawan. Gejala antraknosa biasanya terjadi pada daun, batang dan buah. Infeksi pada batang, cabang atau ranting yang berat dapat mengakibatkan mati pucuk (*die-back*). Pada umumnya ahli penyakit tanaman menggunakan istilah antraknosa untuk penyakit yang disebabkan oleh cendawan *Colletotrichum*.

### 1.3.2. Karat Putih (*white rust*)

Cendawan penyebab penyakit karat putih termasuk kedalam kelompok Peronosporales. Gejala karat putih dicirikan oleh adanya rantai sporangia yang dihasilkan oleh struktur disebut sori (tunggal disebut sorus) yang tumbuh secara sub epidermal. Oospora dapat ditemukan di dalam jaringan tanaman inangnya. Sebagai contoh adalah penyakit karat putih pada Brassica disebabkan oleh cendawan *Albugo candida*.

### 1.3.3. Hawar (*blight*)

Istilah *blight* digunakan untuk menyatakan gejala berupa kematian jaringan yang cepat dan meluas serta berkerut. Hawar biasanya terjadi pada daun, bunga, tunas, buah dan bahkan tanaman secara keseluruhan. Walaupun demikian,

penyakit biasanya menyerang jaringan muda terlebih dahulu. Hawar disebabkan oleh berbagai jenis cendawan patogen termasuk *Colletotrichum gloeosporioides* (*mango blossom blight*) dan *Phytophthora colocasiae* (*taro leaf blight*).

#### **1.3.4. Lodoh (*scald*)**

*Scald* pada daun pada fase awal dicirikan oleh gejala seperti terseduh air panas, kemudian berlanjut menjadi lesio berwarna keputihan kadang-kadang sebagian tembus cahaya. Biasanya tidak terjadi klorosis. Contohnya adalah penyakit lodoh daun padi (*rice leaf scald*) disebabkan oleh cendawan *Gerlachia oryzae* dan *barley scald* disebabkan oleh cendawan *Rhynchosporium secalis*.

#### **1.3.5. Blas (*blast*)**

Blas dapat disebabkan oleh cendawan dan bakteri patogen tanaman. Penyakit blas ditandai oleh adanya gejala nekrotik berwarna pucat. Disamping akibat serangan organisme patogen, blas juga dapat diakibatkan karena tanaman mengalami stres, kerusakan akibat serangga atau akibat adanya perubahan cuaca. Sebagai contohnya adalah penyakit blas pada tanaman padi dan rumputan disebabkan oleh cendawan *Pyricularia oryzae*.

#### **1.3.6. Kudis (*scab*)**

*Scab* adalah gejala yang sangat spesifik, terjadi di permukaan jaringan tanaman yang menyerupai kudis. Termasuk kategori scab adalah adanya penebalan pada permukaan jaringan yang disertai dengan pembentukan jaringan gabus. Beberapa jenis cendawan penyebab penyakit kudis antara lain *Elsinoe*, *Fusicladium*, *Sphaceloma*, *Venturia* dan *Cladosporium*. Disamping pada umbi, *scab* juga dapat terjadi pada buah dan batang.

#### **1.3.7. Embun Tepung (*downy mildew*)**

Penyakit embun tepung disebabkan oleh cendawan dari Ordo Sclerosporales (spesies yang menyerang rerumputan) dan Ordo Peronosporales (spesies yang menyerang tanaman dikotil). Kebanyakan cendawan embun tepung sangat tergantung pada adanya film air untuk penyebaran dan invasinya pada tanaman inang. Penyakit embun tepung menyebabkan kerusakan besar pada kelembaban yang tinggi. Contohnya adalah *millet downy mildew* yang disebabkan oleh cendawan *Sclerospora graminicola*. Gejala nampak berupa tumpukan tepung berwarna putih di permukaan bawah daun.

#### **1.3.8. Embun Tepung (*powdery mildew*)**

Cendawan penyebab penyakit *powdery mildew* adalah kelompok parasit obligat dari famili Erysiphaceae, menyerang serealia dan rerumputan. Contohnya adalah *Blumeria graminis*. Penyakit *powdery mildew* ditandai dengan adanya pertumbuhan miselium dan konidia berwarna putih di permukaan daun. Kadang-kadang terbentuk askomata berbentuk bulat dan berukuran kecil. Haustoria terdapat di dalam sel-sel epidermis, konidiofora terbentuk di bagian lateral/samping hifa dan rantai konidia terbentuk secara basipetal. Banyak species memiliki kekhususan inang (forma specialis, f.sp). Cendawan *powdery mildew* memiliki adaptasi yang tinggi terhadap kondisi kering, dan satu-satunya cendawan dimana konidianya mampu tumbuh/berkecambah pada keadaan tanpa air.

### 1.3.9. Embun Jelaga (Sooty mould)

Embun jelaga disebabkan oleh cendawan dari Ordo Capnodiales dan Chaetothyriales. Cendawan menghasilkan lapisan berwarna hitam pada permukaan daun dan batang. Cendawan embun jelaga dapat tumbuh di permukaan daun dan batang dengan memanfaatkan eksudat yang dihasilkan oleh serangga seperti aphids dan scale insects. Adanya embun jelaga di permukaan daun dapat mengurangi fotosintesis dan secara nyata dapat mengurangi vigor tanaman dan hasil.

### 1.3.10. Embun Hitam (black mildew)

Cendawan embun hitam termasuk ke dalam Ordo Meliolales dan kadang-kadang sulit dibedakan dengan embun jelaga. Cendawan embun hitam merupakan cendawan patogen yang sangat umum ditemukan di hutan hujan tropis (*tropical rain forest*). Keberadaan cendawan dicirikan oleh adanya hifa berwarna hitam yang pada sisinya tumbuh hifopodia berukuran pendek, askomata bersifat superfisial dan askospora berukuran besar dan berwarna gelap.

## 1.4. Patogen Menyerang Buah dan Biji

Sejumlah organisme patogen dikenal sebagai penyebab busuk buah, dan salah satu yang paling sering ditemukan adalah cendawan *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorphnya adalah *Glomerella cingulata*). Cendawan ini dikenal sebagai penyebab penyakit antraknosa. Sedangkan busuk buah kakao dan kelapa disebabkan oleh *Phytophthora* spp., dan *Phomopsis* serta *Fusicoccum* dan biasanya ditemukan pada pembusukan ujung tangkai buah.

### 1.4.1. Ergots

*Ergots* disebabkan oleh cendawan dari Ordo Clavicipitales, biasanya terdapat pada rerumputan, termasuk sereal. Konidia *Sphacelia* mampu menginfeksi biji hingga ke ovary. Konidia kebanyakan disebarkan oleh serangga. Sklerotia seringkali mengandung senyawa alkaloid beracun dan mengkontaminasi biji.

### 1.4.2. Cendawan Karat (rust fungi)

Penyakit karat disebabkan oleh cendawan dari Ordo Uredinales. Gejala yang tampak berupa pustul yang berisi masa spora, terdapat di permukaan daun dan batang. Spora berwarna kuning, oranye atau coklat sehingga tampak seperti karat. Contohnya adalah penyakit karat pada jagung disebabkan oleh *Puccinia polysora*, penyakit karat pada sorghum oleh *Puccinia purpurea* dan penyakit karat pada kedelai disebabkan oleh *Phakopsora pachyrhizi*.

Secara ekonomi cendawan penyebab penyakit karat sangat merugikan. Hingga saat ini sudah diketahui lebih dari 7000 spesies termasuk ke dalam kurang lebih 160 genera, dan genus *Puccinia* adalah kelompok yang paling besar. Dari 160 genera yang sudah diketahui, 30 diantaranya dikenal sebagai monotypic. Cendawan penyebab penyakit karat menghasilkan lima jenis spora yang dituliskan dengan huruf Romawi, yaitu:

- O** : spermatia (diproduksi di dalam spermogonia)
- I** : aeciospora (diproduksi di dalam aecia)
- II** : urediniospora (diproduksi di dalam uredinia)
- III** : teliospora (diproduksi di dalam telia)
- IV** : basidiospora (diproduksi di dalam basidium)

Cendawan penyebab penyakit karat yang menghasilkan 5 jenis spora disebut macrocyclic.

Tahapan pembentukan spora sebagai berikut:

1. Basidiospora berkecambah menginfeksi daun tanaman inang;
2. Terbentuk spermogonia dimana spermata diproduksi dan disebarkan oleh serangga. Pada spermogonium juga akan terbentuk *superficial receptive hyphae* (hifa penerima) yang selanjutnya dibuahi oleh spermata.
3. Hifa hasil pembuahan akan menghasilkan aecia dan aeciospora yang dapat disebarkan oleh angin atau oleh serangga. Aeciospora hanya dapat menginfeksi inang perantara (*alternate host*);
4. Setelah terjadi infeksi, miselium akan membentuk uredinia dan urediniospora yang nampak seperti debu berwarna oranye atau coklat. Urediniospora disebarkan oleh angin dan menginfeksi kembali tanaman inang yang sama;
5. Di akhir musim tanam, cendawan akan menghasilkan telia dan teliospora. Kadang-kadang teliospora dan urediniospora terdapat dalam satu sorus. Teliospora biasanya berperan sebagai spora istirahat (*resting spores*). Setiap teliospora dapat membentuk satu basidium (bersekat tiga) dimana dihasilkan basidiospora di dalam sterigmata. Basidiospora disebarkan oleh angin.

#### 1.4.3. Cendawan Gosong (*smut fungi*)

Penyakit gosong disebabkan oleh cendawan Klas Ustilaginomycetes. Penyakit ditandai oleh adanya kumpulan masa spora berwarna hitam (sori). Sori dapat ditemukan pada permukaan akar, batang, daun, bunga, serbuk sari bahkan sampai ke ovary.

Cendawan penyebab penyakit gosong adalah patogen penting pada tanaman pangan dan tanaman hias. Dewasa ini sudah diketahui sekitar 2000 spesies cendawan penyebab penyakit gosong yang termasuk ke dalam 90 genera. Klasifikasi cendawan penyebab penyakit gosong dewasa ini sering mengalami perubahan, didasarkan kepada kajian ultrastruktur dan molekuler. Sementara sistem klasifikasi yang lama mengacu kepada bagaimana tiap-tiap spora berkecambah.

Ciri-ciri yang mudah diamati adalah adanya masa spora berwarna hitam (teliospora). Tidak seperti halnya cendawan karat, spora cendawan gosong tidak memiliki tangkai (pedicellate) dan disebarkan oleh angin.

Pada perkembangan selanjutnya, teliospora akan menghasilkan basidiospora (sporidia) yang pada medium tumbuh akan membentuk koloni menyerupai ragi. Di alam, dua basidiospora yang berkecambah akan menyatu membentuk hifa-hifa infeksi (*infection hyphae*), namun biasanya hanya bagian tanaman tertentu saja yang rentan terhadap infeksi, misalnya bunga dan ovary.

Sistem klasifikasi yang baru mengakibatkan adanya perubahan nama, yaitu:

- Sporisorium, yaitu cendawan gosong terbatas pada rerumputan dan menampung beberapa spesies yang sebelumnya termasuk ke dalam genus yang berbeda, termasuk *Sphacelotheca* dan *Sorosporium*.
- Sphacelotheca, yaitu cendawan gosong yang menyerang tanaman dari famili Polygonaceae dan saat ini dimasukkan ke dalam klas Urediniomycetes (terdiri dari cendawan-cendawan karat).
- Sorosporium, yaitu cendawan gosong yang menyerang bunga tanaman dari famili Caryophyllaceae.

- Ustilago, yaitu cendawan gosong yang menyerang rerumputan. Sedangkan spesies yang menyerang tanaman dikotil kebanyakan termasuk ke dalam genus *Microbotryum*, klas Urediniomycetes.

## 2. Identifikasi Bakteri

Bakteri adalah mikro-organisme prokaryotik, bersel satu, tidak memiliki klorofil dengan kemampuan berkembangbiak sangat cepat. Bakteri terdiri dari beraneka ragam jenis dan secara fisiologis berbeda satu sama lain, serta menempati bermacam ragam habitat. Namun demikian, bakteri lebih menyukai lingkungan yang hangat dan lembab sehingga banyak ditemukan di wilayah yang beriklim tropis, sub-tropis, termasuk di beberapa area yang temperaturnya hangat di wilayah temperate.

Kebanyakan bakteri dapat bertahan pada sisa-sisa tanaman, di tanah, pada biji dan pada tanaman yang masih hidup. Bakteri masuk ke dalam tanaman biasanya melalui luka dan lubang-lubang alami seperti stomata dan lentisel. Penyebaran bakteri dapat melalui material perbanyakan tanaman yang terinfeksi, cipratan air, serangan dan mesin-mesin pertanian.

Pada tahun 2002, jumlah genus bakteri yang sudah diketahui mencapai 1094, terdiri dari 5806 spesies. Sementara itu bakteri yang tergolong patogen tanaman mencakup 29 genus yang di dalamnya terdapat 132 spesies.

Dari 29 genus yang dikenal terdapat sejumlah genus yang sangat penting, antara lain *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Xanthomonas* dan *Xylella*. Selain itu, bakteri juga memiliki sifat khusus terhadap jenis (genus dan spesies) tanaman inang yang diserangnya, disebut sebagai patovar (*pathovar*). Sebagai contoh, *Pseudomonas syringae* memiliki lebih dari 40 jenis patovar, sedangkan *Xanthomonas campestris* memiliki lebih dari 123 patovar.

Sejumlah bakteri patogen tanaman juga dapat berperilaku sebagai epifit (*epiphyte*) sebelum memasuki fase patogenik. Kadangkala bakteri tidak langsung masuk ke dalam sel tanaman inang, hanya memperbanyak diri di ruang antar sel. Bakteri menghasilkan bahan-bahan sekresi diantaranya enzim, toksin, fitohormon dan polisakarida.

Diagnosis penyakit tanaman diakibatkan oleh bakteri dilakukan melalui pengujian, termasuk memperhatikan faktor penting lainnya. Adanya masa bakteri (ooze) dari pemeriksaan jaringan tanaman di bawah mikroskop merupakan indikator adanya infeksi bakteri.

Untuk mendapatkan koloni tunggal (*single colony*) dari suatu jenis bakteri yang diduga sebagai penyebab penyakit tanaman dilakukan dengan metode pengenceran (*dilution method*). Berdasarkan metode ini suspensi bakteri digoreskan (menggunakan loop) di atas medium agar. Dengan cara ini akan diperoleh biakan murni dari satu spesies bakteri untuk dilakukan pengujian lebih lanjut. Oleh sebab itu, medium yang digunakan harus sesuai bagi pertumbuhan bakteri.

Hal-hal yang perlu diperhatikan terhadap pertumbuhan koloni bakteri adalah bentuk, ukuran, tekstur, pola warna, elevasi, bentuk pinggiran, konsistensi, warna koloni, sifat tembus cahaya (*translucency*) atau tidak tembus cahaya (*opaqueness*) dan laju pertumbuhannya. Pembentukan pigmen, terjadinya presipitasi atau kristal pada medium juga perlu diperhatikan.

Metode identifikasi bakteri patogen tanaman mengalami perkembangan sejalan dengan perkembangan teknologi. Identifikasi dengan menggunakan kunci identifikasi (*dichotomous key*) sering digunakan pada masa permulaan metode identifikasi. Dewasa ini berbagai teknik identifikasi sudah dapat dilakukan terhadap bakteri patogen tanaman, termasuk

diantaranya analisis asam lemak (*fatty acid analysis*), tipe fagus (*phage-typing*), antibodi monoklonal (*monoclonal antibodies*) atau pengujian asam nukleat (*nucleic acid probe*).

### 3. Identifikasi Fitoplasma (*Phytoplasmas*)

Fitoplasma sebelumnya dikenal sebagai organisme menyerupai Mikoplasma (*Mycoplasma-like organism*), tergolong prokaryot, salah satu anggota kelas Mollikut (*Mollicutes*). Fitoplasma mirip dengan bakteri namun tidak memiliki dinding sel, dan hanya dapat hidup di dalam jaringan inang yang segar atau bersifat parasit obligat. Oleh sebab itu fitoplasma tidak dapat ditumbuhkan di atas medium tumbuh buatan.

Pada tanaman inang, fitoplasma dapat ditemukan di dalam jaringan pembuluh floem, dan kebanyakan ditularkan oleh serangga ordo Homoptera (*leaf-hopper* dan *plant-hopper*). Fitoplasma menyebabkan penyakit pada berbagai jenis tanaman. Gejala akibat infeksi fitoplasma antara lain diskolorasi, kerdil, mati bujang, daun-daun menjadi kecil (*little leaf*), sapu setan, fillodi, virescence dan pertumbuhan yang berlebihan (*gigantism*). Hingga saat ini terdapat beberapa metode digunakan untuk mengidentifikasi dan membedakan penyakit yang disebabkan oleh Fitoplasma, antara lain identifikasi berdasarkan gejala (*symptomology*), menurut kisaran inang, spesifikasi vektor dan pengamatan jaringan tanaman sakit di bawah mikroskop elektron (*transmission electron microscopy*), serta teknik pengujian berbasis DNA atau *polymerase chain reaction* (PCR).

### 4. Identifikasi Virus dan Viroid

Virus berukuran sangat kecil dan hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop elektron, bersifat parasit obligat. Tidak seperti cendawan dan bakteri yang tubuhnya tersusun atas sel atau berupa sel, maka virus hanya tersusun oleh selubung protein disebut *capsid* yang membungkus inti atau genom (RNA atau DNA). Sebagai parasit obligat, virus hanya dapat memperbanyak diri pada jaringan atau sel yang masih hidup, dengan memanipulasi informasi proses genetika tanaman inangnya. Dengan demikian sumber energi yang terkandung di dalam tanaman digunakan untuk memperbanyak jumlah virus bersangkutan. Adanya infeksi virus akan mengganggu fungsi-fungsi normal pada tanaman seperti fotosintesis dan pertumbuhan.

Serangga dengan tipe mulut menusuk-menghisap seperti kutu daun dan wereng merupakan vektor utama virus. Tanaman sebagai bahan perbanyakan yang terinfeksi virus juga merupakan medium penyebaran. Virus juga sering bertahan pada inang alternatif seperti gulma.

Berbeda dengan virus, maka viroid hanya terdiri dari molekul RNA tanpa pembungkus protein. Walaupun demikian, viroid juga mampu menginfeksi tanaman, memperbanyak diri dan menimbulkan penyakit pada inangnya. Viroid dapat ditularkan secara mekanik pada saat pemangkasan (*pruning*), melalui biji (*seed transmission*) dan melalui material vegetatif seperti penyambungan (*grafting*).

#### 4.1. Spesies Virus

Mengenal spesies virus tidak selalu berhubungan dengan spesimen seperti ditunjukkan oleh organisme seluler. Spesies virus sebagaimana diakui oleh the International Committee on Taxonomy of Viruses diidentifikasi berdasarkan adanya kombinasi yang unik dari beberapa karakter, yaitu:

- tanaman yang secara alami menjadi inang virus;
- gejala yang ditunjukkan oleh tanaman inang pada berbagai tahapan infeksi;
- cara penularan (kontak, biji, pollen, vektor);
- kisaran spesies tanaman inang yang rentan (*susceptible*) infeksi;

- bentuk partikel virus;
- karakter bio-kimia dari protein dan asam nukleat yang dimiliki oleh virus;
- membandingkan sekuen dan susunan gen dengan virus yang sudah diketahui;
- serologi.

Seringkali virus tidak bisa disimpan sebagai voucher spesimen. Hal tersebut disebabkan karena virus belum bisa disimpan dalam kondisi hidup (*viable*). Kebanyakan virus bersifat tidak stabil walaupun disimpan pada kondisi kering-beku. Namun demikian, dewasa ini sudah dikenal beberapa metode untuk menyimpan partikel virus untuk jangka waktu lama, termasuk kloning genom virus di dalam tubuh bakteri.

Berkaitan dengan hal tersebut, maka dokumentasi untuk sebagian besar virus penyebab penyakit tanaman tidak disimpan dalam bentuk spesimen, namun lebih berupa catatan atau deskripsi, foto, data hasil percobaan, hasil sekuen gen dan serologi.

Bentuk-bentuk partikel virus antara lain:

- ***rod-shaped viruses***

Partikel virus berbentuk batang, termasuk tobacco mosaic virus memiliki diameter 3-25 nm, dan panjang 150-2000 nm. Panjang pendeknya partikel tergantung pada panjang untai RNA. Partikel virus dapat lurus, bengkok atau melengkung. Partikel terdiri atas RNA dan sejumlah sub unit protein yang tersusun secara melingkar (heliks).

- ***Isometric viruses***

Partikel isometric virus dapat tunggal atau perpasangan dengan diameter 20-70 nm. Jika diamati di bawah mikroskop elektron, partikel virus nampak seperti struktur geometrik dengan icosahedral symmetry (terdiri dari 12 puncak dan 20 bidang segitiga) contohnya adalah cauliflower mosaic virus.

- ***Bacilliform viruses***

Virus-virus berbentuk basil, sama seperti bakteri bentuk basil dari genus *Bacillus*. Virus jenis ini ada yang memiliki selubung protein dan ada yang tidak. Contohnya adalah alfalfa mosaic virus dan sugarcane bacilliform virus.

Sampai saat ini sudah dikenal beberapa metode yang bisa digunakan untuk mengidentifikasi virus penyebab penyakit tanaman. Diantaranya adalah menggunakan tanaman indikator, khususnya untuk menguji daya infeksi dan mengetahui kisaran inang. Tanaman indikator akan menunjukkan gejala yang berlainan bila diinokulasi dengan virus yang berbeda. Walaupun demikian, berdasarkan gejala semata tidak cukup membantu dalam mengidentifikasi virus. Untuk mengatasi hal tersebut, pengujian laboratorium seperti uji serologi, menggunakan mikroskop elektron untuk melihat partikel dan analisis asam nukleat harus digunakan di dalam identifikasi.

#### 4.2. Gejala Disebabkan Virus

Terdapat dua macam gejala utama akibat infeksi virus pada tanaman. Pertama, adalah gejala yang ditunjukkan oleh sel tanaman akibat infeksi awal (*eglesions*); dan kedua, adalah gejala sekunder atau infeksi yang sifatnya sistemik (misalnya mosaic).

Gejala awal yang terjadi pada tempat dimana virus masuk ke sel tanaman disebut gejala lokal, seringkali berupa kumpulan sel-sel yang mulai rusak disebut lesio.

Ukuran lesio sangat bervariasi mulai dari berupa titik hingga berukuran besar. Selanjutnya lesio dapat berkembang menjadi klorotik atau bahkan nekrotik. Lesio biasanya terjadi setelah dilakukan inokulasi sap secara mekanis atau setelah serangga pembawa virus (seperti kutu daun) selesai melakukan kegiatan makan.

Dalam hal hubungan antara virus dengan tanaman inang, kadang kala virus tidak dapat menyebar lebih luas dari tempat terjadinya infeksi. Pada kondisi yang demikian maka gejala timbul hanya berupa lesio yang sifatnya lokal (*local lesion*) dan disebut reaksi hipersensitif.

Apabila virus mampu menyebar maka mereka akan menyebar di dalam mesofil daun, dan jika penyebarannya sampai pada sistem pembuluh (khususnya floem) selanjutnya virus akan menyebar dengan cepat ke seluruh bagian tanaman (sistemik).

Munculnya perubahan atau gejala yang dapat diamati terjadi setelah gejala sekunder atau gejala sistemik, misalnya klorosis dan layu, serta terjadinya perubahan internal ditunjukkan oleh struktur sel yang tidak normal yang hanya dapat diamati di bawah mikroskop cahaya atau mikroskop elektron.

Gejala mosaik muncul jika sel-sel tertentu dari jaringan tanaman yang terinfeksi virus (biasanya daun) mengalami diskolorasi, sedangkan bagian yang lainnya masih normal. Sel-sel yang terinfeksi biasanya berwarna hijau-pucat sebagai indikasi adanya penurunan jumlah klorofil. Ukuran dan pola mosaik bervariasi dan sangat tergantung kepada jenis tanamannya. Pada tanaman monokotiledon biasanya berbentuk garis-garis memanjang (*stripe* atau *strike*). Sedangkan pada tanaman dikotiledon gejala yang muncul bermacam-macam, antara lain motel/*mottle*, bintik-bintik klorotik/*chlorotic flecking*, bercak/*spot* dan lodoh/*blotching*.

Gejala menguning pada seluruh daun juga bisa terjadi akibat infeksi virus, sebagai akibat berkurangnya jumlah klorofil dan rusaknya kloroplas. Gejala seperti ini diakibatkan oleh virus seperti beet yellows virus dan barley yellow dwarf virus. Gejala menguning pertama kali terjadi pada area diantara pembuluh daun (*interveinal chlorotic*), sementara jaringan pembuluh tetap berwarna hijau. Sebaliknya virus-virus tertentu menimbulkan gejala yang berbeda, dimana gejala menguning justru terjadi pada pembuluh daun atau pembuluh daun menjadi berwarna pucat. Contohnya adalah penyakit lettuce big vein disease dan turnip mosaic virus.

Gejala bercak-cincin atau *ringspotting* adalah gejala yang terjadi apabila area yang terserang sifatnya terbatas dan berbentuk melingkar. Sel-sel yang terserang kemudian akan berubah menjadi klorotik dan nekrotik. Gejala bercak-cincin biasanya terjadi pada daun walaupun kadang-kadang dapat terjadi pada batang dan buah. Sebagai contoh tomato spotted wilt virus dan papaya ringspot virus.

Gejala nekrotik terjadi pada lesio yang sifatnya terbatas, yaitu di sekitar area dimana pada awal mula terjadi infeksi. Namun juga dapat bersifat sistemik sehingga gejala muncul pada bagian tanaman lainnya seperti buah, biji dan daun. Contohnya turnip mosaic virus yang menyebabkan nekrotik pada jaringan bagian dalam daun kubis.

Pertumbuhan terhambat atau kerdil (*stunting, dwarfing*) merupakan gejala umum akibat infeksi virus. Gejala kerdil seringkali muncul bersama-sama dengan gejala yang lain. Gejala kerdil bisa terjadi pada seluruh tanaman atau hanya pada bagian tertentu saja. Untuk mengetahui apakah tanaman terserang oleh virus kerdil atau tidak, sudah barang tentu harus membandingkannya dengan tanaman yang tumbuh normal.

Hanya dua jenis virus, yaitu bean common mosaic virus dan strawberry latent ringspot virus menyebabkan pertumbuhan abnormal berupa distorsi pada daun dan batang. Akibat infeksi kedua jenis virus, masing-masing bean common mosaic virus pada tanaman bean dan strawberry latent ringspot virus pada tanaman celery menyebabkan daun-daun berbentuk menyerupai tali (*strap-like symptom*). Pertumbuhan tidak normal tersebut disebabkan oleh ketidakseimbangan hormon yang terdapat pada daun. Bentuk gejala distorsi lainnya adalah terjadinya proliferasi sel (hiperplasia) seperti ditunjukkan oleh tanaman kakao yang terinfeksi cacao swollen shoot virus. Sedangkan gejala penurunan jumlah sel (hipoplasia) berupa gejala stem pitting ditunjukkan oleh tanaman jeruk yang terinfeksi citrus tristeza virus.

Beberapa jenis virus menimbulkan gejala berupa tumor atau enasi pada daun atau akar. Gejala enasi pada daun menyerupai kudis yang terjadi pada permukaan atas maupun permukaan bagian bawah. Sebagai contoh adalah enasi pada tanaman pea disebabkan oleh pea enation mosaic virus. Terjadinya tumor maupun enasi juga disebabkan oleh ketidakseimbangan kandungan hormon di dalam daun.

Gejala dalam bentuk pecahnya warna seperti yang terjadi pada bunga tulip merupakan catatan pertama berkaitan adanya infeksi virus pada tanaman. Gejala seperti ini disebabkan oleh tulip mosaic virus, menghasilkan munculnya variasi warna pada bunga tulip. Berbeda dengan dampak yang terjadi pada jenis tanaman lainnya, umbi tanaman tulip yang terinfeksi tulip mosaic virus justru menjadi lebih mahal harganya dibandingkan dengan umbi normal.

Infeksi virus pada tanaman juga dapat mengakibatkan perubahan pada buah. Gejala yang bisa diamati antara lain menurunnya kemampuan menghasilkan buah, buah menjadi lebih kecil dan terjadi perubahan bentuk seperti yang terjadi pada buah ketimun yang terinfeksi cucumber mosaic virus. Sedangkan infeksi lettuce mosaic virus menyebabkan penurunan jumlah biji dan menyebabkan serbuk sari (pollen) yang dihasilkan menjadi steril.

Virus juga dapat menimbulkan gejala spesifik di dalam sel-sel tanaman inangnya. Salah satunya adalah merangsang terbentuknya struktur yang disebut *inclusion bodies*. Banyak jenis virus menyebabkan perubahan di dalam kloroplas yang kemudian menimbulkan terjadinya degradasi bio-kimia dan degradasi struktur, seperti terjadi perubahan warna dan perubahan bentuk. Perubahan lain yang terjadi pada sel adalah peningkatan atau penurunan jumlah sel, terjadi nekrotik di dalam sel, terbentuk lignifikasi pada silem (xylem) dan kematian sel-sel pembuluh silem.

Seringkali tanaman tidak menunjukkan gejala walaupun telah terinfeksi oleh virus. Dengan tidak menunjukkan gejala bukan berarti tanaman bebas dari infeksi virus. Virus dapat menginfeksi tanaman dan memperbanyak partikelnya di dalam jaringan tanaman tanpa menunjukkan gejala penyakit yang nyata (infeksi laten).

Gejala penyakit akibat infeksi virus sering berjalan lambat pada temperatur yang agak tinggi. Hal tersebut dikarenakan oleh lambatnya proses perbanyakan partikel virus. Walaupun demikian, temperatur yang relatif tinggi juga dapat menurunkan resistensi tanaman terhadap infeksi virus, dan apabila terjadi penurunan temperatur maka virus akan berkembang dengan cepat. Tanaman yang memperoleh intensitas cahaya tinggi menjadi lebih tidak peka terhadap infeksi. Sebaliknya tanaman yang mendapat sedikit intensitas cahaya menjadi lebih rentan terhadap infeksi virus.

Kandungan hara/nutrisi tanah juga dapat mempengaruhi perkembangan penyakit. Tanaman yang tumbuh pada tanah yang kaya unsur hara seperti nitrogen menyebabkan tanaman menjadi lebih rentan terhadap infeksi virus.

## **5. Identifikasi Nematoda**

Sudah sejak lama metode identifikasi nematoda dilakukan dengan cara membandingkan fitur morfologi nematoda dengan deskripsi yang sudah dipublikasikan, dan seringkali menggunakan bantuan kunci identifikasi. Oleh sebab itu, nematoda yang akan diidentifikasi harus diawetkan dan dibuat preparat untuk diobservasi dan diukur di bawah mikroskop. Agar identifikasi memenuhi tingkat kepercayaan yang memadai maka dibutuhkan sekurang-kurangnya 5 – 10 ekor nematoda betina dewasa, termasuk nematoda jantan. Hal tersebut dikarenakan pengenalan fitur biasanya dibuat secara kuantitatif (seperti: panjang badan, panjang stilet, dsb) dan juga disebabkan adanya variasi intraspesifik.

Dalam banyak hal, identifikasi nematoda parasit tumbuhan hingga tingkat genus biasanya didasarkan kepada fitur morfologi secara umum, ditambahkan dengan pengetahuan tentang tanaman inang dan fauna nematoda dimana dia diambil. Namun demikian, beberapa jenis nematoda sangat sulit diidentifikasi sekalipun oleh ahli di bidang morfologi dan morfometrikenya. Itulah sebabnya, identifikasi nematoda dimasa yang akan datang diarahkan kepada metode molekuler dan pengujian berbasis bio-kimia. Sekuen DNA menjadi persyaratan dalam penentuan spesies dari beberapa genus nematoda dewasa ini. Berdasarkan chemotaxonomic, dibuktikan adanya spesies yang bersifat kriptik, yaitu spesies-spesies yang secara morfologi tidak dapat dibedakan satu sama lain.

### **5.1. Pentingnya Identifikasi**

Pendekatan dan tingkat keahlian yang dibutuhkan dalam identifikasi nematoda tergantung pada tujuannya. Spesimen-spesimen yang akan disimpan sebagai koleksi sebaiknya sudah dideterminasi atau dikonfirmasi oleh taksonomis yang berpengalaman. Akan tetapi perlu diketahui bahwa beberapa jenis nematoda sangat sulit diidentifikasi walaupun oleh taksonomis yang berpengalaman sekalipun.

Untuk tujuan pemantauan (survei), pendekatan taksonomis hanya diperlukan untuk spesies-spesies yang baru atau spesies yang selama ini belum diidentifikasi. Jika ada temuan baru sebaiknya dibuat spesimen koleksi sebagai bahan untuk dilakukan uji ulang. Jika identifikasi dilakukan dalam rangka kepentingan karantina atau kepentingan perdagangan, disarankan agar konfirmasi dilakukan oleh pihak yang independen.

Untuk tujuan kajian ekologi atau pengelolaan maka dibutuhkan spesimen yang masih hidup dengan memperhatikan fauna setempat dan tanaman inangnya. Dalam kondisi seperti ini, konfirmasi oleh taksonomis tetap dianjurkan untuk memperkuat hasil kajian, walaupun seringkali terbatas hingga tingkat genera.

### **5.2. Mengenal Nematoda Parasit Tumbuhan**

Nematoda parasit tumbuhan dapat dibedakan dengan spesies lain, yaitu nematoda-nematoda pemakan substrat selain tumbuhan. Nematoda parasitik tumbuhan memiliki stilet, yaitu alat untuk menghisap cairan sel tumbuhan yang terdapat di dalam rongga mulutnya, sedangkan nematoda non parasitik biasanya tidak memiliki stilet. Walaupun demikian, beberapa jenis nematoda pemakan cendawan, alga, liken dan nematoda predator juga memiliki stilet. Bentuk tubuh akibat interaksi dengan tanaman inangnya juga menjadi pertimbangan untuk memastikan apakah nematoda bersangkutan merupakan genus pemakan tumbuhan.

### 5.3. Identifikasi Spesies

#### **Identifikasi Berdasarkan Morfologi**

Identifikasi nematoda secara morfologi didasarkan pada bentuk, ada tidaknya dan jumlah fitur anatomi termasuk seksual dimorfisme (*sexual dimorphism*), ukuran dan nisbah pengukuran bagian-bagian tubuh (*morphometric*). Untuk mendiagnosis genus dan spesies digunakan kunci identifikasi dan deskripsi.

#### **Identifikasi Berdasarkan Molekuler dan Biokimia**

Sequencing DNA berupa pengujian fragmen DNA dan sejenisnya telah dikembangkan dalam identifikasi dan diagnosis. Namun demikian, pengujian dengan metode ini masih terbatas pada spesies tertentu saja, dan dalam hal adanya variasi intraspesifik masih perlu dilakukan validasi. Bagaimanapun penggunaan metode ini sangat membantu mempercepat identifikasi.

Metode identifikasi lain yang bisa dilakukan adalah melalui taksonomi kimia (chemotaxonomic), termasuk analisis isozim, profil protein dan uji serologi. Sebagai contoh, untuk membedakan spesies diantara nematoda puru akar digunakan metode analisis isozim, karena identifikasi secara morfologi masih menimbulkan keraguan.

Hanya saja identifikasi dengan pendekatan DNA dan kimia dibutuhkan peralatan yang memadai serta taksonomis dengan pengetahuan yang mencukupi.

## 6. Teknik Diagnosis

### 6.1. Mikroskop Elektron/Scanning Electron Microscopy (SEM)

Tidak seperti mikroskop cahaya biasa, mikroskop elektron menggunakan elektron untuk memperbesar objek yang diamati. Mikroskop elektron memiliki resolusi jauh lebih besar dibandingkan dengan mikroskop cahaya. Hal tersebut disebabkan karena panjang gelombang elektron hampir 100.000 kali lebih pendek dibanding dengan panjang gelombang cahaya. Mikroskop elektron sangat berguna untuk mengamati struktur permukaan dari objek yang sangat kecil, misalnya permukaan spora cendawan.

Resolusi mikroskop elektron adalah 3-6 nm, sedangkan mikroskop cahaya biasa hanya 0,2  $\mu\text{m}$ , atau setara dengan 200 nm. Dengan demikian kemampuan perbesaran mikroskop elektron kurang lebih 100 kali lebih kuat dibandingkan dengan mikroskop cahaya.

Mikroskop elektron menggunakan cahaya elektron untuk memperjelas objek pengamatan dan memberikan gambar tiga dimensi. Elektron berukuran sangat kecil dan dengan mudah dapat dibelokkan oleh molekul gas di udara. Oleh sebab itu, agar elektron dapat mencapai objek yang diamati maka objek harus diletakkan di dalam ruang kedap udara atau ruang vakum.

Untuk mempertahankan/mengawetkan struktur biologi sampel di dalam kondisi vakum, sampel harus dikeringkan dengan sangat hati-hati menggunakan karbondioksida cair di dalam mesin yang disebut *critical point dryer*. Sampel biasanya diletakkan pada potongan logam menggunakan alat khusus yaitu *double-sided tape (carbon tabs)*, kemudian dilapis dengan lapisan logam sangat tipis, misalnya emas agar dapat menghantarkan listrik. Untuk mengamati spora cendawan karat atau gosong yang berdinding tebal, *critically point dried* tidak perlu dilakukan sehingga pelapisan logam dapat langsung dilakukan.

## 6.2. Teknik Biokimia dan Molekuler

Ada kalanya tanaman tidak menunjukkan gejala infeksi suatu patogen. Kondisi seperti ini bukan berarti bahwa tanaman tersebut benar-benar bebas dari patogen. Untuk membuktikan apakah tanaman bebas dari patogen maka perlu dilakukan pengujian, antara lain dengan menggunakan teknik uji biokimia atau uji molekuler. Indeksing merupakan istilah yang digunakan bagi pengujian suatu patogen, khususnya virus pada suatu tanaman. Dengan indeksing memungkinkan pengendalian dapat dengan cepat dilakukan sehingga akan mengurangi kemungkinan terjadinya endemi. Indeksing juga sangat diperlukan bagi karantina didalam menyusun strategi untuk menjaga agar negara tetap bebas dari OPT asing, serta di dalam penerapan prosedur sertifikasi dalam upaya memperoleh tanaman atau bibit tanaman yang bebas OPT.

## 6.3. Serologi/Immunologi

Dalam uji serologi, keberadaan antigen suatu patogen dapat didiagnosis dengan menggunakan spesifik antibodi. Antibodi dapat bersifat polyclonal (beberapa jenis antibodi dipanen dari darah hewan yang sudah disuntik dengan ekstrak suatu patogen), atau monoclonal (satu jenis antibodi yang diambil dari limpa hewan kemudian diperbanyak dengan metode kultur jaringan).

Salah satu uji serologi yang sangat umum dilakukan dalam mendiagnosis suatu patogen adalah dengan pengujian enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Dengan cara ini antibodi dilekatkan di dasar microtitre plate (micro plate). Diagnosis suatu patogen dilakukan dengan memasukan cairan yang diuji ke setiap lubang plate. Apabila cairan mengandung patogen, maka antigen patogen akan mengikat anti bodi. Setelah dilakukan pencucian maka ke dalam lubang dimasukan enzyme conjugated antibodi dan dibiarkan beberapa lama. Selanjutnya micro plate dicuci kembali dan terakhir dimasukan bahan enzim. Apabila cairan yang diuji benar-benar mengandung antigen, ikatan enzim-antibodi akan mengkatalisasi substrat kromogenik (*chromogenic substrat*) dan menghasilkan warna spesifik sebagai indikasi ada atau tidak adanya patogen pada bahan yang diuji.

Untuk menghasilkan antibodi dibutuhkan waktu beberapa minggu. Walaupun demikian, pengujian dengan teknik ELISA memiliki beberapa keunggulan, diantaranya:

- Antibodi dapat bertahan lama jika disimpan dengan benar,
- Pengujian dan hasilnya dapat diperoleh dengan cepat,
- Pengujian dapat dilakukan di laboratorium atau di lapangan.

## 6.4. Metode Berbasis Asam Nukleat (Nucleic Acid-Based Method)

Walaupun gen yang sama bisa dimiliki oleh berbagai organisme, namun gen-gen dengan fungsi yang sama sekalipun akan berbeda-beda urutannya (*sequence*) antara satu takson dengan takson yang lain. Variasi gen tersebut dapat dieksploitasi dalam diagnosis menggunakan teknik hibridisasi asam nukleat dan reaksi rantai polimerase (PCR). Dengan teknik molekuler modern yang sangat sensitif maka pada kondisi yang ideal asam nukleat dapat dianalisis dan kuantitas pikogram DNA dapat dideteksi.

Kekhususan proses dalam PCR antara lain meliputi pemanasan campuran DNA, penstabilan polimerase DNA, primer DNA dan dNTPs di dalam buffer yang sesuai pada suhu lebih dari 90°C sehingga DNA terdenaturasi. Proses selanjutnya diikuti dengan penurunan temperatur pada kira-kira 50-60°C untuk menguatkan primer dalam memisahkan untaian DNA. Selanjutnya suhu dinaikan kembali sampai 72°C agar terjadi polimerasi, yaitu proses untuk memperbanyak terbentuknya untaian DNA hingga melampaui jumlah primer DNA. Setelah satu siklus denaturasi, penguatan (*annealing*) dan ekstensi maka jumlah DNA menjadi berlipat ganda, sehingga pada

siklus yang ketiga puluh dapat dengan mudah divisualisasikan dengan gel agarose menggunakan bahan pewarna etidium bromida.

Dengan metode berbasis asam nukleat diagnosis bisa dilakukan dengan cepat dengan tingkat sensitifitas melebihi teknik imunologi. Beberapa kelemahan yang terdapat pada metode ini antara lain diperlukan fasilitas, reagen dan peralatan yang mahal, hasil yang diperoleh tidak setegas uji serologi, serta akan sangat bermasalah jika terjadi kontaminasi.

## VII. Memelihara Catatan Spesimen (Specimen Records)

### 1. Database

Memasukkan catatan spesimen ke dalam *database* adalah penting, karena dengan cara tersebut informasi dengan cepat bisa diperoleh tanpa harus melihat fisik spesimen. Setiap data disimpan dan diorganisasikan sedemikian rupa sehingga memudahkan pencarian untuk selanjutnya dianalisis dan diperbaharui jika diperlukan.

Informasi yang disimpan di dalam *database* dapat juga digunakan untuk memetakan distribusi patogen tanaman, dan hal tersebut diperlukan dalam penyusunan analisis risiko OPT (AROPT). *Database* dapat dibuat sederhana, yaitu berupa tabel-tabel terpisah dalam program Excel, atau dengan cara yang lebih sempurna, misalnya Microsoft Access, Oracle, BioLink atau KE Emu. Program tersebut memungkinkan bagi pengelola multimedia (seperti digital image dan *featur built-in reporting tools*) melakukan perubahan informasi dengan cepat.

Pada skala nasional, *database* spesimen yang berada pada lembaga atau instansi yang berbeda dapat dihubungkan dengan sistem yang berbasis jejaring (*web-based system*). Sedangkan pada skala internasional Fasilitas Informasi Keanekaragaman Global (*Global Biodiversity Information Facility/GBIF*) menyediakan fasilitas *database* tentang keanekaragaman yang bisa di akses melalui internet.

## VIII. Memelihara Koleksi

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pemeliharaan koleksi adalah sebagai berikut :

### 1. Fasilitas Herbarium

Fasilitas herbarium harus dibangun secara permanen dan aman digunakan sebagai tempat menyimpan spesimen. Disamping itu, bangunan juga harus kedap serangga, tahan api dan kedap air. Herbarium berukuran sedang luasnya kira-kira 9 m<sup>2</sup> dan mampu menampung 50.000 spesimen. Tempat penyimpanan dan rak-rak sebaiknya dibuat dari logam karena lebih tahan terhadap serangan serangga dibandingkan tempat yang dibuat dari kayu.

Herbarium sebaiknya disimpan di dalam ruangan yang dapat dikendalikan, yaitu pada suhu 20-23°C dengan tingkat kelembaban 40-60%. Dengan cara demikian kerusakan yang disebabkan oleh serangga perusak dapat dihindari. Sebaiknya ruangan dilengkapi dengan *Air Conditioner* (AC) dan *Dehumidifier* sehingga temperatur dan kelembaban bisa dikendalikan. Pintu dan jendela sebaiknya tetap dalam kondisi tertutup untuk mencegah serangga masuk. Film pemantul cahaya dapat dipasang pada kaca jendela untuk mengurangi panas.

### 2. Pengendalian Serangga Perusak

Daerah tropik dengan kondisi temperatur dan kelembaban tinggi sangat sesuai untuk perkembangan serangga perusak. Beberapa jenis serangga khususnya kumbang herbarium akan memakan material tanaman yang sudah dikeringkan dan dengan cepat merusak koleksi herbarium. Kerusakan yang disebabkan oleh serangga dapat dihindari yaitu dengan cara mendinginkan terlebih dahulu pada temperatur -20°C atau dibawahnya (deep freezing) selama paling sedikit tujuh hari. Sedangkan spesimen yang sudah ada harus didinginkan secara periodik. Dalam proses pendinginan, spesimen agar dibungkus dengan kantong plastik atau diletakkan di dalam kotak styrofoam dan ditutup rapat untuk menghindari terjadinya kondensasi selama didinginkan. Setelah pendinginan, spesimen sebaiknya diletakkan di dalam ruang ber AC sehingga kenaikan suhu dapat berjalan secara bertahap menyesuaikan suhu ruangan.

Spesimen tanaman yang masih segar yang akan didiagnosis sebaiknya tidak disimpan berdekatan dengan herbarium, dan idealnya diuji pada tempat yang jauh dari koleksi herbarium. Spesimen-spesimen yang dipindahkan dari ruangan (untuk pengujian atau spesimen bantuan) agar didinginkan terlebih dahulu sebelum dikembalikan pada tempatnya semula.

Jika dipandang perlu, spesimen juga harus difumigasi, misalnya sekali dalam satu tahun. Fumigasi harus menggunakan fumigan yang diperbolehkan, seperti methyl bromide, carbon bisulphide, carbon tetrachloride, ethylene dichloride, hydrocyanic gas, lindane, dichlorvos strip atau paradichlorobenzene. Diperlukan kehati-hatian dalam melakukan fumigasi karena sebagian fumigan sangat berbahaya dan sebagian sangat mudah terbakar. Walaupun demikian, fumigasi semata tidak memberikan hasil yang memuaskan, karena telur dan pupa serangga sering tidak mati oleh fumigan.

### 3. Pengendalian Tungau

Tungau seringkali menimbulkan masalah bagi koleksi biakan hidup cendawan. Tungau pemakan cendawan biasanya terbawa ke dalam laboratorium melalui material tanaman segar, sepatu atau pakaian, melalui serangga dan biakan cendawan yang berasal dari laboratorium lain. Tungau tidak hanya memakan biakan cendawan, tetapi juga sering

membawa spora cendawan lainnya atau bakteri pada tubuhnya atau terbawa melalui saluran pencernaan makanannya sehingga dapat mengkontaminasi biakan.

Tungau seringkali menimbulkan masalah di laboratorium karena dengan cepat berpindah dari satu tempat ke tempat lainnya (dari Petridish ke Petridish), dari inkubator, meja dan lain sebagainya. Dengan demikian kontaminasi biakan dapat mudah terjadi.

Beberapa tindakan yang dilakukan untuk mencegah berkembangnya tungau di laboratorium atau di herbarium adalah dengan menjaga kebersihan, diantaranya:

- Pemeriksaan terhadap biakan untuk mengetahui adanya tungau. Jika biakan akan dipertahankan maka lakukan pembiakan ulang dan biakan aslinya diautoclave sebelum dibuang.
- Biakan yang sudah murni harus diletakkan di dalam inkubator yang berbeda atau terpisah dengan biakan baru atau biakan yang belum murni.
- Biakan yang sudah tua dan sisa-sisa material tanaman agar segera dimusnahkan (diautoclave).
- Membersihkan dengan cara mengelap seluruh permukaan dan bagian dalam alat dengan alkohol 70% secara reguler atau satu minggu sekali.
- Biakan agar selalu dibungkus dengan plastik film. Namun perlu diingat bahwa kadang kala tungau masih bisa menembus pembungkus plastik.
- Musnahkan biakan yang terinfestasi atau terkontaminasi dengan mengautoclave. Jika biakan sangat berharga dan tidak dapat diganti maka lakukan pendinginan (*freezing*) selama 24 jam untuk membunuh induk dan telur tungau, kemudian dibuat biakan yang baru, sedangkan biakan aslinya dimusnahkan. Perlu diperhatikan bahwa beberapa jenis cendawan akan mati pada suhu terlalu dingin.

#### **4. Spesimen Herbarium Pinjaman (*Loans*)**

Peminjaman spesimen dapat dilakukan untuk kepentingan penelitian ilmiah, spesimen herbarium biasanya dapat dipinjamkan dalam jangka pendek. Walaupun demikian, protokol harus dibuat untuk menjaga dan menjamin keselamatan dan keamanan spesimen. Sangat dianjurkan agar spesimen hanya dipinjam dari herbarium dimana keselamatan dan keamanan transportasi dan penyimpanan dapat dijamin. Permohonan peminjaman terhadap seluruh atau sebagian spesimen dapat ditolak apabila menurut pandangan kuratornya peminjaman tersebut dapat merusak spesimen atau tidak sesuai dengan program penelitian yang diajukan atau akan disalahgunakan.

Spesimen yang dikirim antar negara biasanya wajib dikenakan perlakuan karantina di tempat pemasukan. Perlakuan dimaksud dapat berupa perlakuan panas, fumigasi dan irradiasi sinar gamma. Perlakuan semacam ini dapat mengakibatkan kerusakan atau akan mempengaruhi DNANYA. Oleh sebab itu menjadi tanggung jawab kurator bahwa setiap tindakan yang dikenakan terhadap spesimen yang dipinjam tidak akan merusak serta menjamin spesimen dipelihara dengan baik. Apabila timbul keraguan bagaimana perlakuan akan diaplikasikan atau apakah perlakuan karantina akan merusak spesimen maka sebaiknya peminjaman dibatalkan.

Lama waktu peminjaman spesimen yang normal biasanya antara 6 dan 12 bulan, namun kadang kala bisa diperpanjang sesuai permohonan. Pihak yang meminjamkan sebaiknya meminta kepada peminjam agar spesimen yang dipinjam dapat dikembalikan sesegera mungkin setelah kajian selesai dilaksanakan.

Spesimen yang dipinjamkan harus disimpan dalam kondisi aman. Kemasan sebaiknya tidak dilekuk atau dilipat atau ditangani dengan cara yang tidak semestinya sehingga menyebabkan kerusakan.

Tidak dibenarkan untuk mengekstrak atau mengambil bagian dari spesimen pinjaman yang bisa menyebabkan kerusakan permanen, atau meminjamkan kepada pihak lain (pihak ketiga) tanpa ijin tertulis dari kuratornya. Namun demikian pengambilan sebagian kecil dari spesimen dan ekstraksi DNA untuk keperluan penelitian biasanya diperbolehkan. Pemotongan atau ekstraksi harus dilakukan dengan hati-hati sehingga tidak merusak spesimen secara keseluruhan.

Berikut ini beberapa informasi/cataatan yang diperlukan dalam peminjaman spesimen. Lembar salinan dari catatan peminjaman harus disertakan pada material herbarium yang dipinjam dan duplikatnya harus disimpan.

- Nomor peminjaman
- Nama dan alamat lengkap peminjam
- Maksud peminjaman
- Tanggal mulai peminjaman dan tanggal pengembalian
- Objek yang dipinjamkan (nama-nama spesimen yang dipinjamkan)
- Kondisi spesimen pada saat peminjaman

## **5. Keamanan**

Terdapat dua aspek terkait dengan keamanan koleksi. Pertama, berkaitan dengan keamanan fisik spesimen, dan kedua, berkaitan dengan etika dan tanggung jawab.

### **5.1. Keamanan Fisik**

Demi menjaga keamanan fisik spesimen, dianjurkan agar spesimen tidak dibuka di tempat umum. Spesimen harus disimpan di dalam bangunan yang kuat dan tahan terhadap pengaruh lingkungan (iklim), lebih disukai jika dilengkapi dengan sistem pengamanan yang baik.

### **5.2. Etika dan Tanggung Jawab**

Setiap institusi pengelola spesimen yang memiliki nilai bagi komunitas ilmuwan dituntut mempunyai etika dan tanggung jawab, untuk memastikan bahwa koleksi yang berada di tangannya benar-benar terlindungi, aman dan dijaga. Penggunaan yang tidak berbasis keilmuan agar dibatasi. Koleksi juga harus dijaga dari kondisi lingkungan yang buruk dan penanganan yang tidak benar, dalam rangka melindungi spesimen di masa sekarang dan yang akan datang.

Institusi yang bertanggung jawab terhadap koleksi harus membuat kebijakan dan prosedur, membuat kerangka kerja secara tertulis berkaitan pengelolaan koleksi, pemeliharaan dan penggunaannya. Oleh sebab itu, institusi juga harus memiliki tenaga teknik yang berkualitas (qualified), staf yang profesional, menyediakan anggaran, ruang dan peralatan yang memadai yang diperlukan dalam penanganan dan dokumentasi jangka panjang. Koleksi penyakit yang memiliki nilai ilmiah sebaiknya dilindungi oleh pemerintah melalui legislasi