

PEMANFAATAN BAKTERIOFAG UNTUK PENGEMBANGAN KIT DETEKSI BAKTERI PENYEBAB HAWAR BAKTERI PADA KEDELAI

Moh. Miftah Farid.MS^(1,*), Galih Susianto⁽¹⁾, Nurul Rama Dhany⁽¹⁾, Norita Fatatik Azizi⁽¹⁾, Sela Reza Resita⁽¹⁾

¹Agroteknologi, Pertanian, Universitas Jember
Email:Farid_manu29@yahoo.co.id

Abstract

Bacterial leaf blight disease is one of the important soybean disease caused by Pseudomonas syringae that causes about 20% of yield loss. Bacteriophages can be used for therapy to human, animal, and plant against some bacterial pathogens. Due to the specificity of the target bacteria, bacteriophages can be beneficial for detection of the target bacteria. This research was conducted to obtain the particles of bacteriophage, to study their hosts range against several bacterial strains and to formulate a detection kit of bacterial leaf blight. Isolation of bacteria and bacteriophage was obtained from the soybean field and formulation of bacteriophage for detection kit was done on Laboratory of Virology. The results showed that there were 11 isolates of Pseudomonas syringae, 3 particles of bacteriophage (ϕ GH1, ϕ GH2 and ϕ GH3), and detector paper kit. The result also showed that the composition of the detector materials (Talk, CMC, pH indicators) affect the quality of the kit.

Keywords: bacteriophages, bacterial leaf blight, Pseudomonas syringae, Detector

1. PENDAHULUAN

Usaha peningkatan produktivitas kedelai nasional merupakan salah satu upaya dalam program ketahanan pangan melalui swasembada kedelai, upaya ini merupakan serangkaian tahapan panjang yang telah dan sedang dilakukan mulai dari pemerintah maupun petani (Hifni and Mihadja, 1994). Namun didalam upaya swasembada kedelai ini serangan penyebab penyakit tumbuhan kedelai berdampak kurang optimalnya upaya tersebut, dan diantara patogen-patogen tanaman kedelai salah satunya ialah *Pseudomonas syringae* yaitu penyebab penyakit hawar bakteri (Daft and Leben, 1972).

Serangan *P. syringae* dapat menyebabkan kehilangan panen di Indonesia hingga 65,88 % (Tantera, 1992). Hal tersebut dapat dipahami karena patogen tersebut mampu menyerang batang, daun dan polong kedelai, pengendalian yang dianggap paling efektif didalam mengendalikan patogen ini ialah pestisida kimia maupun antibiotik (Amusa and Odunbaku, 2007). Namun, upaya tersebut masih memberikan dampak negatif yang diketahui berbahaya bagi lingkungan, hewan ternak dan manusia (Sarnaik *et al.*, 2006),

selain itu menurut Rosenberger (2003) beberapa faktor penyebab kegagalan upaya pengendalian patogen tumbuhan di lapangan adalah ketidaksesuaian antara strategi pengendalian yang diterapkan dengan keberadaan patogen target, untuk mengatasi hal tersebut diperlukan upaya diagnosa yang cepat dan tepat sebagai langkah efektif penentuan startegi pengendalian (Ward *et al.*, 2005)

Teknik PCR (Polymerase Chain Reaction) masih merupakan teknik identifikasi yang dianggap paling cepat di Indonesia (Suharsono, 2000). Ada juga identifikasi seperti pengujian bioassays, penggunaan media semi selektif, analisa asam lemak patogen, pengamatan mikroskop immunofluorescence, ELISA (Elphinstone *et al.*, 1996; Van der Wolf *et al.*, 2000; Weller *et al.*, 2000). Meskipun akurat dan cepat, namun secara teknik maupun peralatan, metode-metode tersebut kurang efektif diterapkan di Indonesia khususnya bagi para pelaku pertanian dikarenakan memakan waktu lama, mahal, diperlukan tenaga ahli khusus, bahkan keterbatasan ketersediaan peralatan penunjang yang ada (Lievens *et al.*, 2005). Namun saat ini telah dimulai penelitian

dengan menggunakan bakteriofag untuk mendeteksi suatu patogen penyebab penyakit dengan memanfaatkan sifat kespesifikannya dengan hasil yang akurat, cepat, efisien, murah, dan tidak memerlukan tenaga yang ahli.

Bakteriofag virus ini sangat spesifik terhadap spesies dan strain bakteri targetnya (Hagens and Loessner, 2007). Sebagai contoh, bakteriofag yang menginfeksi bakteri *Ralstonia solanacearum* (Addy *et al.*, 2012) tidak mampu menginfeksi bakteri *Xanthomonas campestris*. Bahkan bakteriofag yang menginfeksi *P. aeruginosa* tidak mampu menginfeksi bakteri *P. fluorescens* (Morello *et al.*, 2011). Oleh karena kespesifikan ini, bakteriofag banyak digunakan dalam proses identifikasi.

Layaknya virus lainnya, bakteriofag juga mempunyai penyusun yang serupa berupa mantel protein dan asam nukleat, yang berupa ssRNA, dsDNA dan dsRNA (ss: untai tunggal, ds: untai ganda), bentuk untaian asam nukleat tersebut umumnya linier, circular maupun segmented. Dilihat dari perilaku bakteriofag, beberapa bakteriofag dapat menyisipkan asam nukleatnya dengan asam nukleat bakteri inang dan dapat juga langsung menyebabkan lisisnya bakteri inang dengan menghasilkan beberapa enzim yang berperan dalam pelisisan tersebut. Enzim ini disebut dengan enzim endolisin (Addy, 2011)

Pembuatan kit deteksi dan formulasi agensia pengendali hayati patogen tumbuhan berbasis bakteriofag merupakan sebuah teknologi baru dibidang penyakit tumbuhan di Indonesia. Keberhasilan dari pengembangan teknologi tersebut dapat dikembangkan untuk deteksi bakteri patogen lainnya yang efektif, cepat dan ramah lingkungan. Di samping itu, penelitian ini diharapkan menjadi cikal bakal munculnya teknologi diagnosa yang sederhana, mudah dikembangkan dan tidak berbahaya bagi lingkungan dan yang terpenting adalah ketersediaan, mobilitas dan operasional dari teknologi ini dapat digunakan langsung oleh stakeholder.

2. METODE

Isolasi, perbanyakan dan purifikasi bakteri dan bakteriofag

Strain bakteri dan kondisi kultur. Isolat bakteri *P. syringae* diperoleh dari

koleksi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Jember serta dilakukan isolasi dari daerah sentra budidaya kedelai di Jember. Isolat bakteri ditumbuhkan pada media King's B (KB) (King *et al.*, 1954) dan diperbanyak pada media Nutrient Broth (NB). Massa bakteri (koloni) yang tumbuh pada medium King's B dan berpendar fluor jika diamati di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 365 nm dipilih untuk pengujian.

Sumber bakteriofag. Sumber bakteriofag diperoleh dari selokan irigasi pertanian kedelai di Jember, Jawa Timur. Sebanyak satu mililiter air selokan irigasi selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit pada 4500×g. Selanjutnya, supernatan di ambil dan difiltrasi menggunakan filter membran dengan kerapatan pori 0.45 µm (Steradisc, Krabo Co.). Sebanyak 100 µl filtrat diambil dan digunakan pada plaque assay dengan *P. syringae* sebagai bakteri targetnya pada medium Nutrient Agar (NA) (Schaad *et al.*, 2001).

Plaque Assay. Pengujian ini dilakukan untuk memperoleh isolat bakteriofag yang spesifik menginfeksi *P. syringae*. Plaque assay dilakukan mengikuti Askora *et al.* (2009) dengan cara menambahkan 100 µl suspensi filtrat yang diduga mengandung bakteriofag ke dalam 250 µl suspensi bakteri *P. syringae* yang berumur 24 jam dan diinkubasikan selama 2 jam pada suhu ruang. Selanjutnya suspensi tersebut dicampurkan dengan media Top Agar (0.45% media NA) yang masih hangat (suhu sekitar 50°C) lalu dituang pada media permukaan media NA dalam cawan Petri dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24-48 jam. Pengamatan terbentuknya *plaque* (zona bening pada pada kultur bakteri) dilakukan untuk memastikan keberadaan bakteriofag.

Purifikasi bakteriofag. Bakteriofag (hasil *plaque assay*) dipropagasikan dan dimurnikan dari *plaque* tunggal pada biakan bakteri *P. syringae*. Secara rutin, kultur bakteri yang berumur 24 jam diencerkan 100 kali dengan 100 ml media NB dalam erlenmeyer bervolume 500 ml. Ketika kultur bakteri mencapai kerapatan optik 1,0 pada OD₆₀₀, bakteriofag ditambahkan dalam kultur tersebut dengan konsentrasi multiplicity of infection (m.o.i) 0.001–1.0. Setelah diinkubasi pada suhu 28°C selama 12–24 jam, sel bakteri dipisahkan dari media

denga sentrifus pada 5000 $\times g$ selama 20 menit pada 4°C. Selanjutnya supernatan difiltrasi dengan filter membran berpori 0.45 μm dan dilanjutkan dengan presipitasi partikel bakteriofag dengan cara menambahkan masing-masing NaCl dan polyethylene glycol 6000 pada konsentrasi akhir 0,5 M dan 5%. Pellet partikel bakteriofag diambil dengan cara sentrifugasi pada 15000 $\times g$ selama 30 menit, suhu 4 °C dan di larutkan dalam buffer SM buffer (50 mM Tris/HCl at pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ and 0.01% gelatin). Partikel bakteriofag murni selanjutnya disimpan pada suhu 4°C hingga digunakan pada pengujian selanjutnya.

Pembuatan formula larutan aktif berbasis bakteriofag.

Formulasi larutan aktif berbasis bakteriofag dilakukan untuk mendapatkan sebuah larutan siap pakai, praktis, dan efektif untuk dipergunakan dalam proses deteksi bakteri target. Larutan tersebut dibuat dalam beberapa formula yang selanjutnya dipilih berdasarkan viabilitas bakteriofag dalam larutan. Secara singkat, formula ini dibuat dengan cara membuat suspensi partikel bakteriofag dalam botol reaksi yang berisi beberapa jenis pelarut yaitu buffer SM (Yamada *et al.*, 2007), buffer fosfat (62 mM buffer fosfat, pH 7.0) dan air steril sebagai kontrol dengan konsentrasi 10⁸ PFU/ml. Larutan tersebut disimpan pada suhu 4°C hingga pengujian selanjutnya.

Desain dan pembuatan kertas detektor

Sebagai paket dari kit deteksi, maka pembuatan kertas detektor perlu dilakukan dengan pendekatan indikator pertumbuhan bakteri target (Schaad *et al.*, 2001). Kertas detektor di desain menggunakan kertas filter No. 1001-917 (Whatman) dan di potong dengan ukuran 3 \times 12 cm. Semua potongan kertas filter tersebut selanjutnya dicelupkan pada formula larutan detektor nutrisi bakteri, asam amino, dye, dan Agar (tidak dirinci hingga selesai penelitian dan proses HAKI) yang selanjutnya dimasukkan dalam aluminium foil dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 30 menit. Setelah sterilisasi, kertas detektor tersebut selanjutnya di keringkan dalam oven pada suhu 50°C selama semalam

dan disimpan pada suhu 4°C atau suhu ruang hingga digunakan.

Uji sensitivitas deteksi *P. syringae* menggunakan kit deteksi.

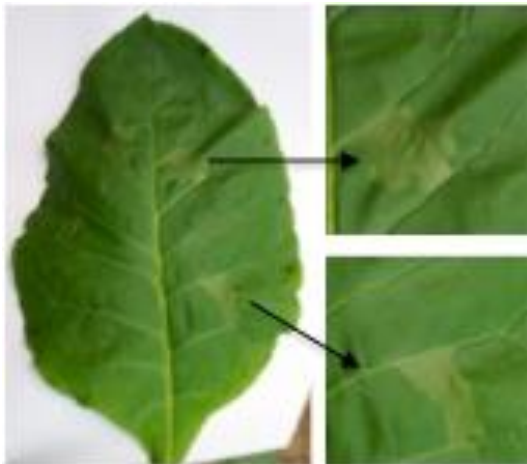
Untuk mengkonfirmasi kesensitifan deteksi *P. syringae* menggunakan kit deteksi yang dibuat (larutan aktif dan kertas detektor) maka dilakukan uji sensitifitas deteksi larutan aktif. Pengujian dilakukan dengan cara mencelupkan kertas detektor pada suspensi bakteri target *P. syringae* dengan konsentrasi yang berbeda (10⁵-10⁸CFU/ml) selama 1 menit dan dibiarkan kering udara dalam cawan petri steril berdiameter 10 cm. Selanjutnya, sebanyak 3-4 μ l larutan aktif baik bakteriofag tunggal maupun campuran beberapa bakteriofag dengan konsentrasi 10 PFU/ml ditetaskan pada kertas detektor tersebut dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang. Sebagai kontrol positif, campuran antara *P. syringae* dengan bakteri lain (*P. fluorescens*) dengan perbandingan 1:1 diujikan dengan cara yang sama. Sedangkan kontrol negatif, kertas detektor dicelupkan pada air steril sebelum ditetaskan dengan larutan aktif. Pengamatan terhadap hasil deteksi dilakukan pada perubahan warna area tetesan larutan aktif pada kertas deteksi. Perubahan warna menunjukkan bahwa hasil deteksi negatif.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri dan bakteriofag

Isolat bakteri *P. syringae* diperoleh dari isolasi daun bergejala yang didapat dari lapang, lokasi pengambilan sample dilakukan pada daerah sekitar Kabupaten Jember yang menjadi sentra budidaya kedelai yaitu daerah Sukorambi, Manggis, Kramat, dan Botosari. Isolasi bakteri dari lapang dimulai dengan memotong daun yang bergejala \pm 2-3cm kemudian dilakukan proses disinfeksi dengan merendamnya pada etanol 70 % selama 5-10 detik, setelah itu dibilas dengan air steril 2 \times 3 menit untuk selanjutnya dikeringkan menggunakan kertas saring, selanjutnya sampel daun ditanam pada media King's B dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 24jam. Koloni bakteri yang tumbuh dan berpendar (fluor) pada pengamatan di bawah sinar UV, digoreskan kembali pada media King's B hingga diperoleh koloni tunggal.

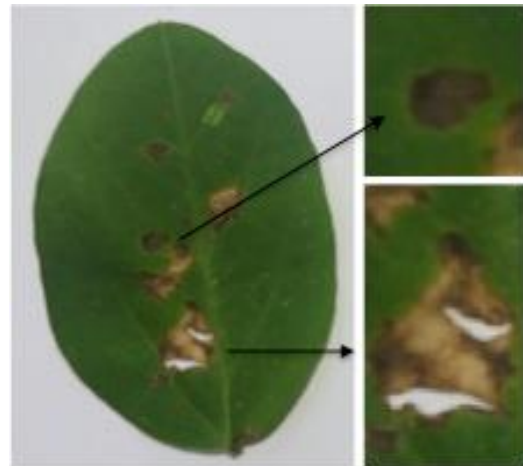
Pengujian patogenesis pada tanaman tembakau menggunakan bakteri yang telah dipastikan telah berpendar di bawah sinar UV dan mempunyai kerapatan 10^6 cfu/ml difiltrasikan menggunakan infilter pada daun tembakau, setelah 24 jam masa inkubasi didapat hasil pada daerah daun yang telah diinfiltrasi dengan suspensi bakteri *P. syringae* didapat gejala nekrosis berwarna coklat, daun nampak tipis transparan (Gambar 1). Hal tersebut serupa dengan hasil penelitian Ignjatov *et al.*, (2007), yang mengatakan bahwa hasil uji patogenesis yang positif ialah daun tembakau menunjukkan gejala nekrosis (sel yang mati) pada bagian daun yang telah disuspensikan setelah 24 jam setelah infiltrasi.



Gambar 1. Reaksi hipersensitif pada daun tembakau (inset menunjukkan hasil pembesaran gambar 2,5x)

Pengujian selanjutnya yang dilakukan ialah melakukan uji virulensi yaitu menginfiltrasi suspensi bakteri dengan kerapatan 10^8 cfu/ml pada daun kedelai, setelah 3x24 jam masa inkubasi daun kedelai nampak bercak coklat, nekrosis dan terdapat halo (Gambar 2). Hal tersebut sesuai dengan penjelasan Semangun (2008) mengenai gejala hawar bakteri.

Setelah dilakukan uji patogenesis dan virulensi, isolat patogen hawar bakteri (*P. syringae* pv. *glycinea*) dapat disimpulkan bahwa 11 isolat bakteri yang didapat dari Sukorambi, Manggis, Kramat, dan Botosari merupakan patogen penyebab penyakit hawar daun bakteri pada kedelai (Tabel 1).



Gambar 2. Daun kedelai yang positif dalam uji virulensi

Tabel 1. Hasil pengujian hipersensitif dan virulensi isolat bakteri *P. syringae*

No	Nama Isolat	Hasil Uji Hipersensitif	Hasil Uji Virulensi
1	H3	Positif	Positif
2	KR 4-2	Positif	Positif
3	SK2	Positif	Positif
4	KR 1-1	Positif	Positif
5	BT 4-1	Positif	Positif
6	MG 4-1	Positif	Positif
7	SK 2-2	Positif	Positif
8	SK 2-1	Positif	Positif
9	SK 4-2	Positif	Positif
10	SK 3-1	Positif	Positif
11	SK 3-2	Positif	Positif

Isolasi bakteriofag

Sumber bakteriofag didapat dari air irigasi pertanian kedelai. Melakukan uji spot test dari air irigasi yang diduga terdapat bakteriofag. Hasil yang didapat dari uji spot-test dari bakteri *P. syringae* isolat H3 (PSGH3) dan bakteriofag PSGH3 (ϕ PSGH3), setelah diinkubasi selama 24 jam muncul *plaque* (zona bening). Munculnya *plaque* merupakan indikasi bakteriofag mampu menginfeksi bakteri PSGH3. Bakteri yang semula tumbuh telah terinfeksi bakteriofag dan bakteri tersebut lisis dan membentuk *plaque* (zona bening).

Bakteriofag yang dipastikan dapat menyerang bakteri PSGH3 dilakukan perbanyakan dengan menggunakan metode *Plaque assay* yaitu dengan mencampur bakteri PSGH3 dan ϕ PSGH3 di dalam eppendorf yang selanjutnya diinkubasi selama 2 jam, setelah diinkubasi dilakukan penuangan pada media NA dan diinkubasi 24 jam. Muncul *plaque* (zona bening) pada

media dapat diketahui setelah diinkubasi selama 24 jam, munculnya *plaque* merupakan bakteriofag yang sedang menginfeksi bakteri PSGH3, bakteri yang semula tumbuh pada media terinfeksi bakteriofag dan bakteri tersebut lisis dan membentuk *plaque* (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil *Plaque assay*

Hasil dari uji spot test dan plaque assay (Tabel 2) didapatkan bahwa ϕ PSGH3 spesifik terhadap isolat PSGH3, KR1-1 dan KR4-2 dengan menunjukkan hasil positif dengan ditandai munculnya *plaque*. Hasil membuktikan bahwa bakteriofag dapat menginfeksi ketiga isolat tersebut dan tidak bisa menginfeksi isolat yang lain dikarenakan kespesifikan dari bakteriofag tersebut.

Tabel 2. Hasil uji kepekaan 11 isolat *P. syringae* terhadap ϕ PSGH3

No	Nama Isolat	Asal isolat	Hasil Uji
1	H3	Koleksi	Positif
2	KR 4-2	Keramat	Positif
3	SK2	Sukorambi	Negatif
4	KR 1-1	Keramat	Positif
5	BT 4-1	Botosari	Negatif
6	MG 4-1	Manggisan	Negatif
7	SK 2-2	Sukorambi	Negatif
8	SK 2-1	Sukorambi	Negatif
9	SK 4-2	Sukorambi	Negatif
10	SK 3-1	Sukorambi	Negatif
11	SK 3-2	Sukorambi	Negatif

Plaque assay dari PSGH3 dan ϕ H3-1 didapatkan hasil positif dengan munculnya *plaque*, selain itu didapatkan 3 partikel

tunggal bakteriofag diantaranya yaitu ϕ GH1, ϕ GH2 dan ϕ GH3.

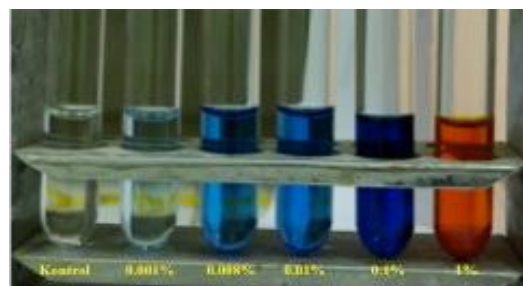
Desain dan pembuatan kertas detektor

Pengujian uji kestabilan warna komposisi kit dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 616 nm dari larutan induk Bromothymol Blue (BTB) 2%. Konsentrasi yang digunakan meliputi A (kontrol); B (0,001%); C (0,008%); D (0,01%); E (0,1%); dan F (1%), dengan pengamatan yang dilakukan pada 0 jam, 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam, 5 jam, dan 24 jam (Tabel 3).

Pengujian kestabilan warna dilanjutkan dengan memberikan perlakuan suhu tinggi menggunakan autoklaf guna mengetahui perubahan warna. dan perlakuan yang dapat digunakan untuk uji lanjut pada media NA pada perlakuan A (kontrol); B (0,001%); C (0,008%); D (0,01%); dan E (0,1%). Pada perlakuan F (1%) tidak dapat digunakan untuk uji lanjut karena larutan terlalu masam (Gambar 4).

Tabel 3. Uji kestabilan warna dengan spektrofotometer

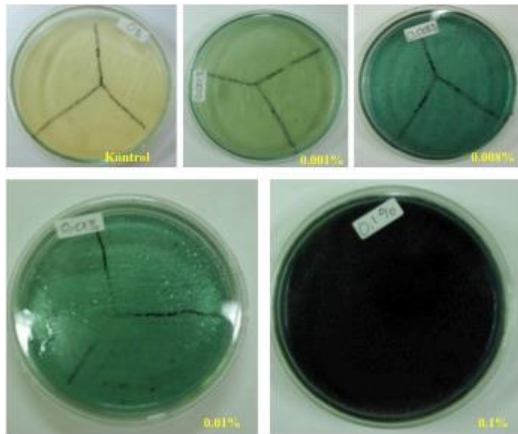
Konsentrasi BTB (%)	OD 616 PADA							
	0 JAM	1 JAM	2 JAM	3 JAM	4 JAM	5 JAM	24 JAM	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,001	0,245	0,117	0,181	0,196	0,184	0,180	0,214	
0,008	1,317	1,242	1,308	1,222	1,295	1,297	1,757	
0,01	1,611	1,542	1,611	1,601	1,604	1,594	2,238	
0,1	2,896	2,775	2,929	2,557	3,000	2,891	3,000	



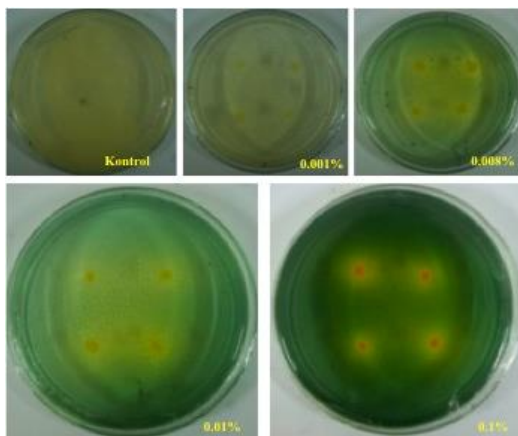
Gambar 4. Uji kestabilan warna BTB

Berdasarkan hasil uji kestabilan warna yang telah dilakukan, selanjutnya membuat media NA dengan penambahan BTB dan didapat lima media NA+BTB dengan berbagai konsentrasi BTB yang berbeda (Gambar 5). Simulasi perubahan media dilakukan dengan pengukuran diameter zona perubahan warna pada media NA+BTB. Hasil menunjukkan zona

perubahan warna menjadi lebih hijau pada semua perlakuan konsentrasi BTB dan zona infeksi bakteri berkisar 3,5 - 4,5 mm. Warna kuning pada spot media NA+BTB menunjukkan bahwa bakteri *P.syringae* H3 mampu tumbuh dengan baik (Gambar 6).



Gambar 5. Media NA+BTB dengan berbagai konsentrasi

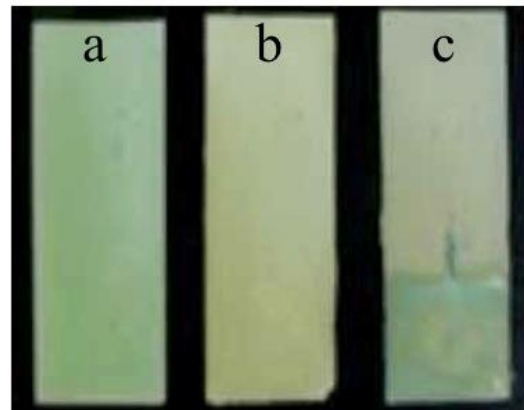


Gambar 6. Media NA + BTB setelah dilakukannya spot bakteri

3.4 Uji sensitivitas deteksi *P. syringae* menggunakan kit deteksi.

Perakitan kit tersebut diuji ulang dengan percobaan selanjutnya yang memfokuskan pada formulasi dan komposisi bahan kit tersebut dari pencampuran antara CMC, TALC, NB+BTB, KOH 3% serta kertas detektor yang digunakan. Hasil menunjukkan bahwa isolat kertas detektor yang dicelupkan pada suspensi bakteri target tanpa larutan aktif bakteriofag menyebabkan kertas berubah menjadi kuning, sedangkan kertas yang ditetesi dengan larutan aktif tidak berubah warna pada area yang ditetesi dengan larutan aktif tersebut

(Gambar 7). Kontrol yang merupakan kertas detektor yang dicelupkan pada air steril tidak menunjukkan perubahan warna.



Gambar 7. Uji deteksi *P. syringae* dengan kit deteksi. (a) kontrol, (b) hasil negatif, (c) hasil positif.

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 11 isolat bakteri *Pseudomonas syringae* yang didapat dari 4 lokasi di Jember yaitu Sukorambi, Manggisari, Botosari, dan Keramat, 11 bakteri ini mampu menunjukkan hasil positif untuk uji hipersensitif dan uji virulensi. Sumber bakteriofag didapat dari air irigrasi lahan kedelai di daerah keramat dan didapatkan 3 partikel bakteriofag yaitu (ϕ GH1, ϕ GH2, dan ϕ GH3). Formulasi kertas detektor yang digunakan untuk KIT deteksi diperoleh dari campuran komposisi (Talk, CMC, pH indikator) komposisi tersebut sangat berpengaruh terhadap kualitas Kit. Oleh sebab itu dibutuhkan penelitian lebih lanjut sehingga didapat formulasi komposisi KIT yang mampu mendeteksi penyakit hawar bakteri dengan kualitas yang lebih baik.

5.REFERENSI

Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. 2012. Utilization of filamentous phage ϕ RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis.* 96(8):1204-1209.

- Addy HS. 2011. Bakteriofag untuk Pertanian. <http://tophotnews.wordpress.com/2011/12/21/bakteriofag-untuk-pertanian> (diakses tanggal 12 Oktober 2012.)
- Daft CG, Leben C. 1972. Bacterial blight of soybeans: epidemiology of blight outbreaks. *Phytopathol.* 62:1167-1170.
- Elphinstone JG, Hennessy J, Wilson JK, Stead D. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *Bull OEPP/EPPO* 26: 663–678.
- Hagens S, Loessner MJ. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76(3):513-522.
- Hifni HR, Miharja S. 1994. Studi pergeseran strain bakteri *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* penyebab hawar daun bakteri. Laporan Intern Balai Penelitian Tanaman Pangan Bogor.
- Ignjatov, M., Milosevic, M., Nikolic, Z., Vujakovic, M., and Petrovic, D. 2007. Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* isolates from Vojvodina. *Phytopathol.* 45: 43–54.
- King EO, Ward MK, Rane DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301–307.
- Lievens B, Grauwet TJMA, Cammue BPA, Thomma BPHJ, 2005. Recent developments in diagnostics of plant pathogens: A review. *Recent Res. Devel. Microbiol.* 9:1-23
- Morello E, Saussereau E, Maura D, Huerre M, Touqui L, *et al.* 2011. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *PLoS ONE* 6(2):e16963. doi:10.1371/journal.pone.0016963
- Rosenberger DA. 2003. Factors limiting IPM-compatibility of new disease control tactics for apples in eastern United States. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2003-0826-01-RV.
- Sarnaik SS, Kanekar PP, Raut VM, Taware SP, Chavan KS, Bhadbhade BJ. 2006. Effect of application of different pesticides to soybean on the soil microflora. *J. Envir. Biol.* 27(2): 423-426
- Schaad, N., W., Jones, J., B., and Chun, W. 2001. *Laboratory Guide For Identification of Plant Pathogenic Bacteria.* APS Press. Minnesota.
- Suharsono S. 2000. Prinsip Amplifikasi DNA dengan PCR. Pelatihan Peningkatan Pengetahuan dan Keterampilan Teknisi Teknik Laboratorium Biologi Molekuler. PAU. IPB
- Tantera DM. 1992. Petunjuk Bergambar untuk Identifikasi Hama dan Penyakit Kedelai di Indonesia. Direktorat Jendral Pertanian Tanaman Pangan, Jakarta.
- Ward E, Foster SJ, Fraaije BA, McCartney HA. 2005. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Ann. Appl. Biol.* 145: 1-16.