



**DINAMIKA POPULASI *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
YANG DIINVESTASI PADA MEDIA TANAM PADI
DENGAN APLIKASI EKSTRAK TAPAK LIMAN
DAN BAKTERIOFAG XooM01**

SKRIPSI

Oleh:

**Naufal Mahdi Malik
NIM 191510701010**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
PROGRAM STUDI PROTEKSI TANAMAN
FAKULTAS PERTANIAN
JEMBER
2023**



**DINAMIKA POPULASI *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
YANG DIINVESTASI PADA MEDIA TANAM PADI
DENGAN APLIKASI EKSTRAK TAPAK LIMAN
DAN BAKTERIOFAG XooM01**

SKRIPSI

diajukan guna memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar Sarjana pada
Program Studi Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh:

**Naufal Mahdi Malik
NIM 191510701010**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
PROGRAM STUDI PROTEKSI TANAMAN
FAKULTAS PERTANIAN
JEMBER
2023**

PERSEMBAHAN

Dengan Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT, saya persembahkan karya tulis ilmiah ini kepada:

1. Bapak Iwan Sugianto dan Ibu Heny Hastawidiarti atas keridhaan dan dukungan penuh, sehingga saya mendapatkan kekuatan untuk terus berjuang menyelesaikan skripsi hingga mendapat gelar Sarjana Pertanian.
2. Hardian Susilo Addy S.P., M.P., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Skripsi yang telah senantiasa membimbing saya dengan sabar dan selalu memberikan nasehat serta motivasi untuk menyelesaikan skripsi ini hingga mendapat gelar Sarjana Pertanian.
3. Dr. Ir. Rachmi Masnilah, M.Si. selaku Dosen Penguji Utama saya yang telah memberikan koreksi dan saran masukan pada skripsi saya.
4. Ali Wafa, S.P., M.Si. selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan koreksi dan saran serta dengan sabar memberikan nasehat untuk menyelesaikan skripsi ini.
5. Segenap dosen, pegawai, dan karyawan Fakultas Pertanian Universitas Jember, khususnya di Program Studi Proteksi Tanaman yang telah memberikan ilmu, pengalaman, dan fasilitas selama saya menempuh pendidikan S1.
6. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“Allah menghendaki kemudahan bagimu, dan tidak menghendaki kesukaran bagimu”

(QS. Al Baqarah : 185)

“Tanpa tindakan, pengetahuan tidak ada gunanya dan pengetahuan tanpa tindakan itu sia-sia”

(Abu Bakar Ash-Shiddiq)

“Diwajibkan atas kamu berperang, padahal itu tidak menyenangkan bagimu. Tetapi boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu baik bagimu, dan boleh kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu. Allah maha mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui”

(QS. Al Baqarah : 216)

PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Naufal Mahdi Malik

NIM : 191510701010

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi berjudul "*Dinamika Populasi Xanthomonas oryzae pv. oryzae yang Diinvestasi pada Media Tanam Padi dengan Aplikasi Ekstrak Tapak Liman dan Bakteriofag XooM01*" adalah benar-benar hasil karya penulis sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun serta bukan karya tulis plagiasi. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar

Jember, 10 November 2023
Yang Menyatakan



Naufal Mahdi Malik
NIM. 191510701010

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi berjudul “*Dinamika Populasi Xanthomonas oryzae pv. oryzae yang Diinvestasi pada Media Tanam Padi dengan Aplikasi Ekstrak Tapak Liman dan Bakteriofag XooM01*” Telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian Universitas Jember pada :

Hari : Jum'at

Tanggal : 10 November 2023

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Pembimbing

Tanda Tangan

1. Pembimbing Utama

Nama : Hardian Susilo Addy S.P., M.P., Ph. D.

NIP : 198011092005011001



(.....)

Penguji

1. Penguji Utama

Nama : Dr. Ir. Rachmi Masnilah, M.Si.

NIP : 196301021988022001



(.....)

2. Penguji Anggota

Nama : Ali Wafa S.P., M.Si.

NIP : 199001222019031017



(.....)

ABSTRACT

*Rice is the plant most widely cultivated by farmers, because rice is the main staple food for Indonesian people. However, rice productivity in East Java Province decreased from 56.68 to 56.47 Ku/ha. The decline in rice production was caused by bacterial leaf blight disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. The Xoo pathogen can reduce yields by 70-80%, especially for rice that is cultivated continuously without crop rotation. This can cause the host or inoculum source to accumulate in the soil, which Xoo is known to survive in soil, plant debris, seeds and weeds. Alternative control can be done using *Elephantopus scaber* extract, bacteriophages and a combination of both. To find out the results of control, molecular research was carried out on the dynamics of the Xoo population in soil using PCR techniques and continued with semi-quantitative analysis. The lowest Xoo population decline occurred in the *E.scaber* treatment at 4 DPA. However, in all treatments there was an increase in population at 6 DPA, except for the control. Bacteriophage treatment and the combination of *E.scaber* + bacteriophage did not show a significant effect on reducing the Xoo population up to 6 DPA*

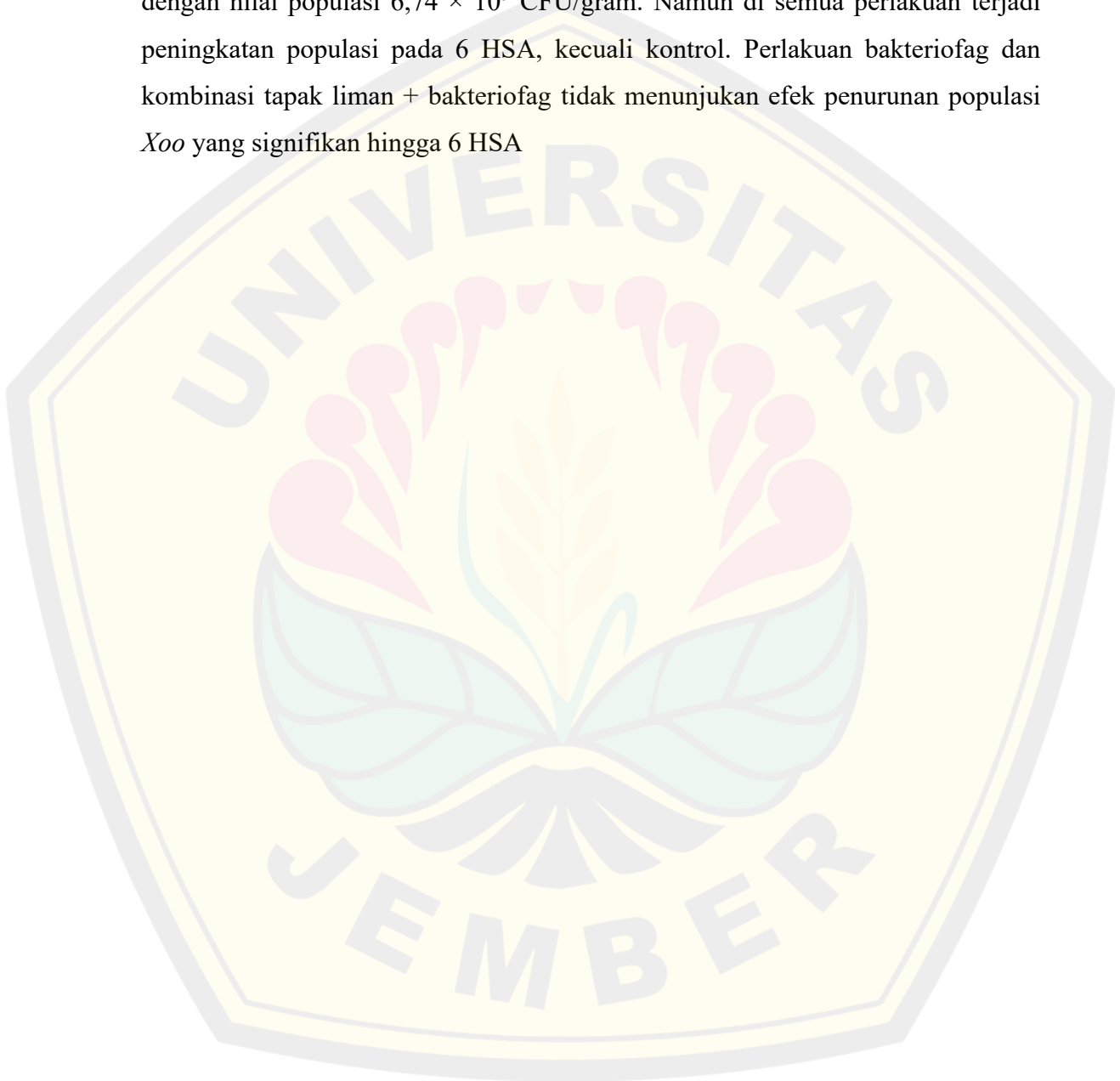
*Keywords : Soil, Population, Bacteriophage, *Elephantopus scaber**

RINGKASAN

Penduduk Indonesia sangat bergantung pada tanaman padi sebagai bahan pokok utama dalam memenuhi kebutuhan sehari-hari. Peningkatan kebutuhan padi sebagai bahan pangan utama masyarakat Indonesia tidak ditunjang dengan hasil produksi padi yang menurun. Salah satu faktor penyebab menurunnya produktivitas yaitu adanya infeksi penyakit terutama patogen bakteri pada pertanaman padi. Penyakit yang menginfeksi tanaman padi ialah penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Penyakit ini juga dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman padi yang dibudidayakan secara terus menerus sepanjang tahun tanpa pergiliran tanaman. Hal tersebut berpotensi menyebabkan patogen tersedia secara terus menerus dan sumber inokulum menumpuk pada tanah. Kehilangan hasil produktivitas tanaman padi akibat infeksi patogen *X. oryzae* mencapai 70-80% di Indonesia, maka kerugian tersebut perlu dilakukan adanya pengendalian. Salah satu alternatif pengendalian yang dilakukan yaitu menggunakan bahan yang diperoleh dari alam seperti tanaman tapak liman (*E. Scaber*) maupun agens hayati yang bersifat spesifik seperti bakteriofag. Maka dari itu perlu dilakukan penelitian terkait aplikasi ekstrak tapak liman dan bakteriofag dalam mengurangi populasi patogen *Xoo* pada tanah.

Prosedur penelitian ini terdiri dari tahap persiapan, pelaksanaan dan analisis. Tahap persiapan berupa pembuatan ekstrak tapak liman, isolasi bakteri patogen dari daun padi yang kemudian dilakukan uji postulat Koch serta konfirmasi secara molekuler, isolasi bakteriofag dari tanah padi kemudian dimurnikan dan diperbanyak serta sterilisasi media tanam. Tahap pelaksanaan yaitu inokulasi patogen *Xoo* pada tanah, aplikasi ekstrak tapak liman dan bakteriofag serta ekstraksi DNA pada tiap perlakuan. Tahap analisis terdiri dari pelaksanaan PCR dan elektroforesis. Penelitian ini dilakukan dengan percobaan menggunakan rancangan acak lengkap non faktorial dengan 4 perlakuan dan 6 kali pengulangan. Masing – masing perlakuan terdiri dari dH₂O, ekstrak tapak liman, bakteriofag, dan tapak liman + bakteriofag. Data yang diperoleh dari hasil PCR selanjutnya dilakukan analisis dengan menggunakan analisis deskriptif semi kuantitatif.

Bakteri patogen yang berhasil diisolasi dan terkonfirmasi sebagai *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dengan nama XooN01, sedangkan bakteriofag yang telah diisolasi dan mampu menginfeksi patogen inang diberi nama fag XooM01. Berdasarkan hasil penelitian bahwa perlakuan yang menunjukkan penurunan populasi *Xoo* paling rendah terjadi pada perlakuan tapak liman di 4 HSA, dengan nilai populasi $6,74 \times 10^5$ CFU/gram. Namun di semua perlakuan terjadi peningkatan populasi pada 6 HSA, kecuali kontrol. Perlakuan bakteriofag dan kombinasi tapak liman + bakteriofag tidak menunjukkan efek penurunan populasi *Xoo* yang signifikan hingga 6 HSA



PRAKATA

Syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT atas segala rahmatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Dinamika Populasi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang Diinvestasi pada Media Tanam Padi dengan Aplikasi Ekstrak Tapak Liman dan Bakteriofag XooM01”**. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak terwujud tanpa adanya bantuan dari berbagai pihak. Oleh sebab itu, penulis ingin menyampaikan rasa terimakasih kepada :

1. Orang tua tercinta Bapak Iwan Sugianto dan Ibu Heny Hasta Widiarti yang telah meluangkan doa, tenaga, waktu dan materi untuk mendukung putranya menyelesaikan pendidikan, serta Adik tersayang Akhmad Daffahadi Tamam yang telah mendukung menyelesaikan skripsi.
2. Hardian Susilo Addy S.P., M.P., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Skripsi yang telah membimbing saya dengan sabar dan selalu memberikan nasehat serta motivasi untuk menyelesaikan skripsi ini.
3. Dr. Ir. Rachmi Masnilah, M.Si. selaku Dosen Penguji Utama saya yang telah memberikan koreksi dan saran masukan pada skripsi saya.
4. Ali Wafa, S.P., M.Si. selaku Dosen Penguji Anggota dan Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan koreksi dan saran masukan pada skripsi saya.
5. NIM. 190210204291 yang telah memberikan bantuan, dukungan dan motivasi serta menemani keluh kesah dalam penyelesaian skripsi ini.
6. Rekan bimbingan skripsi (Nabilla Pramudya T. D, M Ibadhus S, Putri Indah P, Zidna Nurul I), Phage Team (Mba Wulan Arum H., Mba Anggi Arsy P, Mas Harits Ramadhan F., dan lainnya), teman-teman dan semua teknisi di laboratorium CDAST, Proteksi Tanaman angkatan 2019, serta semua pihak yang tidak bisa secara lengkap penulis sebutkan satu per satu.

Jember 10 November 2023

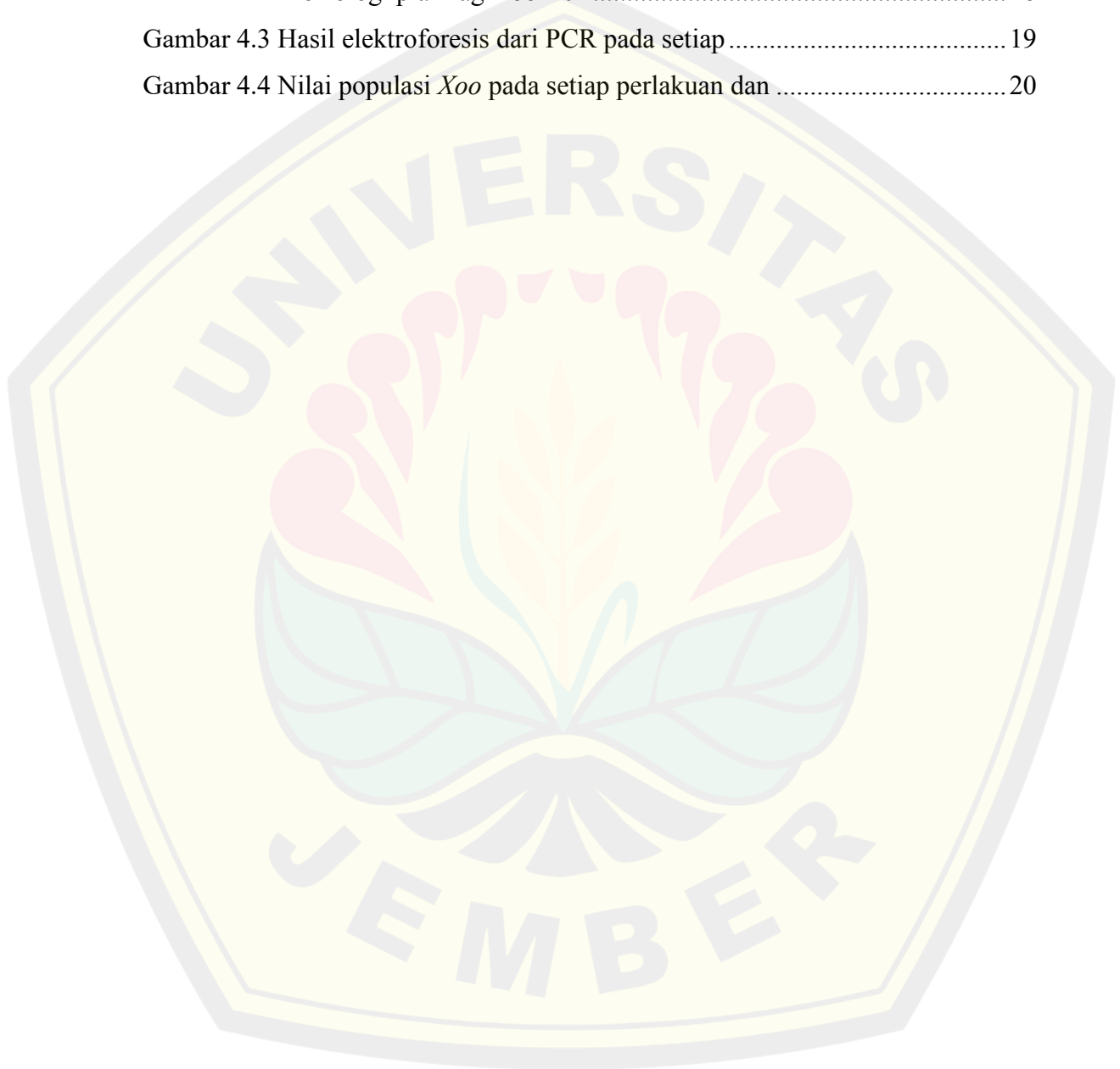
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERSEMBAHAN	ii
MOTTO	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PERSETUJUAN	v
ABSTRAK	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Media Tanam Padi.....	4
2.2 Morfologi Bakteri <i>Xanthomonas oryzae</i>	5
2.3 Tapak Liman (<i>Elephantopus scaber</i> L.).....	6
2.4 Bakteriofag <i>Xanthomonas oryzae</i>	7
2.5 Dinamika Populasi Xoo pada Media Tanam.....	9
2.6 Hipotesis.....	10
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan.....	11
3.3 Rancangan Percobaan.....	11
3.4 Prosedur Penelitian.....	12
3.4.1 Persiapan.....	12
3.4.2 Pelaksanaan.....	13
3.4.3 Analisis.....	15
3.5 Variabel Pengamatan.....	16
3.6 Analisis Data.....	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
4.1 Hasil.....	17
4.1.1 Patogen Hawar Daun Bakteri.....	17
4.1.2 Bakteriofag XooM01.....	18
4.1.3 Dinamika Populasi Bakteri XooN01	18
4.2 Pembahasan.....	20
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	27
5.1 Kesimpulan.....	27
5.2 Saran.....	27
DAFTAR PUSTAKA.....	28
LAMPIRAN.....	37

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Koloni bakteri <i>Xoo</i> pada media YDA	6
Gambar 2.2 Tapak Liman (<i>Elephantopus scaber</i> L.).....	7
Gambar 4.1 Patogen Hawar Daun Bakteri	17
Gambar 4.2 Morfologi plak fag XooM01	18
Gambar 4.3 Hasil elektroforesis dari PCR pada setiap	19
Gambar 4.4 Nilai populasi <i>Xoo</i> pada setiap perlakuan dan	20



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian.....	37
Lampiran 2. Deskripsi PCR Master Mix	39
Lampiran 3. Perhitungan Koloni Bakteri XooN01	41
Lampiran 4. Perhitungan Diameter Plak Fag XooM01	42
Lampiran 5. Perhitungan Titer Fag XooM01.....	43
Lampiran 6. Hasil Perhitungan ImageJ (Ulangan 1).....	44
Lampiran 7. Hasil Perhitungan ImageJ (Ulangan 2).....	45
Lampiran 8. Hasil Perhitungan ImageJ (Ulangan 3).....	46
Lampiran 9. Hasil Perhitungan ImageJ (Ulangan 4).....	47
Lampiran 10. Hasil Perhitungan ImageJ (Ulangan 5).....	48
Lampiran 11. Hasil Perhitungan ImageJ (Ulangan 6).....	49
Lampiran 12. Rata – Rata Perhitungan ImageJ dan Analisis Regresi.....	50

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Padi merupakan tanaman yang paling banyak dibudidayakan oleh petani, hal tersebut dikarenakan keberadaan komoditas ini sangat penting dalam menjaga ketahanan pangan bagi masyarakat Indonesia. Penduduk Indonesia sangat bergantung pada padi sebagai bahan pokok utama dalam memenuhi kebutuhan sehari-hari. Menurut Pratama et al. (2019), pulau Jawa merupakan pusat produksi padi di Indonesia. Secara umum provinsi yang paling tinggi menyumbang hasil produksi padi ialah Provinsi Jawa Timur, yang mana pada tahun 2021 produksi padi mencapai 9.908.932 ton (BPS Nasional, 2022). Menurut BPS Provinsi Jawa Timur (2022), hasil produktivitas padi kuintal per hektar menurun dari 56,68 menjadi 56,47. Salah satu faktor penyebab menurunnya produktivitas yaitu adanya infeksi penyakit terutama patogen bakteri pada pertanaman padi.

Salah satu penyakit yang menginfeksi tanaman padi ialah penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Penyakit hawar daun bakteri (HDB) merupakan salah satu penyakit utama tanaman padi di berbagai negara budidaya padi, termasuk di Indonesia (Sudir et al., 2012). Kondisi lingkungan dan perilaku petani yang intensif berbudidaya tanaman ini menyebabkan penyakit berkembang dan menyebar ke wilayah lain. Penyakit HDB dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman padi, terutama padi yang dibudidayakan secara terus menerus sepanjang tahun tanpa pergiliran tanaman pada wilayah dengan tingkat kelembapan dan curah hujan yang tinggi. Menurut Yanuar et al. (2016), bahwa kehilangan hasil produktivitas tanaman padi akibat infeksi patogen *X. oryzae* mencapai 70-80%, di Indonesia. Bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae* dapat bertahan hidup seperti dalam tanah, jerami yang terinfeksi, sisa-sisa tanaman, benih dan gulma (Sudir et al., 2012; Qian et al., 2020). Lahan sawah yang terdapat patogen akan berpotensi sebagai salah satu faktor penyebab menyebar dan berkembangnya penyakit, sehingga hasil produktivitas tanaman padi dapat menurun. Maka perlu dilakukan penanganan dalam mengatasi hal tersebut sesuai kaidah - kaidah pengelolaan OPT terpadu.

Pengendalian penyakit HDB secara umum dilakukan dengan penggunaan bakterisida, varietas tahan, dan pergiliran tanaman (Fadlilah et al., 2022). Alternatif lain pengendalian HDB yaitu menggunakan bahan yang diperoleh dari alam seperti tanaman tapak liman. Ekstrak tapak liman dapat menghambat pertumbuhan koloni patogen *Xoo* dengan bantuan senyawa bioaktif seperti flavonoid, tanin dan alkaloid (Rejeki et al., 2017). Tanaman tapak liman (*Elephantopus scaber* L.) juga diketahui memiliki aktifitas antibakteri terhadap *Shigella Disentri* (Nasution et al., 2020). Penyakit HDB juga dapat ditangani dengan penggunaan agens hayati yaitu bakteriofag. Bakteriofag dapat dijadikan alternatif pengendalian patogen karena efektif dan aman terhadap lingkungan (Liu et al., 2021). Salah satu keunggulan fag mempunyai karakter spesifik yang dapat berpotensi pada hasil yang diperoleh dalam pengendalian secara cepat, akurat, dan efisien terhadap inang (Susianto et al., 2014). Menurut Chae et al. (2014), bakteriofag *Xanthomonas oryzae* diketahui mempunyai gen lisis yang kuat terhadap penyakit HDB. Laporan tersebut diperkuat oleh Rejeki et al. (2021), yang menyebutkan bakteriofag dapat menjadi agen pengendali hayati patogen *X. oryzae* karena sifatnya yang spesifik seperti fag XooX1IDN dan fag XooX2IDN.

Salah satu alternatif dalam meningkatkan potensi untuk menekan populasi bakteri patogen penyebab penyakit HDB yaitu mengkombinasikan beberapa pengendalian. Belum diketahui kombinasi antara ekstrak tapak liman dan bakteriofag XooM01 dapat signifikan dalam menurunkan populasi bakteri patogen *Xoo* pada media tanam padi. Perhitungan populasi bakteri patogen yang berasal dari tanah dapat menggunakan beberapa pendekatan. Salah satunya dengan menggunakan teknik PCR dengan bantuan primer universal maupun spesifik (Kirk et al., 2004). Sehingga perlu dilakukan penelitian tentang dinamika pada tingkat populasi patogen *Xoo* dalam kombinasi pengendalian tersebut secara molekuler.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana dinamika populasi bakteri *Xoo* yang di investasi pada media tanam padi dengan aplikasi ekstrak tapak liman dan bakteriofag XooM01 dengan pendekatan secara molekuler?

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui dinamika populasi *Xoo* yang di investasi pada media tanam padi dengan aplikasi ekstrak tapak liman dan bakteriofag XooM01 dengan pendekatan secara molekuler.

1.4 Manfaat

1. Bagi kepentingan ilmu dan teknologi dapat memberikan sumbangsih pemikiran pengetahuan ekstrak tapak liman dan bakteriofag XooM01 dalam menghambat bakteri patogen *Xoo* pada media tanam padi
2. Bagi kebijakan pemerintah dapat digunakan sebagai informasi formulasi dalam pengendalian penyakit yang disebabkan oleh patogen *Xoo*
3. Bagi kepentingan industri dapat digunakan pemilihan bahan atau agen dalam pengelolaan OPT khususnya infeksi patogen *Xoo* pada budidaya tanaman padi
4. Bagi kepentingan masyarakat luas dapat memberikan tambahan informasi dan pengetahuan dalam pengendalian patogen *Xoo* secara biologis dan ramah lingkungan

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Media Tanam Padi

Tanaman padi merupakan komoditi utama bagi masyarakat Indonesia. Tingginya sumber energi dan karbohidrat menjadikan tanaman padi sebagai bahan pangan utama bagi masyarakat Indonesia (Nurkholis et al., 2020). Kebutuhan padi sebagai bahan utama makanan pokok menjadikan mayoritas petani di Indonesia berbudidaya tanaman padi. Padi merupakan tanaman semusim, tanaman ini termasuk dalam famili Graminae (Poaceae) genus *Oryza* dan salah satu spesiesnya adalah *Oryza sativa* L. Tanaman padi dapat hidup baik di daerah yang berhawa panas dengan ketinggian 0-1500 mdpl (Paski et al., 2017). Secara umum tanaman padi dibudidayakan pada musim hujan, namun pada daerah lahan dengan sistem irigasi yang cukup dapat dilakukan sepanjang tahun

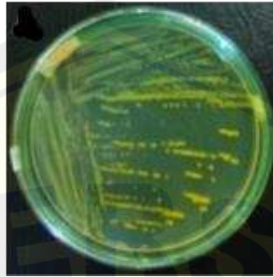
Tahapan budidaya padi yang perlu diperhatikan yaitu persiapan media tanam pada suatu lahan. Kondisi tanah yang subur akan mendukung pertumbuhan tanaman yang dibudidayakan secara optimal, selain itu juga mendukung pada kehidupan mikroorganisme yang ada sehingga mampu menjaga keseimbangan alami dalam sistem ekosistem tanah. Pengolahan tanah merupakan cara untuk menciptakan kondisi lahan yang sesuai sebelum penanaman dilakukan seperti membersihkan dan menghancurkan sisa-sisa tanaman. Hal tersebut perlu dilakukan karena biasanya jerami sisa tanaman yang terinfeksi dapat menjadi sumber inokulum atau penularan penyakit dari musim ke musim (Sudir et al., 2012). Menurut Nuryanto (2018), menyebutkan bahwa pengolahan tanah secara basah dan kering mempunyai dampak yang berbeda terhadap perkembangan penyakit tanaman padi. Olah tanah dan manajemen sistem pengairan dapat mengurangi sumber inokulum awal sehingga mendukung proses penekanan perkembangan penyakit (Nuryanto, 2017). Pengolahan tanah dan rotasi tanam dapat mempengaruhi perkembangan dan populasi penyakit (Paulitz et al., 2010). Beberapa kasus pada lahan budidaya yang ditanami tanaman yang sama dalam beberapa musim sepanjang tahun, berpotensi menyebabkan inang tersedia secara terus menerus dan sumber inokulum menumpuk pada tanah di suatu lahan (Bennett et al., 2012).

2.2 Morfologi Bakteri Xoo

Penyakit hawar daun bakteri (HDB) atau *bacterial leaf blight* merupakan salah satu penyakit utama yang menurunkan hasil produksi tanaman padi yang disebabkan oleh bakteri patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), terutama pada padi sawah irigasi (Asysyuura et al., 2017; Rohaeni & Dini, 2019). Gejala awal hawar daun bakteri ditandai dengan terbentuknya garis pada helaian daun yang berubah menjadi kuning, kemudian berubah putih hingga menyebabkan tanaman menjadi layu dan mati (Sumarno et al., 2014). Gejala pada fase vegetatif dimulai dari perubahan warna daun kekuningan kemudian menjadi abu-abu atau kering yang dimulai dari tepi maupun ujung daun. Gejala yang ditemukan pada fase generatif yaitu daun berubah menjadi abu-abu pada bagian tepi disalah satu atau dua sisi daun (Aditya et al., 2015). Bakteri *Xoo* mempunyai ciri khusus yaitu sel berbentuk batang pendek, tidak membentuk spora dan bisa bergerak (motil) dengan 1 flagel. Sel-sel individu ukurannya bervariasi dengan panjang sekitar 0,7 μm -2,0 μm dan lebar sekitar 0,4 μm -0,7 μm (Nurlailah & Syamsiah, 2018). Koloni bakteri *Xoo* berwarna kuning pucat hingga berwarna kuning, berlendir, permukaannya yang timbul dengan tepian yang rata (Wahyudi et al., 2011). Uji gram bakteri *Xoo* bertipe gram negatif dan uji KOH 3% menunjukkan reaksi positif dengan ditandai lendir seperti benang (Jonit et al., 2016).

Xanthomonas sp. diketahui menghabiskan sebagian siklus hidupnya di luar tanaman inang seperti pada lesi daun yang gugur atau bebas di tanah selama 1 hingga 3 bulan dengan bergantung pada kelembapan dan kemasaman tanah (Sudir et al., 2012). Ordo Xanthomonadales juga diketahui berada dalam komponen di lingkungan rizosfer dan mikrobioma tanah (Bhattacharyya et al., 2018). *Xanthomonas* spp. berkembang baik pada suhu yang tinggi yaitu sekitar 25–35°C sehingga mendukung dalam mencapai inokulum yang cukup tinggi untuk memungkinkan penyebaran penyakit. (Morales et al., 2018). Tahapan infeksi *Xanthomonas* sp. terbagi menjadi dua yaitu penempelan dan kolonisasi. Tahap penempelan dimulai saat bakteri masuk ke dalam jaringan tanaman inang melalui lubang alami dan luka mekanis tanaman seperti jaringan daun atau biji. Bakteri yang telah berada dalam jaringan tanaman mulai masuk dan mengkolonisasi

tanaman inang, sehingga bagian tanaman akan terlihat adanya gejala (Qian et al., 2020). Mekanisme patogen bakteri dalam menginfeksi padi yaitu melalui luka mekanis dan lubang alami. Bakteri masuk kemudian bergerak dan bermultiplikasi menuju pembuluh angkut yaitu xilem. Jaringan hidatoda juga dapat menjadi jalan masuknya *Xoo* ke dalam jaringan tanaman padi (Wahyudi et al., 2011).



Gambar 2.1 Koloni bakteri *Xoo* pada media YDA (Rejeki et al., 2021)

2.3 Tapak Liman (*Elephantopus scaber* L.)

Elephantopus scaber Linn., famili Asteraceae, adalah tumbuhan yang ditemukan beberapa benua seperti Eropa, Asia, Afrika dan Australia. Tanaman tapak liman juga mempunyai sifat antimikroba, hepatoprotektif, antioksidan (Hiradeve et al., 2014). Tanaman tapak liman mempunyai rata-rata luas daun sekitar 25,78 cm², panjang pelepah daun yaitu 1,86 cm dan tinggi 3,66 cm. Secara morfologis dan anatomi *E. scaber* memiliki trikoma yang sangat padat (Yuliani et al., 2018). Tapak liman dapat tumbuh pada dataran rendah sampai ketinggian 1.200 m di atas permukaan laut. *E. scaber* juga termasuk tanaman liar karena sering ditemukan pada lahan yang tidak dibudidayakan.

Manfaat lain yang ditemukan dari *E. scaber* ini yaitu sebagai antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. *E. scaber* juga dilaporkan memiliki sifat seperti antibakteri, antikanker dan antioksidan (Kabeer & Remani, 2014). Tanaman *E. scaber* telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional pada bidang kedokteran, selain itu saat ini juga telah dikembangkan pada beberapa bidang lainnya seperti pertanian, bioteknologi, farmasi dan lainnya. Ekstrak daun tapak liman (*Elephantopus Scaber* L) memiliki senyawa aktif berupa kandungan kimia seperti alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, triterpenoid /steroid, dan polifenol (Nasution et al., 2020).

Senyawa yang ada pada suatu tanaman memiliki cara kerja atau mekanisme kerja yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan salah satu contohnya yaitu flavonoid. Flavonoid memiliki efek bakteriostatik dengan cara menghambat sintesis asam nukleat dan sintesis makromolekul sel bakteri sehingga menyebabkan kerusakan pada membran sel bakteri (Dyozem et al., 2013; Xie et al., 2015). Senyawa aktif tersebut dapat berpotensi sebagai antibakteri yang dapat merusak dinding sel bakteri sehingga pendistribusian nutrisi akan terganggu dan menghambat pertumbuhan bakteri. Gangguan yang disebabkan senyawa alkaloid dari ekstrak daun alpukat juga dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif (Andriani et al., 2016). Ekstrak metanol daun *E. scaber* menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa* (Kumar et al., 2004). Rejeki et al. (2017), melaporkan penggunaan ekstrak tapak liman (*E. scaber*) dapat menghambat koloni bakteri *Xanthomonas oryzae* dan *Ralstonia solanacearum*.



Gambar 2.2 Tapak Liman (*Elephantopus scaber* L.) (Yong Ho et al., 2009).

2.4 Bakteriofag *Xanthomonas oryzae*

Fag merupakan virus spesifik yang dapat menghambat metabolisme inang bakteri dengan cara bereplikasi dan menyerang dengan menargetkan inang tertentu (Buttimer et al., 2017). Bakteriofag juga dapat menginfeksi inang bakteri dan menyebabkan lisogeni atau lisis pada bakteri patogen penyebab penyakit pada tanaman (Bae et al., 2012). Fag juga mampu menurunkan tingkat kerusakan terhadap penyakit dengan mengurangi populasi patogen (Balogh et al., 2010).

Bakteriofag pada dasarnya mempunyai sifat yang spesifik terhadap inangnya, sifat spesifik tersebut menjadikan fag kompatibel dalam berbagai teknik pengendalian penyakit untuk menghancurkan struktur sel bakteri patogen (Svircev et al., 2018). Golongan fag yang memiliki siklus hidup litik cenderung lebih banyak digunakan sebagai agen biokontrol, karena selain spesifikasinya juga mampu melisis sel target (bakteri patogen) yang dapat terlihat dampak penurunan terhadap jumlah bakteri serta kemampuan dalam mereplikasi diri, berkembang secara eksponensial setelah menginfeksi bakteri inang (Stefani et al., 2021). Fag juga dapat melisis sel inang setelah bereplikasi dan keluar dengan sejumlah keturunan melalui siklus litik (Monteiro et al., 2019). Fag yang bersifat virulen (litik) dapat mengambil alih sistem transkripsi dan translasi bakteri untuk mensintesis fag baru. Bakteriofag dapat mengakibatkan lisis pada bakteri inangnya dengan tanda tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri. Indikator adanya infeksi bakteriofag pada bakteri inang pada laboratorium yaitu ditandai dengan terbentuknya zona bening pada medium uji. Zona bening tersebut diakibatkan oleh banyaknya bakteri yang lisis, sehingga pertumbuhan koloni bakteri terhambat (Dhany et al., 2013). Sebagian besar, fag dapat mudah ditemukan serta diisolasi dari tanah, dan air irigasi di sekitar tanaman yang terinfeksi, namun tergantung dengan kondisi lingkungan pada pertumbuhan bakteri inang (Elbreki et al., 2014).

Penerapan fag sebagai agen hayati dapat digunakan untuk menginfeksi patogen yang spesifik seperti, kasus penyakit layu bakteri pada tanaman tomat dapat ditangani dengan fag *Ralstonia RsoM1USA* yang mampu menghambat pertumbuhan patogen *Ralstonia solanacearum* (Addy et al., 2019). Penyakit HDB yang disebabkan *X. oryzae* juga dapat dikendalikan oleh bakteriofag. Fag XooX1IDN dan XooX2IDN dapat mengurangi pertumbuhan patogen HDB secara signifikan (Rejeki et al., 2021). Fag ini memiliki ukuran genom sekitar 38 - 39 kb. Bakteriofag ini dapat bertahan dan stabil pada suhu hingga 50° C, fag ini termasuk ke dalam famili *Myoviridae*. Fag *Myoviridae* dominan menginfeksi *X. oryzae* di sekitar aliran air (Chae et al., 2014). Fag akan hidup secara stabil pada pH tanah sekitar 6 sampai 8, sebaliknya jika pH dibawah 6 dan diatas 8 maka populasinya akan menurun secara drastis (Ranjani et al., 2018).

2.5 Dinamika Populasi *Xoo* pada Media Tanam

Populasi bakteri patogen dapat berubah – ubah, tergantung dengan adanya tekanan maupun pengaruh oleh faktor biotik dan abiotik di dalam suatu lingkungan. Secara umum faktor yang dapat memengaruhi perkembangan bakteri *Xoo* yaitu tanah, pengairan, kelembapan, suhu, pupuk, gulma, sisa tanaman, dan ketahanan varietas (Sudir et al., 2012; Tasliyah, 2012). Menurut Demoling et al. (2007), keberadaan nutrisi dalam tanah seperti karbon, nitrogen dan fosfor dapat mempengaruhi keberadaan bakteri pada dalam tanah, namun yang paling berpengaruh jika kadar karbon dan nitrogen tercukupi dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri. beda halnya dengan kadar fosfor yang cukup pada tanah memiliki efek yang kecil terhadap pertumbuhan bakteri, selain itu keberadaan tanaman berupa eksudat akar juga dapat mempengaruhi tingkat pertumbuhan bakteri secara signifikan. Efek dari nilai pH dalam tanah juga menentukan adanya bakteri dalam tanah. Tanah yang memiliki pH 4 – 8 dapat mendukung pertumbuhan bakteri hingga 4 kali lipat pada tanah (Rousk & Baath, 2011). Temperatur tanah dengan suhu 25 – 30 °C merupakan kondisi optimum bakteri untuk tumbuh, namun pada suhu 45 °C terdapat penurunan kondisi bakteri untuk tumbuh (Pietikainen et al., 2005). Estimasi suatu nilai peningkatan dan penurunan populasi bakteri patogen pada tanah dapat diketahui melalui beberapa pendekatan yaitu secara konvensional maupun secara molekuler.

Menurut Blagodatskaya & Kuzyakov (2013), beberapa cara yang dapat mengestimasi populasi mikroorganisme yang berasal dari tanah yaitu kultur mikroba pada cawan petri (CFU), mikroskopis dengan pewarnaan sel (Acridine orange, SYBR green, DAPI, FITC, DTAF), pengukuran sel mikroorganisme aktif (viability stains dan flow cytometry), pendekatan molekuler (DNA dan RNA), keadaan fisiologis mikroorganisme menggunakan enzim (proteomics dan metabolomics), dan pendekatan respirasi dan substrat pada tanah. Saat ini estimasi populasi mikroorganisme yang banyak dilakukan yaitu menggunakan pendekatan molekuler melalui teknologi PCR. Sampel yang telah diekstraksi dari tanah nantinya dapat dilakukan PCR dengan primer universal (16S, 18S dan ITS) maupun primer spesifik terhadap mikroorganisme tertentu (Kirk et al., 2004).

Metode dalam menghitung populasi bakteri patogen dapat dilakukan melalui teknologi PCR. Metode dengan pendekatan secara molekuler yang digunakan untuk menghitung populasi bakteri patogen biasa disebut *semi-quantitative* PCR. Metode sqPCR dilakukan dengan menghitung dan menganalisis amplicon DNA hasil dari elektroforesis. Menurut Antiabong et al. (2016), Analisis pada metode qPCR dan hasil imageJ dari gel elektroforesis dapat merepresentatifkan konsentrasi DNA bakteri *Fusobacterium necrophorum*. Perhitungan tersebut berkaitan dengan konsentrasi terhadap perbedaan tingkat kecerahan suatu amplicon DNA untuk mengetahui nilai suatu populasi dari sampel yang diamati.

2.6 Hipotesis

Perlakuan aplikasi ekstrak tapak liman (*Elephantopus scaber* L) dan bakteriofag XooM01 dapat menurunkan populasi *Xoo* yang di investasi pada media tanam padi.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dinamika populasi *X. oryzae* yang di investasi pada media tanam padi dengan aplikasi ekstrak tapak liman dan bakteriofag XooM01 terformulasi. Dilaksanakan pada bulan Desember 2022 – September 2023 bertempat di Laboratorium Biologi Molekul dan Bioteknologi, *Center for Development of Advanced Science and Technology* (C-DAST) Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak plastik, mikropipet, mesin sentrifuse (Thermo scientific), mesin PCR (Bio-rad), eppendorf, tangki elektroforesis (Major science), power suply, UV transiluminator (Major science), image J (Version 1.53t), dan alat pendukung lainnya.

Bahan yang digunakan adalah media tanam padi, isolat bakteri *Xoo*, ekstrak tapak liman, isolat bakteriofag XooM01, *yeast dextrose agar* (YDA), protektif agents, filter membran 0,45 μm (Himedia, India), primer JLXoo (forward dan reverse), primer 16SrDNA (forward dan reverse), aquades, kit DNA (*ZymoBiomics™ DNA Miniprep Kit*) serta bahan pendukung lainnya.

3.3 Rancangan Percobaan

Percobaan ini akan dilakukan dengan rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap non faktorial, yang terdiri dari satu faktor yaitu pengaruh dinamika populasi *Xoo* yang di investasi pada media tanam padi dengan aplikasi ekstrak tapak liman dan bakteriofag XooM01 dengan 4 perlakuan dan 6 kali pengulangan.

T0 : 50 ml H₂O

T1 : 50 ml larutan ekstrak tapak liman (10 mg/ml)

T2 : MOI 1 bakteriofag XooM01 sebanyak 50 ml (10⁸ PFU/ml)

T3 : Larutan ekstrak tapak liman (10 mg/ml) dan MOI 1 bakteriofag XooM01 sebanyak 50 ml (10⁸ PFU/ml)

3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dilaksanakan sebagai berikut:

3.4.1 Persiapan

a. Pembuatan Ekstrak Tapak Liman

Menurut Rejeki et al. (2017), pembuatan ekstrak tapak liman (*Elephantopus scaber*) dimulai dengan memotong daun atau bagian tanaman tapak liman lalu dikeringkan selama 2 minggu pada suhu 32°C. Tanaman tersebut dihaluskan hingga didapatkan serbuk halus. Pembuatan larutan ekstrak tapak liman dilakukan dengan memasukkan 50 g serbuk tapak liman dengan 150 ml pelarut metanol. Melakukan shaker selama 48 jam dan selanjutnya menyaring menggunakan penyaring buncher hingga nantinya diperoleh larutan ekstrak tapak liman yang bebas dari ampas. Larutan ekstrak tapak liman kemudian diuapkan dengan menggunakan alat rotari evaporator (Hahnvapor) pada suhu 45°C dengan tujuan mendapatkan larutan ekstrak yang kental.

b. Isolasi Bakteri *Xoo*

Isolat bakteri *Xoo* diisolasi di Desa Kranjingan, Kecamatan Sumbersari, Kabupaten Jember. Isolat bakteri *Xoo* diisolasi pada media *yeast dextrose agar* (YDA) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-72 jam. Koloni bakteri kemudian diamati dengan ciri koloni berwarna kuning, berbentuk mukoid, bulat dan cembung. Koloni yang diduga bakteri patogen *Xoo* diambil dan dikulturkan kembali pada cawan petri baru agar diperoleh biakan murni (Shobha et al., 2020). Isolat bakteri *Xoo* selanjutnya dilakukan uji postulat koch dan identifikasi molekuler menggunakan primer spesifik JLXooF dan JLXooR dengan ukuran amplikon diperkirakan sekitar 230 bp (Rejeki et al., 2021).

c. Isolasi Bakteriofag XooM01

Isolat bakteriofag diperoleh dari hasil isolasi di Desa Mumbulsari, Kecamatan Mumbulsari, Kabupaten Jember. Tahapan isolasi fag diikuti dengan melakukan pekerjaan spot assay dan plaque assay hingga diperoleh plak tunggal. Plak tunggal kemudian diambil dan diperbanyak dengan media YDB lalu shaker hingga 24 jam

dan difiltrasi melalui 0,45- μm filter membran (Himedia), hingga diperoleh larutan stok. Partikel murni bakteriofag kemudian disimpan pada suhu rendah yaitu sekitar 4 °C untuk digunakan untuk keperluan tahapan selanjutnya (Addy et al., 2019). Plaque yang muncul kemudian diamati dan dihitung untuk mengetahui tingkat kepekatan titer fag.

d. Persiapan Media Tanam Padi

Media tanam padi diperoleh dari tanah padi sawah. Tanah distrelisisasi dan dimasukkan ke dalam wadah percobaan dengan ukuran 19 cm \times 19 cm \times 7 cm, pada kondisi tanah kering lembab. Masing – masing bak plastik akan diambil sampel terdahulu sebagai sampel awal. Terdapat empat wadah percobaan sebagai tempat uji yaitu terdiri dari kontrol positif dengan perlakuan ekstrak tapak liman, bakteriofag XooM01, kombinasi ekstrak tapak liman dan bakteriofag XooM01 serta kotak plastik kontrol negatif (H_2O).

3.4.2 Pelaksanaan

a. Pengaplikasian Bakteri *Xoo*

Pengaplikasian patogen *Xoo* dilakukan pada media tanam padi dengan suspensi bakteri pada tingkat kerapatan optik ($\text{OD}_{600} = 1,0$) (Yu et al., 2015). Inokulasi bakteri patogen dilakukan dengan cara menuangkan suspensi patogen *Xoo* sebanyak 50 ml (10^8 CFU) ke dalam masing-masing wadah percobaan. Setelah penuangan patogen *Xoo* dilakukan pemerataan dengan cara mengaduk tanah hingga suspensi patogen merata.

b. Pengaplikasian Ekstrak Tapak Liman dan Bakteriofag XooM01

Pengaplikasian pada media tanam dilakukan dengan menuangkan bakteriofag XooM01 dan ekstrak tapak liman pada 3 hari setelah inokulasi patogen bakteri *Xoo*. Metode penunangan pada tanah seperti yang dilakukan di penelitian Ahmad et al. (2017), kecuali bakteriofag XooM01. Penuangan MOI 1 bakteriofag XooM01 sebanyak 50 ml (10^8 PFU/ml) dan 50 ml ekstrak tapak liman (10 mg/ml). Pengambilan sampel dilakukan pada 1 hari sebelum aplikasi patogen *Xoo*, 0 hari

setelah inokulasi (HSI), dan 2, 4, 6 hari setelah aplikasi (HSA) pada masing-masing perlakuan H₂O, ekstrak tapak liman (*E. scaber*) dan bakteriofag XooM01 serta kombinasi keduanya. Sampel tanah yang diambil sebagai bahan untuk ekstraksi DNA disimpan pada suhu -20°C.

c. Ekstraksi DNA

Sampel masing-masing tanah diambil dan diekstraksi DNA, dengan mengambil tanah setiap sampel perlakuan sebanyak 6 kali ulangan lalu dikomposit. Ekstraksi DNA menggunakan kit by *ZymoBiomics*TM *DNA Miniprep Kit*. Tahapan yang dilakukan mengikuti protokol dengan sedikit modifikasi yaitu keringkan anginkan sampel tanah, lalu tambahkan 250 mg sampel tanah dan 750 µl *ZymoBiomics*TM *Lysis Solution* ke dalam *BashingBead lysis tube* dan tutup rapat. Lakukan vortex selama 2 menit, lalu sentrifus dengan kecepatan 10.000 × g selama 1 menit. Pindahkan 400 µl supernatan ke spin III filter dan sentrifus pada 8.000 × g selama 1 menit dan buang spin III filter. Pindahkan supernatan ke tube 2 ml, lalu tambahkan 1,200 µl *ZymoBiomics*TM *DNA Binding Buffer* dan lakukan pipeting. Pindahkan 800 µl ke spin II CR column dan sentrifus pada 10.000 × g selama 1 menit. Buang cairan pada collection tube lalu ulangi kembali pada langkah sebelumnya.

Tambahkan 400 µl *ZymoBiomics*TM *DNA Wash Buffer 1* ke spin II CR column dan sentrifus pada 10.000 × g selama 1 menit, lalu buang supernatan. Tambahkan 700 µl *ZymoBiomics*TM *DNA Wash Buffer 2* ke spin II CR column dan sentrifus pada 10.000 × g selama 1 menit. Tambahkan 200 µl *ZymoBiomics*TM *DNA Wash Buffer 2* ke spin II CR column dan sentrifus pada 10.000 × g selama 1 menit. Lakukan sentrifus kembali pada 10.000 × g selama 1 menit. Pindahkan spin II CR column ke tube 1,5 ml dan tambahkan ± 100 µl (minimal 50 µl) *ZymoBiomics*TM *DNase/RNase Free Water* ke tube dan inkubasi selama 1 menit. Sentrifugasi pada 10.000 × g selama 1 menit untuk mengelusi DNA. Apabila semua langkah telah dilaksanakan maka dapat digunakan sebagai bahan PCR. Sampel yang telah diekstraksi dapat disimpan pada suhu -20°C.

3.4.3 Analisis

a. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Memasukkan bahan-bahan yang digunakan ke dalam Mesin PCR Thermal Cycler (Bio-Rad) seperti Aquades Steril, Primer forward dan reverse, PCR Mix serta template DNA. Tahap analisis dilakukan dengan mendeteksi adanya urutan gen dalam *X. oryzae* dilakukan melalui reaksi berantai polimerase (PCR) menggunakan primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') dan 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3'). Penggunaan PCR dilakukan sekitar 35 siklus, dengan rincian pra-denaturasi pada 94°C selama 2 menit, diikuti oleh denaturasi pada 94°C selama 1 menit, annealing pada 55°C selama 2 menit, extension 72°C selama 2 menit, dan langkah extension akhir pada 72°C selama 5 menit. Hasil dari PCR nantinya akan dilakukan elektroforesis gel dalam gel agarosa dan pelarut TAE 1×, diikuti dengan pewarnaan dengan etidium bromida. Bakteri *Xoo* pada primer PCR universal bakteri (16SrDNA) dapat diperkirakan dengan ukuran 1500 bp (Jonit et al., 2016).

b. Elektroforesis

Analisis hasil PCR dilanjutkan dengan menggunakan alat elektroforesis (Major science). Tahapan yang dilakukan yaitu membuat gel agarose dengan konsentrasi 1,2 % dengan mencampurkan 0,6 gram agarose kedalam 50 ml pelarut TAE (Tris Acetic acid EDTA) 1×. Cairan agarose dan TAE 1× dididihkan hingga butiran agarose larut kedalam TAE. Larutan diletakkan pada suhu ruang selama 10 menit, agar suhu larutan menurun. Menambahkan EtBr (Etidium bromida) dengan konsentrasi 5 µg. Menuangkan agarose kedalam cetakan lalu diamkan selama 30 menit pada suhu ruang hingga larutan memadat. Memindahkan agar yang telah padat kedalam tangki elektroforesis yang telah terisi larutan TAE buffer 1×. Memasukkan 10 µl sampel DNA, kemudian dialiri alat elektroforesis dengan arus listrik bertegangan 75 volt selama 40 menit. Hasil elektroforesis selanjutnya divisualisasikan dengan bantuan alat UV *Gel Documentation System* (Major Science), maka fragmen DNA akan memendarkan warna putih dan diukur dengan membandingkan posisi pita DNA pada marker gel.

3.5 Variabel Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan mengamati populasi bakteri *Xoo* yang telah diekstraksi dari tanah. Hal yang diamati yaitu sampel pada 1 hari sebelum aplikasi patogen *Xoo*, 0 HSI, dan 2, 4, 6 HSA. Hasil serangkaian amplifikasi diperoleh amplikon DNA yang telah divisualisasi dengan *UV Gel Documentation System* (Major Science) kemudian akan dikuantifikasi dengan metode sqPCR dengan membandingkan antar perlakuan kontrol, perlakuan dan waktu pengamatan. Populasi bakteri target kemudian dikuantifikasi dengan software ImageJ versi 1.53t. Kuantifikasi ImageJ dilakukan dengan menganalisis dan mengukur tingkat perbedaan intensitas cahaya pada masing-masing fragmen DNA (Arslan et al., 2021). Hasil pengukuran dari imageJ kemudian dibandingkan dengan data pembanding yang sebelumnya telah disiapkan, kemudian dibuat persamaan regresi pada populasi 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 . Hasil akhir yang didapat akan dihubungkan terhadap tinggi rendahnya populasi bakteri patogen pada setiap perlakuan dan waktu dalam bentuk grafik.

3.6 Analisis Data

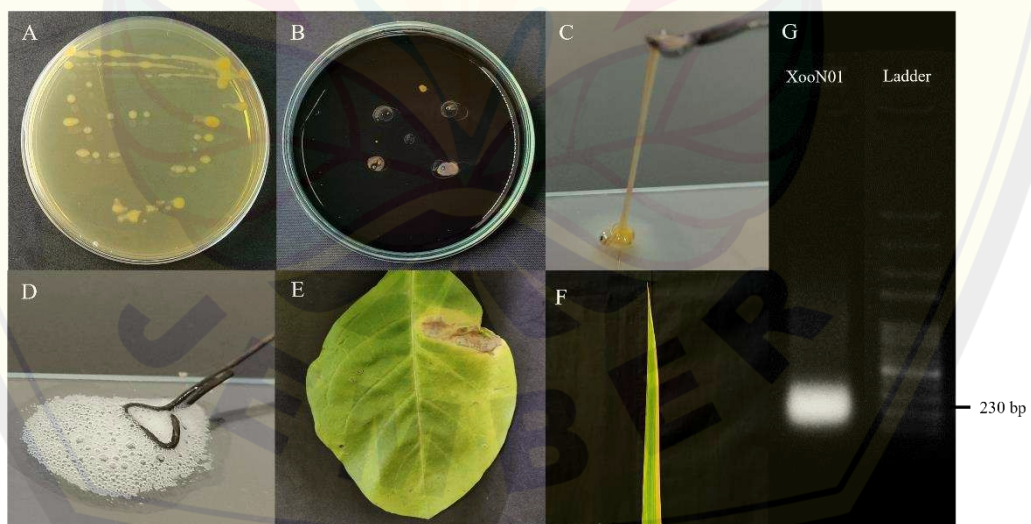
Data yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis dengan menggunakan analisis deskriptif semi kuantitatif.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Patogen Hawar Daun Bakteri

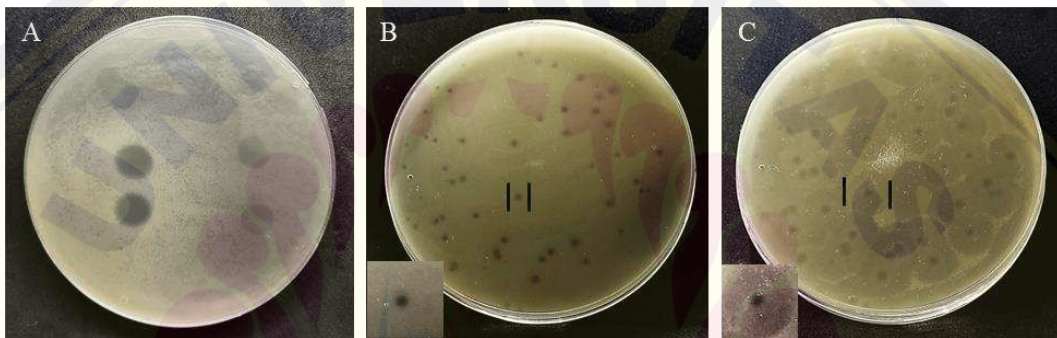
Isolat XooN01 diisolasi dari tanaman padi yang bergejala hawar daun bakteri di Desa Kranjingan, Kecamatan Sumbersari, Kabupaten Jember. Bakteri XooN01 dimurnikan, diidentifikasi sifat biokimia dan molekulernya. Hasil yang diperoleh berupa koloni tunggal berwarna kuning, berbentuk bulat, cembung, permukaan halus dan tepi rata pada media YDA (Gambar 4.1A). Uji sifat biokimia bakteri XooN01 pada uji hidrolisis pati diperoleh reaksi negatif dengan tanda tidak ada zona bening pada sekitar kultur, selain itu pada uji gram KOH dan H₂O₂ diperoleh reaksi positif dengan tanda lengket dan gelembung (Gambar 4.1B, C dan D). Uji hipersensitif dan uji virulensi diperoleh reaksi positif dimana Isolat XooN01 diinokulasikan pada daun tembakau mengalami gejala nekrosis (Gambar 4.1E) serta terdapat gejala setelah diinokulasikan kembali ke daun padi (Gambar 4.1F). Identifikasi molekuler bakteri XooN01 diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dan menghasilkan pita dengan ukuran 230 bp (Gambar 4.1G)



Gambar 4.1 (A) Koloni tunggal bakteri pada media YDA, (B) Hasil uji hidrolisis pati, (C) Bakteri setelah diuji KOH membentuk cairan lengket, (D) Terdapat gelembung pada bakteri yang diuji menggunakan H₂O₂, (E) Reaksi hipersensitif pada daun tembakau, (F) Munculnya gejala hawar daun pada uji virulensi, (G) Visualisasi pita DNA diperoleh ukuran ± 230 bp dengan primer JLXoo

4.1.2 Bakteriofag XooM01

Bakteriofag XooM01 diisolasi dari sampel tanah padi sawah di Desa Mumbulsari, Kecamatan Mumbulsari, Kabupaten Jember. Deteksi awal adanya fag Xoo dapat ditandai dengan terbentuknya zona bening pada uji spot assay bakteriofag terhadap bakteri inang (Gambar 4.2A). Hasil uji plak assay juga diperoleh morfologi plak bulat, bening dan dikelilingi halo transparan pada media lapis ganda agar YDA. Seiring berjalannya waktu ukuran diameter plak meningkat dari waktu ke waktu dengan rincian yaitu pada hari pertama sekitar 2 mm menjadi 4,6 mm pada hari ke empat (Gambar 4.2B dan C). Stok pekat dari fag XooM01 memiliki titer $1,6 \times 10^{11}$ PFU/ml



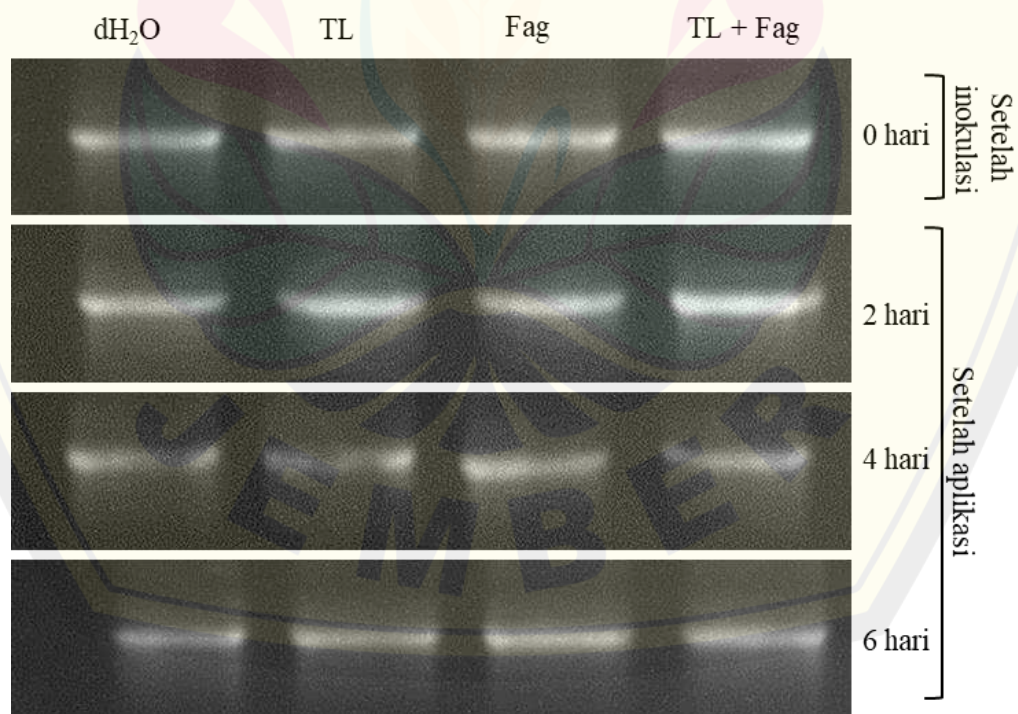
Gambar 4.2 (A) Hasil spot assay fag terhadap bakteri inang dengan terbentuknya zona bening, (B) Fag XooN01 membentuk plak setelah dilakukan plak assay selama 1 hari dengan bakteri XooN01, (C) Ukuran halo semakin besar setelah 4 hari dinkubasi pada suhu ruang.

4.1.3 Dinamika Populasi Bakteri XooN01

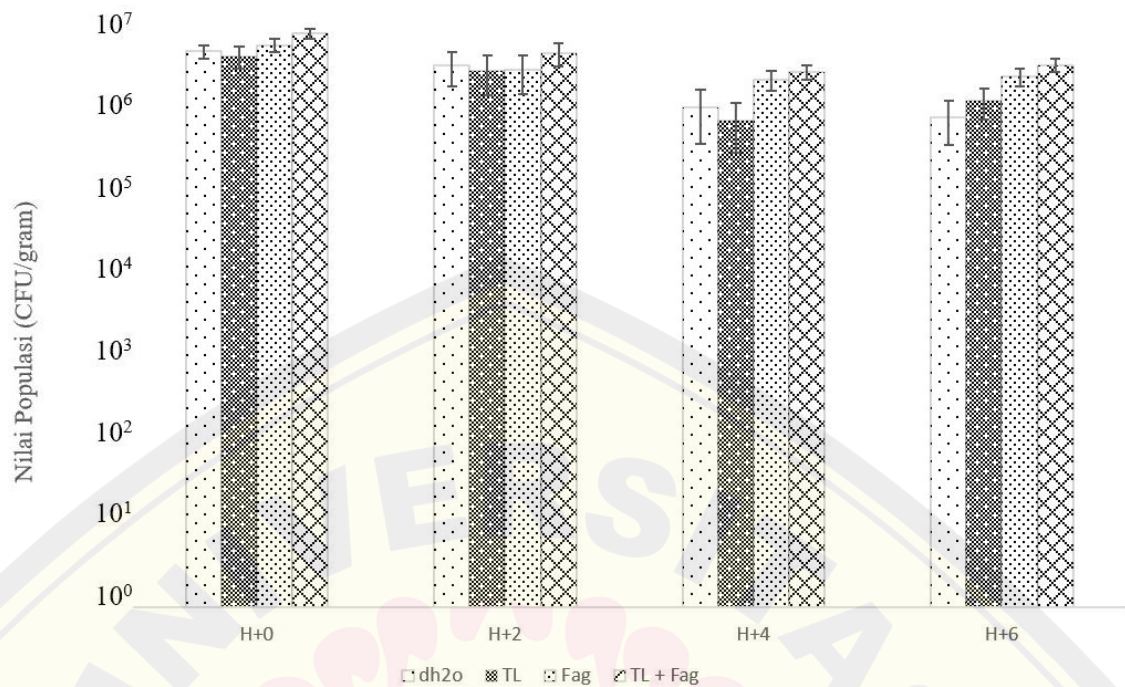
Hasil dari serangkaian pelaksanaan penelitian didapatkan bahwa adanya patogen *Xoo* yang ditunjukkan dengan munculnya amplicon DNA dengan ukuran ± 1500 bp. Pengukuran tingkat intensitas kecerahan amplicon DNA menggunakan software imageJ, hasil pengukuran intensitas amplicon DNA dari imageJ nantinya akan dikuantifikasi untuk mengetahui adanya perbedaan nilai populasi *Xoo* pada masing-masing perlakuan dan waktu pengamatan. Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan tingkat intensitas kecerahan amplicon DNA pada 0 HSI dibanding hari lainnya di semua perlakuan. Amplicon DNA di semua perlakuan pada 0 HSI memiliki pita DNA yang terang dibanding hari lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa diduga adanya pengaruh akibat penambahan atau inokulasi

bakteri *Xoo* sebelum inokulasi dan sesudah inokulasi pada setiap perlakuan terhadap nilai dari suatu kepadatan populasi bakteri *Xoo* pada tanah. Terdapat perbedaan namun tidak signifikan terkait intensitas kecerahan amplicon DNA pada 4 hingga 6 HSA, hal tersebut diduga karena pengaruh dari masing-masing perlakuan baik tapak liman, bakteriofag maupun kombinasi tapak liman + bakteriofag dalam mempengaruhi naik turunnya populasi patogen *Xoo* (Gambar 4.3).

Secara umum di semua perlakuan pada 0 HSI mempunyai nilai populasi *Xoo* paling tinggi dibanding hari lainnya. Pada semua perlakuan di 2 HSA populasi *Xoo* cenderung stabil dibanding 0 HSI. Beda halnya di perlakuan tapak liman, bakteriofag serta kombinasi tapak liman + bakteriofag di 4 hingga 6 HSA kondisi populasi *Xoo* cenderung meningkat. Fenomena yang kontras terjadi pada perlakuan dH₂O (kontrol), yang mana populasi *Xoo* cenderung menurun hingga 6 HSA. Populasi *Xoo* paling rendah terjadi pada 4 HSA di semua perlakuan. Selain itu perlakuan tapak liman di 4 HSA memiliki populasi bakteri paling rendah dibanding perlakuan lain, namun tidak signifikan dibanding kontrol. Nilai populasi *Xoo* di perlakuan tapak liman di 4 HSA yaitu sekitar $6,74 \times 10^5$ CFU/gram. (Gambar 4.4).



Gambar 4.3 Hasil elektroforesis dari PCR pada setiap perlakuan dan waktu pengamatan



Gambar 4.4 Nilai populasi bakteri pada setiap perlakuan dan waktu pengamatan

4.2 Pembahasan

Isolat bakteri yang telah diisolasi dari lapang didapatkan hasil serupa dengan ciri yaitu koloni bakteri *X. oryzae* berwarna kuning pucat hingga berwarna kuning, berlendir, bentuk bulat dan cembung (Wahyudi et al., 2011; Jabeen et al., 2012). Uji sifat biokimia juga diperoleh reaksi positif berupa uji gram dan katalase, hal tersebut selaras dengan penelitian Jabeen et al. (2012), selain itu hasil uji pati tidak menunjukkan zona bening pada sekitar koloni yang diindikasikan bakteri tidak menghidrolisis pati. Menurut Samanta et al. (2014), bakteri yang tidak menghidrolisis pati dapat disimpulkan termasuk strain dari *Xanthomonas oryzae* tidak menghasilkan enzim ekstraseluler yaitu alfa-amilase. Uji hipersensitif diperoleh hasil yang sama dengan penelitian Masnilah et al. (2020), gejala yang tampak pada daun berupa perubahan warna dan menjadi kuning (klorosis) diikuti oleh gejala nekrosis. Konfirmasi PCR bakteri XooN01 diperoleh hasil yang selaras dengan penelitian Rejeki et al., (2021) Amplikon DNA bakteri XooJ2 didapatkan ukuran ± 230 bp menggunakan primer spesifik.

Bakteriofag yang berhasil diisolasi dari lapang memiliki morfologi plak bening bulat, dan ditemukan adanya halo yang mengelilingi bagian bening plak yang mengindikasikan adanya aktivitas polisakarida depolimerase. Ukuran halo transparan meningkat setelah beberapa hari dan meluas di permukaan top agar hingga saling menyatu dengan plak-plak di sekitarnya (Gambar 4.2). Morfologi plak dapat menjadi parameter dalam karakterisasi fag. Hasil uji didapatkan morfologi plak yang semula berukuran kecil dan seiring berjalannya waktu menjadi membesar. Ukuran dari plak yang dibentuk oleh fag terisolasi ditemukan antara 2 sampai 5 mm, diameter plak meningkat lebih lanjut dan membentuk zona bening di sekitar daerah lisis ketika waktu inkubasi ditingkatkan menjadi 36 sampai 48 jam (Ranjani et al., 2018). Hal yang sama juga diungkapkan oleh Liu et al. (2021), plak fag terbentuk dengan kisaran ukuran 4–6 mm dengan titer fag yang tinggi (10^8 – 10^9 PFU/mL). Terjadinya zona bening pada plak bakteriofag bisa disebut juga halo, yang menandakan aktifnya depolimerase sehingga polisakarida bakteri telah rusak atau hancur (Harper et al., 2014). Fag juga mampu menginduksi enzim untuk menurunkan eksopolisakarida (EPS) pada bakteri gram negatif, yang dicirikan oleh lingkaran cahaya dengan ukuran berbeda dan mengelilingi plak yang diperoleh setelah terinfeksi bakteri inang (Parasion et al., 2014).

Populasi bakteri dapat divisualisasikan dengan amplikon DNA yang terang pada hasil PCR (Gambar 4.3). Amplikon DNA yang terang dapat menunjukkan bahwa populasi bakteri cukup untuk terdeteksi pada PCR. Bakteri *C. perfringens* dan *C. difficile* dapat terdeteksi dengan sensitivitas 10^2 - 10^4 CFU/g (Wise & Siragusa 2005; Ganji et al., 2017). Selain itu laporan dari Lu et al. (2014) menyatakan *Xoo* pada primer spesifik terdeteksi pada 5×10^{-4} ng/ μ L. Amplikon DNA yang diamplifikasi dengan menggunakan primer spesifik tidak dapat terdeteksi, hal tersebut diduga karena populasi bakteri yang rendah dan kurang stabilnya primer terhadap adanya penghambat PCR. Adanya penghambat pada sampel dapat mempengaruhi aktifitas DNA polimerase sehingga kinerja PCR dan sensitivitas deteksi terganggu (Kaltenboeck & Wang, 2005). Salah satu penghambat DNA yang diekstraksi dari tanah yaitu senyawa organik. Kontaminasi DNA berupa senyawa organik pada tipe dan kegunaan lahan yang berbeda dapat berpengaruh terhadap penghambatan Taq

polimerase dalam proses amplifikasi, terutama kaitanya dengan jumlah total sumber karbon pada senyawa organik pada tanah (Wnuk et al., 2020). Cara alternatif lain yaitu menggunakan primer yang dapat mendeteksi populasi bakteri walaupun terdapat penghambat PCR yaitu primer universal bakteri. Salah satu preferensi dalam mengatasi permasalahan tersebut yaitu melakukan normalisasi populasi pada H-1 sebelum inokulasi agar dapat mengetahui perbandingan populasi bakteri sebelum inokulasi patogen dan setelah inokulasi patogen maupun setelah perlakuan. Primer yang digunakan untuk mendeteksi spesies bakteri secara universal yaitu 16SrDNA, primer tersebut mempunyai sensitivitas yang tinggi dengan dibuktikan terdeteksinya ampikon DNA pada hasil PCR (Gambar 4.3). Menurut dari Fukuda et al. (2016), Urutan nukleotida diperkirakan sepanjang 16SrDNA dapat mengklasifikasikan spesies bakteri, selain itu hampir seluruh panjang gen biasanya diamplifikasi dengan PCR menggunakan 27F dan 1492R. Berdasarkan hasil gen 16S menunjukkan kesesuaian tingkat genus 96% dan tingkat kesesuaian tingkat spesies 87,5% (Srinivasan et al., 2015). Hasil ukuran dari ampikon DNA sesuai dengan penelitian Jonit et al. (2016), isolat Xoo-9 dan XOR diperkirakan berukuran ± 1500 bp.

Tingginya populasi bakteri pada 0 HSI di semua perlakuan dipengaruhi oleh penuangan bakteri pada tanah (Gambar 4.4). Bakteri patogen pada tanah sisa pertanaman mampu bertahan hidup hingga nantinya menemukan inangnya kembali. Patogen bakteri umumnya mampu tumbuh dengan kondisi baik meskipun tidak ada tanaman inangnya (Bradford et al., 2013). Struktur tubuh khusus juga berperan penting dalam membantu bakteri bertahan hidup pada tanah. Hal tersebut juga didukung oleh Stevik et al. (2004), yaitu pelengkap struktur permukaan bakteri seperti flagela, pili, curli, dan polisakarida diduga memainkan peran kunci dalam transportasi dan penempelan bakteri sehingga terserap ke dalam tanah. Populasi bakteri pada perlakuan dH₂O cenderung menurun, hal tersebut diduga erat kaitanya dengan siklus dari hidup patogen serta tersedianya nutrisi yang cukup. Patogen *Xoo* yang berumur lebih dari seminggu diduga telah mencapai fase kematian. Menurut Samanta et al. (2014), penurunan populasi patogen *Xoo* berkurang setelah 96 jam. Keberadaan nutrisi juga mempengaruhi patogen *Xoo*

dalam bertahan diluar tanaman inang, salah satunya tanah yang mengandung unsur karbon (C). Menurut Demoling et al. (2007), kurangnya unsur karbon pada tanah akan membatasi pertumbuhan bakteri, beda halnya dengan unsur nitrogen dan fosfor yang memberikan efek netral bahkan negatif pada populasi bakteri.

Terjadi fenomena tidak berbeda nyata populasi patogen *Xoo* pada 0 HSI dibanding 2 HSA pada semua perlakuan. Hal tersebut diduga proses penyerapan tapak liman dan bakteriofag masih berlangsung pada tanah. Struktur dan senyawa kompleks yang ada di dalam tanah juga mempegaruhi cepat lambatnya proses penyerapan. Menurut Wang & Wang (2015), adsorpsi antibiotik sangat dipengaruhi oleh sifat fisikokimia dasar tanah seperti pH, kekuatan ionik, tekstur, dan bahan organik. Tanah dengan kadar air cukup juga berpengaruh dalam adsorpsi dan desorpsi antibiotik yang diaplikasikan (Cycon et al., 2019). Selain itu pada perlakuan fag diduga proses penyerapan dipengaruhi jenis dan partikel tanah terhadap interaksi bakteriofag dan inangnya. Perlu diketahui menurut Ye et al. (2019), jenis dan ukuran partikel mineral tanah juga mempengaruhi aktivitas fag, serta infeksi dan lisis inang bakteri. Ukuran pori-pori tanah juga memainkan peran penting dalam penyerapan air ke dalam tanah. Proporsi dan ukuran pori yang berisi air pada tanah dapat berpengaruh terhadap pergerakan fag (Shein & Devin 2007). Kadar air yang ada pada tanah juga memberikan pengaruh terhadap aktifitas fag dengan inangnya (Zhao et al., 2019). Kadar air menentukan frekuensinya kontak antara fag dan bakteri inang di dalam tanah dengan mempengaruhi mobilitas dan migrasi fag di dalam tanah, selain itu air yang menipis akibat penguapan dapat menyebabkan hilangnya aktivitas fag sepenuhnya (Ye et al., 2019).

Perbedaan tingkat populasi patogen pada 4 HSA dibanding 0 HSI diduga karena pengaruh dari perlakuan tapak liman. Populasi patogen yang rendah diduga disebabkan tapak liman mempunyai efek dari senyawa bioaktif yang bersifat antibakteri. Tapak liman diketahui memiliki senyawa bioaktif berupa flavonoid, alkaloid dan tanin (Rejeki et al., 2017). Senyawa bioaktif tersebut dapat mengurangi kepadatan bakteri dengan beberapa mekanisme yang berbeda. Mekanisme senyawa bioaktif pada tapak liman antara lain flavonoid yang mengganggu permeabilitas membran bakteri (Borges et al., 2015; Xie et al., 2015), alkaloid yang mengganggu

depolarisasi sel membran sehingga isi sitoplasma terjadi kebocoran (Lahiri et al., 2019), tanin yang mampu menonaktifkan adhesin mikroba, enzim, dan protein membran (Borges et al., 2015). Penurunan populasi patogen *Xoo* terjadi di 4 HSA meskipun tidak signifikan, hal ini diduga karena fag telah melakukan interaksi dengan bantuan enzim depolimerase dalam mendegradasi EPS dari bakteri inang sebelum memasuki siklus lisogenik. Bakteriofag dapat menyerap, menginvasi, dan melisiskan bakteri inang bahkan di dalam biofilm dengan bantuan enzim depolimerase (Yan et al., 2013; Pires et al., 2016). Stabilitasnya populasi diduga fag yang telah diaplikasikan termasuk fag temperate, hal tersebut akan mempengaruhi bakteri inang untuk tetap hidup meskipun berada di lingkungan yang tidak mendukung.

Kondisi populasi *Xoo* yang terjadi pada perlakuan bakteriofag saja dan kombinasi diperoleh hasil beda nyata dengan perlakuan tapak liman, bahkan perlakuan kombinasi berbeda nyata dengan perlakuan kontrol. Fenomena tersebut diduga perlakuan yang melibatkan bakteriofag memiliki dampak terhadap dinamika populasi *Xoo*. Umumnya penggunaan fag yang dikombinasikan dengan pengendalian lain dapat meningkatkan efektifitas dalam menekan populasi patogen. Secara keseluruhan upaya penggabungan fag, antibiotik dan antimikroba dapat bersifat sinergis dalam mengurangi kepadatan bakteri dalam biofilm (Arkturk et al., 2019; Nikolich & Filippov, 2020). Disisi lain adanya kemungkinan fag yang dikombinasikan dengan antimikroba mampu memberi efek netral bahkan positif bagi inangnya. Hal itu didukung oleh Pires et al. (2017), kombinasi fag dengan antibiotik tidak selalu menghasilkan peningkatan efektifitas dalam melisiskan bakteri ataupun menghilangkan biofilm. Misalnya, fag litik *K. pneumoniae* KPO1K2 digunakan sendiri atau dikombinasikan dengan ciprofloxacin untuk menghancurkan sel bakteri *K. pneumoniae* yang berada di dalam biofilm diperoleh hasil tidak ada perbedaan yang signifikan (Bedi et al., 2009). Kondisi tersebut diduga selain fag dapat menguntungkan dalam melisiskan patogen inang, namun juga mampu meningkatkan populasi bakteri.

Diketahui beberapa fag yang digunakan sebagai terapi fag dimungkinkan bersifat temperate, dimana fag beralih dari siklus litik menjadi lisogenik maupun

sebaliknya. Diketahui beberapa fag yang digunakan sebagai terapi fag dimungkinkan bersifat temperate, dimana fag beralih dari siklus litik menjadi lisogenik maupun sebaliknya. Fag temperate dapat mengikuti salah satu dari dua skenario, yang mana fag melisiskan sel inang kemudian melepaskan virion baru atau berintegrasi (profag) ke dalam kromosom bakteri (Stone et al., 2019). Fag yang memasuki siklus lisogenik dapat memodifikasi tubuh inangnya dengan beberapa modifikasi yang dilakukan, sehingga nantinya dapat berpengaruh terhadap populasi inangnya. Perubahan permukaan sel atau selubung sel bakteri ditimbulkan oleh fag lisogenik (Denomy et al., 2016). Selain itu fag lisogenik mendorong terjadinya modifikasi atau hilangnya reseptor pengikat fag pada permukaan sel bakteri (Hasan & Ahn, 2022). Permukaan sel yang berubah dapat mempengaruhi ketahanan bakteri terhadap antimikroba maupun fag. Keuntungan fag lisogenik diketahui dapat mendukung inangnya untuk beradaptasi di lingkungan yang miskin nutrisi (Olszak et al., 2017). Kondisi lingkungan yang terpapar antimikroba pada suatu tanah akan mendorong inang maupun fag untuk beradaptasi. Diketahui bakteri *P. aeruginosa* yang terpapar fag akan melakukan seleksi untuk mengembangkan resistensi, sekaligus mengganggu efektivitas dari pompa efflux untuk mengusir antibiotik kimia (Chan et al., 2016). Laporan yang sama juga dijelaskan oleh Li et al. (2021), fag memicu trade-off pada *P. aeruginosa* yang mana terjadi resistensi bakteri dengan mengganggu fungsi pompa efflux, sehingga meningkatkan sensitivitas terhadap antibiotik. Beberapa literatur yang telah disebutkan diatas dapat disimpulkan bahwa dinamika populasi *Xoo* disebabkan pengaruh fag dalam mengubah struktur dan metabolisme inangnya, sehingga efek dari fag yang dikombinasikan tapak liman akan berbeda dibanding perlakuan tapak liman saja.

Tidak beda nyata populasi patogen *Xoo* pada perlakuan tapak liman dengan kontrol pada 4 HSA dan meningkatnya populasi di hari berikutnya diduga disebabkan adanya kemungkinan berkembangnya bakteri yang bertahan terhadap pengaruh aktivitas antimikroba. Patogen *Xoo* atau bakteri gram negatif diduga mempunyai mekanisme dalam melindungi dan mengurangi efek antimikroba. Menurut Zhou et al. (2015), Bakteri dapat membentuk pertahanan dimulai dengan memanfaatkan biofilm, dinding sel, membran sel, pompa efflux yang terbungkus

serta perubahan bahan intraseluler dan regulasi gen untuk melindungi diri dari bahaya bakterisida. Antimikroba dapat menurunkan populasi bakteri yang rentan dan mendorong pertumbuhan bakteri resisten terhadapnya (Świeciło & Zych-Wezyk, 2013). Menurut Li et al. (2017), kelangsungan hidup populasi bakteri di bawah tekanan antibiotik dapat memfasilitasi munculnya resistensi, misalnya meningkatkan laju mutasi.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian bahwa perlakuan yang menunjukkan penurunan populasi *Xoo* paling rendah terjadi pada perlakuan tapak liman di 4 HSA, dengan nilai populasi $6,74 \times 10^5$ CFU/gram. Namun di semua perlakuan terjadi peningkatan populasi pada 6 HSA, kecuali kontrol. Perlakuan bakteriofag dan kombinasi tapak liman + bakteriofag tidak menunjukkan efek penurunan populasi *Xoo* yang signifikan hingga 6 HSA.

5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya perlu dipertimbangkan penggunaan primer spesifik *Xoo* yang stabil dalam proses PCR sebagai antisipasi adanya penghambat PCR pada sampel yang diekstraksi dari tanah. Selain itu perlu dilakukan aplikasi kembali untuk menghindari naiknya populasi patogen *Xoo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Addy, H. S., Ahmad, A. A., & Huang, Q. (2019). Molecular and biological characterization of *Ralstonia* phage RsoM1USA, a new species of P2virus, isolated in the USA. *Front Microbiol.* 10: 267–268.
- Aditya, R. H., Wiwiek, S. W., & Paniman, A. M. (2015). Ketahanan Lapangan Lima Genotipe Padi terhadap Penyakit Hawar Daun Bakteri. *Fitopatologi Indonesia.* 11(5): 159–165.
- Ahmad, A. A., Stulberg, M. J., Mershon, J. P., Mollov, D. S., & Huang, Q. (2017). Molecular and biological characterization of ϕ Rs551, a filamentous bacteriophage isolated from a race 3 biovar 2 strain of *Ralstonia solanacearum*. *Plosone.* 12(9): 1-19.
- Akturk, E., Oliveira, H., Santos, S. B., Costa, S., Kuyumcu, S., Melo, L. D. R., & Azeredo, J. (2019). Synergistic Action of Phage and Antibiotics: Parameters to Enhance the Killing Efficacy Against Mono and Dual-Species Biofilms. *Antibiotics.* 8(103): 2-19.
- Andriani, C. R., Frida, O., & Risa, N. (2016). Uji Zona hambat Ekstrak Etil Asetat Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Kedokteran Syiah Kuala.* 16(1): 1-5.
- Antiabong, J. F., Ngoepe, M. G., & Abechi, A. S. (2016). Semi-Quantitative Digital Analysis Of Polymerase Chain Reaction-Electrophoresis Gel: Potential Applications In Low-Income Veterinary Laboratories. *Veterinary World,* 9(9), 935.
- Arslan, M., Tezcan, E., Camci, H., & Avci, M. K. (2021). Effect of DNA Concentration on Band Intensity and Resolution in Agarose Gel Electrophoresis. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi,* 14(3): 326-333.
- Asysyuura., Abdjad, A. N., Kikin, H. M., & Sudir. (2017). Identifikasi Patotipe *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dari Tanaman Padi di Sulawesi Selatan. *Fitopatologi Indonesia.* 13(3): 73–80.
- Badan Pusat Statistik. (2022). Provinsi Jawa Timur Dalam Angka. Surabaya: BPS Provinsi Jawa Timur.
- Badan Pusat Statistik. (2022). Statistik Indonesia. Jakarta: Badan Pusat Statistik.
- Bae, Y. J., Wu, J., Lee, H. J., Jo, E. J., Murugaiyan, S., Chung, E., & Lee, S. W. (2012). Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. *Microbiology and Biotechnology.* 22(12): 1613–1620.

- Balogh, B., Jones, J. B., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2010). Phage Therapy for Plant Disease Control. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 11: 48-57.
- Bedi, M. S., Verma, V., & Chhibber, S. (2009). Amoxicillin And Specific Bacteriophage Can Be Used Together For Eradication Of Biofilm Of *Klebsiella pneumoniae* B5055. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 25, 1145-1151.
- Bennett, A. J., Gary, D. B., David, C., Sally, H., & Peter, M. (2012). Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations. *Biol. Rev.* 87: 52–71.
- Bhattacharyya, D., Duta, S., Sang, M. Y., Jeong, S. C., & Lee, Y. H. (2018). Taxonomic and Functional Changes of Bacterial Communities In The Rhizosphere Of Kimchi Cabbage After Seed Bacterization With *Proteus Vulgaris* JBLS202. *Plant Pathology*. 34(4): 286–296.
- Blagodatskaya, E., & Kuzyakov, Y. (2013). Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology & Biochemistry* 67. 192-211
- Borges, A., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2015). Insights on Antimicrobial Resistance, Biofilms and the Use of Phytochemicals as New Antimicrobial Agents. *Current Medicinal Chemistry*. 22. 2590-2614.
- Bradford, S. A., Morales, V. N. L., Zhang, W., Harvey, R. W., Packman, A. I., Mohanram, A., & Welty, C. (2013). Transport and Fate of Microbial Pathogens in Agricultural Settings. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 43:775–893.
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers in Microbiology*. 8(34): 1-15.
- Chae, J. C., Hung, B. Y., Yu, S. M., Ha, K. L., & Lee, Y. H. (2014). Diversity of bacteriophages infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in paddy fields and its potential to control bacterial leaf blight of rice. *Microbiology And Biotechnology*. 24(6): 740–747.
- Chan, B. K., Sistro, M., Wertz, J. E., Kortright, K. E., Narayan, D., & Turner, P. E. (2016). Phage Selection Restores Antibiotic Sensitivity In MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 6(1), 26717.
- Demoling, F., Figueroa, D., & Baath, E. (2007). Comparison Of Factors Limiting Bacterial Growth In Different Soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 39 2485–2495.

- Denomy, J. B., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME journal*. 10(12): 2854-2866.
- Dhany, N. R., Addy, H. S., & Wahyuni, W, S. (2013). Penggunaan Bakteriofag untuk Kit Detektor Patogen Hawar Bakteri Kedelai. *Fitopatologi Indonesia*. 9(4): 116-122.
- Dyozem, J. P., Hamamoto, H., Ngameni, B., Ngadjui, B. T., & Sekimizu, K. (2013). Antimicrobial Action Mechanism of Flavonoids from *Dorstenia* species. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 7(2): 66-72
- Elbreki, M., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., McAuliffe., & Coffey. (2014). Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. *Journal of Viruses*. 1-20.
- Fadlilah, D. M., Setiawan, A. W., & Handoko, Y. A. (2022). Isolasi, Karakterisasi dan Uji Stabilitas pH Bakteriofag *Xanthomonas oryzae* dari Area Persawahan. *Jurnal Ilmiah Pertanian*. 19(2): 118-125.
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH*. 38(3 : 223-232.
- Ganji, L., Azimirad, M., Farzi, N., Alebouyeh, M., & Hassan, M. (2017). Comparison of the Detection Limits of the Culture and PCR Methods for the Detection of *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, and *Yersinia enterocolitica* in Human Stool. *Pedia Infact*. 5(1):1-7.
- Harper, D. R., Parracho, H. M. R. T., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehma, S., & Morales, S. (2014). Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*. 3(3): 270-284.
- Hasan, M., & Ahn, J. (2022). Evolutionary Dynamics Between Phages And Bacteria As A Possible Approach For Designing Effective Phage Therapies Against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antibiotics*, 11(7), 915.
- Hiradeve, S. M., & Vinod, D. R. (2014). *Elephantopus scaber* Linn.: A review on its ethnomedical, phytochemical and pharmacological profile. *Applied Biomedicine*. 1(2): 49-61.
- Jabeen, R., Iftikhar, T., & Batool, H. (2012). Isolation, Characterization, Preservation and Pathogenicity test of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Causing BLB Disease in Rice. *Pakistan Journal of Botany*. 44(1):261-265.

- Jonit, N. Q., Low, Y. C., & Tan, G. H. (2016). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Biochemical Tests, Rice (*Oryza sativa*), Bacterial Leaf Blight (BLB) Disease, Sekinchan. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 4(3): 63-69.
- Kabeer, F. A., & Prathapan, R. (2014). Phytopharmacological Profile of *Elephantopus scaber*. *Pharmacologia*. 5(8): 272-285.
- Kaltenboeck, B., & Wang, C. (2005). Advances in real-time PCR: Application to clinical laboratory diagnostics. *Advances in clinical chemistry*, 40, 219.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglisc, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 58. 169– 188.
- Kumar, S. S., Perumal P., & Suresh, B. (2004). Antibacterial Studies On Leaf Extract Of *Elephantopus scaber* Linn. *Ancient science of life*. 23(3): 6-8.
- Lahiri, D., Dash, S., Dutta, R., & Nag, M. (2019). Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *Journal of biosciences*, 44(2), 52.
- Li, J., Xie, S., Ahmed, S., Wang, F., Gu, Y., Zhang, C., ... & Cheng, G. (2017). Antimicrobial activity and resistance: influencing factors. *Frontiers in pharmacology*, 8, 364.
- Li, X., He, Y., Wang, Z., Wei, J., Hu, T., Si, J., ... & Teng, T. (2021). A combination therapy of Phages and Antibiotics: Two is better than one. *International Journal of Biological Sciences*, 17(13), 3573.
- Liu, J., Chia, S. L., & Tan, G. H. (2021). Isolation and Characterization of Novel Phages Targeting *Xanthomonas oryzae*: Culprit of Bacterial Leaf Blight Disease in Rice. *PHAGE: Therapy, Applications, and Research*. 2(3): 142-151.
- Lu, W., Pan, L., Zhao, H., Jia, Y., Wang, Y., Yu, X., & Wang, X. (2014). Molecular Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, And *Burkholderia glumae* In Infected Rice Seeds And Leaves. *The Crop Journal*, 2(6): 398-406.
- Masnilah, R., Wahyuni, W. S., Nurcahyanti, S. D., Majid, A., Addy, H. S., & Wafa, A. (2020). Insidensi dan Keparahan Penyakit Penting Tanaman Padi di Kabupaten Jember. *Agritop*. 18(1): 1-12.
- Monteiro, R., Pires, D. P., Costa, A. R., & Azeredo, J. (2019). Phage Therapy: Going Temperate?. *Trends in Microbiology*. 27(4): 368-378.

- Morales, G., Moragrega, C., Montesinos, E. & Llorente, I. (2018). Effects of leaf wetness duration and temperature on infection of *Prunus* by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *PLoS One*. 13(3): 1-15.
- Nasution, S. W., Nursoleha, L., Baby, C. L. Z., & Saharan, R. S. (2020). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Tapak Liman (*Elephantopus scaber* L) Terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae* dengan Metode Difusi Cakram. *Biospecies*. 14(1): 18–23.
- Nikolich, M. P., & Filippov, A. A. (2020). Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. *Antibiotics*. 9(135): 1-13.
- Nurkholis, A., Muhaqiqin, M., & Susanto, T. (2020). Analisis Kesesuaian Lahan Padi Gogo Berbasis Sifat Tanah dan Cuaca Menggunakan ID3 Spasial. *JUITA: Jurnal Informatika*. 8(2): 235-244.
- Nurlailah, L., & Melissa, S. (2018). Aplikasi Asap Cair Suren Terhadap Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Penyebab Hawar Daun Bakteri pada Padi Secara In Vitro. *Agroscience*. 8(2): 198-211.
- Nuryanto, B. (2017). Penyakit hawar pelepah (*Rhizoctonia solani*) pada padi dan taktik pengelolaannya. *Perlindungan Tanaman Indonesia*. 21(2): 63-71.
- Nuryanto, B. (2018). Pengendalian Penyakit Tanaman Padi Berwawasan Lingkungan Melalui Pengelolaan Komponen Epidemik.. *Litbang Pertanian*. 37(1): 1-8.
- Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M. A., & Drulis-Kawa, Z. (2017). Phage life cycles behind bacterial biodiversity. *Current medicinal chemistry*. 24(36): 3987-4001.
- Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L., & Malm, A. (2014). Bacteriophages as an Alternative Strategy for Fighting Biofilm Development. *Polish Journal of Microbiology*. 63(2): 137–145.
- Paski, J. A. I., Faski, G. I., Handoyo, A. F., & Pertiwi, D. A. S. (2017). Analisis Neraca Air Lahan untuk Tanaman Padi dan Jagung di Kota Bengkulu. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. 15(2): 83-89.
- Paulitz, T. C., Schroeder, K. L., & Schillinger, W. F. (2010). Soilborne Pathogens of Cereals in an Irrigated Cropping System: Effects of Tillage, Residue Management, and Crop Rotation. *Plant Disease*. 94(1): 61-68.
- Pietikainen, J., Pettersson, M., & Baath, E. (2005). Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *Microbiology Ecology*. 52. 49–58.

- Pires, D. P., Melo, L. D., Boas, D. V., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2017). Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Current opinion in microbiology*, 39, 48-56.
- Pires, D. P., Oliveira, H., & Melo, L. D. R., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Microbiol Biotechnol.* 100. 2141–2151.
- Pratama, A. R., Sudrajat, S., & Harini, R. (2019). Analisis ketersediaan dan kebutuhan beras di Indonesia tahun 2018. *Media Komunikasi Geografi*, 20(2), 101-114.
- Qi An, S., Neha Potnis, N., Dow, M., Yong, Q. H., Anke, B., Doron, T., Yi, L., Nian, W., Leonidas, B., & Tang, J. L. (2020). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*. 44(1): 1-32.
- Ranjani, P., Gowthami, Y., Samuel, S. G., & Palani, P. (2018). Bacteriophages: A New Weapon for the Control of Bacterial Blight Disease in Rice Caused by *Xanthomonas oryzae*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 46(4): 346–359.
- Rejeki, D., Addy, H. S., & Narulita, E. (2021). Partial Characterization of Bacteriophages from Indonesia and its Potency as Biocontrol of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Intl J Agric Biol.* 25(1):75-80.
- Rejeki, D., Suharto., & Addy, H. S. (2017). Antimicrobial Activity of *Tithonia diversifolia*, *Elephantopus scaber*, and *Kigelia africana* Against Plant Pathogens. *Frontiers in Environmental Microbiology*. 3(4): 56-61.
- Rohaeni, W. R., & Dini, Y. (2019). Keragaman Morfologi Daun Padi Lokal Indonesia dan Korelasinya dengan Ketahanan Penyakit Hawar Daun Bakteri. *Ilmu Pertanian Indonesia (JPI)*. 24 (3): 258-266.
- Rousk, J., & Erland Baath. (2011). Growth of saprotrophic fungi and bacteria in soil. *Microbiol Ecology*. 78. 17–30.
- Samanta, T. T., Samanta, P., & Das, A. (2014). Isolation and characterization of *Xanthomonas oryzae* isolates from different regions of Midnapore district of West Bengal and their ecofriendly management by some medicinal plant extracts. *International Journal of Phytomedicine*. 6. 29-42.
- Shein, E. V., & Devin, B. A. (2007). Current problems in the study of colloidal transport in soil. *Eurasian Soil Science*, 40, 399-408.
- Shobha, B., Lakshmeesha, T. R., Ansari, M. A., Almatroudi, A., Alzohairy, M. A., Basavaraju, S., Alurappa, R., Niranjana, S R., & Chowdappa, S. (2020).

Mycosynthesis of ZnO Nanoparticles Using *Trichoderma* spp. Isolated from Rhizosphere Soils and Its Synergistic Antibacterial Effect against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. MDPI. (6): 1-19.

Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Maeda, M. K., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E. L., & Lynch, S. V. (2015). Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PLoS One*. 10(2):1-22.

Stefani, E., Obradović, A., Gašić, K., Altin, I., Nagy, I. K., & Kovács, T., (2021). Bacteriophage-Mediated Control of Phytopathogenic Xanthomonads: A Promising Green Solution for the Future. MDPI. (9): 1-21.

Stevik, T. K., Kari, A., Ausland, G., & Hanssen, J. F. (2004). Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. *Water Research*. 38. 1355–1367.

Stone, E., Campbell, K., Grant, I., & McAuliffe, O. (2019). Understanding and exploiting phage–host interactions. *Viruses*, 11(6), 567.

Sudir, B., Nuryanto, & Triny, S. K. (2012). Epidemiologi, Patotipe, dan Strategi Pengendalian Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Tanaman Padi. *Iptek Tanaman Pangan*.7(2): 79-87.

Sumarno, M., Anto, B., & Sri, P. (2014). Potensi Rizobakteri Pembentuk Endospora dari Tanaman Padi sebagai Biokontrol Fitopatogen *Xanthomonas oryzae*. *Biologi*. 3(3): 7-17.

Susianto, G., Farid, M. M., Dhany, N. R., & Addy, H. S. (2014). Host Range for Bacteriophages that Infect Bacterial Blight Pathogen on Soybean. *Procedia Environmental Sciences*. (20): 760 –766.

Svircev, A., Roach, D., & Castle, A. (2018). Framing the Future with Bacteriophages in Agriculture. *Viruses*. 10(2180): 1-13.

Święciło, A., & Zych-Wężyk, I. (2013). Bacterial Stress Response as an Adaptation to Life in a Soil Environment. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(6).

Tasliah. (2012). Gen Ketahanan Tanaman Padi Terhadap Bakteri Hawar Daun (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *Litbang pertanian*. 31(3): 103-112.

Wahyudi, A. T., Siti, M., & Abdjad, A. N. (2011). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Bakteri Penyebab Hawar Daun pada Padi: Isolasi, Karakterisasi, dan telaah Mutagenesis dengan Transposon. *Makara Sains*.15(1): 89-96.

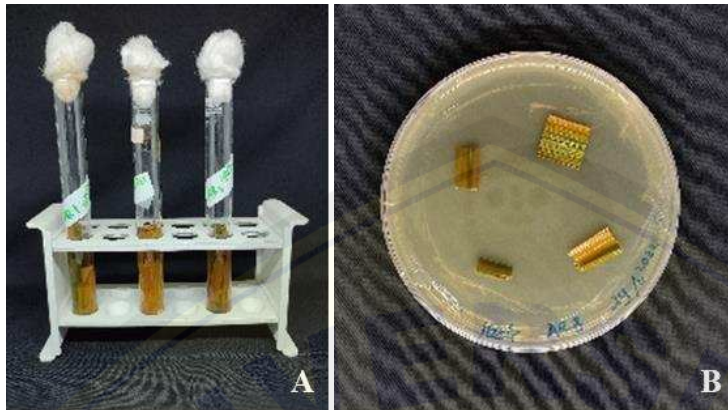
- Wang, S. & Wang H. (2015). Adsorption Behavior of Antibiotic in Soil Environment: a Critical Review. *Environment*. 565-574.
- Wise, M. G., & Siragusa, G. R. (2005). Quantitative Detection of *Clostridium perfringens* in the Broiler Fowl Gastrointestinal Tract by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(7): 3911–3916.
- Wnuk, E., Waśko, A., Walkiewicz, A., Bartmiński, P., Bejger, R., Mielnik, L., & Bieganowski, A. (2020). The effects of humic substances on DNA isolation from soils. *PeerJ*, 8. 1-15.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2015). Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*. (22): 132-149.
- Yan, J., Mao, J., & Xie, J. 2013. Bacteriophage Polysaccharide Depolymerases and Biomedical Applications. *Bio Drugs*. 28. 265–274.
- Yanuar, A., Nurcahyanti, S. D., dan Addy, H. S. (2016). Potensi Agens Hayati dalam Menekan Perkembangan Penyakit Hawar Daun Bakteri (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) pada Padi. *Agrotek. Trop*. 5(2): 70-76.
- Ye, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S., & Jiao, W. (2019). A Review Of Bacteriophage Therapy For Pathogenic Bacteria Inactivation In The Soil Environment. *Environment International*, 129, 488-496.
- Yong Ho, W., Huynh, K., Swee, K. Y., Raha, A. R., Abdul, R. O., Chai, L. H., & Noorjahan, B. A. (2009). Traditional practice, bioactivities and commercialization potential of *Elephantopus scaber* Linn. *Medicinal Plants Research*. 3(13): 1212-1221.
- Yu, X., Liang, X., Liu, K., Dong, W., Wang, J., & Zhou, M. (2015). The thiG Gene Is Required for Full Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by Preventing Cell Aggregation. *Plosone*. 10(7): 1-15.
- Yuliani, Dewi, S. K., & Rachmadiarti, F. (2018). The Morphological, Anatomical, And Physiological Characteristics of *Elephantopus scaber* As Explant Source For Tissue Culture. *Atlantis Highlights in Engineering*. 1(1): 61-66.
- Zhao, Y., Ye, M., Zhang, X., Sun, M., Zhang, Z., Chao, H., ... & Hu, F. (2019). Comparing Polyvalent Bacteriophage and Bacteriophage Cocktails For Controlling Antibiotic-Resistant Bacteria In Soil-Plant System. *Science Of The Total Environment*, 657, 918-925.

Zhou, G., Shi, Q. S., Huang, X. M., & Xie, X. B. (2015). The Three Bacterial Lines Of Defense Against Antimicrobial Agents. *International Journal Of Molecular Sciences*. 16(9): 21711-21733.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Kegiatan



Gambar 1. Isolasi patogen bakteri dari lapang. (A) Isolasi patogen dengan metode pour plate dan (B) Isolasi patogen dengan metode plant culture



Gambar 2. Purifikasi plak assay fag XooM01



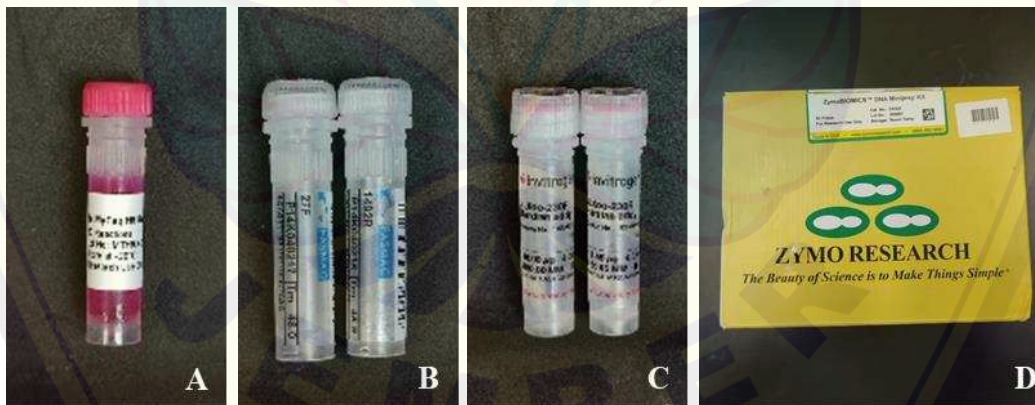
Gambar 3. Pembuatan ekstrak tapak liman. (A) Eksplorasi tanaman tapak liman, (B) Pengeringan tapak liman, (C) Hasil ekstrak tapak liman setelah proses evaporasi.



Gambar 4. Media tanam padi



Gambar 5. Aplikasi ekstrak tapak liman dan bakteriofag XooM01



Gambar 6. Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian. (A) Master mix, (B) Primer 16S forward (kiri) dan reverse (kanan), (C) Primer JLXoo230 forward (kiri) dan reverse (kanan), (D) Kit DNA (ZymoBiomics™ DNA Miniprep Kit).

Lampiran 2. Deskripsi PCR Master Mix

MyTaq™ HS Red Mix

Shipping: On Dry/Blue ice Catalog numbers:

BIO-25047: 200 x 50 µL reactions 4 x 1.25 mL

Batch No.: See vial

BIO-25048: 1000 x 50 µL reactions 20 x 1.25 mL

Concentration: 2x

Store at -20°C



Storage and stability:

MyTaq HS Red Mix is shipped on dry/blue ice. On arrival store at -20 °C for optimum stability. Repeated freeze/thaw cycles should be avoided. Thaw, mix, and briefly centrifuge each component before use.

Expiry:

When stored under the recommended conditions and handled correctly, full activity of the kit is retained until the expiry date on the outer box label.

Safety precautions:

Please refer to the material safety data sheet for further information.

Quality control specifications:

MyTaq HS Red Mix and its components are extensively tested for activity, processivity, efficiency, heat activation, sensitivity, absence of nuclease contamination and absence of nucleic acid contamination prior to release.

Notes:

For research or further manufacturing use only.

Trademarks:

HyperLadder and MyTaq are trademarks of Bioline Reagents Ltd.

Description

MyTaq™ HS Red Mix is a ready-to-use 2x mix for fast, highly-specific, hot-start PCR. MyTaq HS Red Mix is powered by antibody mediated hot-start and does not possess polymerase activity during the reaction set-up, thus reducing non-specific amplification. The advanced formulation of MyTaq HS Red Mix allows fast cycling conditions to be used, greatly reducing the reaction time without compromising PCR specificity and yield. Thanks to its speed and high specificity MyTaq HS Red Mix is also highly suitable to end point multiplex PCR.

The specially designed MyTaq Red Mix formulation does not interfere with the PCR reaction and allows users to load samples directly onto a gel after the PCR without the need to add loading buffer.

MyTaq HS Red Mix only requires the addition of template, primers and water, reducing the risk of pipetting errors and contamination as well as reducing the set-up time.

Components

	200 Reactions	1000 Reactions
MyTaq HS Red Mix, 2x	4 x 1.25 mL	20 x 1.25 mL

Standard MyTaq HS Mix Red Protocol

The following protocol is for a standard 50 µL reaction and can be used as a starting point for reaction optimization. Please refer to the Important Considerations and PCR Optimization section.

PCR set-up:

Template	200 ng
Primers (20 µM each)	1 µL
MyTaq HS Red Mix, 2x	25 µL
Water (dH ₂ O)	up to 50 µL

PCR cycling conditions:

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95 °C	1 min	1
Denaturation	95 °C	15 s	25-35
Annealing*	User determined	15 s	
Extension*	72 °C	10 s	

* These parameters may require optimization, please refer to the Important Considerations and PCR Optimization section if needed.

Colony PCR Protocol

MyTaq HS Red Mix can be used for amplification of plasmid DNA directly from liquid cultures or from colonies on agar plates:

- From liquid culture: up to 8 µL of the overnight culture can be directly added to the final reaction mix.
- From colonies: we recommend using a sterile tip to stab the colony and resuspend it directly in the 50 µL reaction mix.

Recommended cycling conditions for colony PCR of fragment up to 1 kb

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95 °C	1 min	1
Denaturation	95 °C	15 s	25-35
Annealing*	User determined	15 s	
Extension*	72 °C	10 s	

* These parameters may require optimization, please refer to the Important Considerations and PCR Optimization section if needed.

Multiplex PCR Protocol

MyTaq HS Red Mix is suitable for multiplex PCR; adjustment of the annealing temperature and extension time may be required. As a starting point we recommend using the following conditions:

Recommended standard cycling conditions for multiplex PCR

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95 °C	2 min	1
Denaturation	95 °C	30 s	25*
Annealing/Extension*	User determined	4 min*	

* These parameters may require optimization, please refer to the Important Considerations and PCR Optimization section if needed.

Important Considerations and PCR Optimization

The optimal conditions may vary from reaction to reaction and are dependent on the template/primers used.

Primers: Forward and reverse primers are generally used at the final concentration of 0.2-0.6 µM each. As a starting point, we recommend using 0.4 µM final concentration (*i.e.* 20 pmol of each primer per 50 µL reaction volume). Too high a primer concentration can reduce the specificity of priming, resulting in non-specific products.

When designing primers we recommend using primer-design software such as Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) or visual OMP™ (<http://dnasoftware.com>) with monovalent and divalent cation concentrations of 10mM and 3mM respectively. Primers should have a melting temperature (T_m) of approximately 60 °C.

Template: The amount of template in the reaction depends mainly on the type of DNA used. For templates with low structural complexity, such as plasmid DNA, we recommend using 50 pg-10 ng DNA per 50 µL reaction volume. For eukaryotic genomic DNA, we recommend a starting amount of 200 ng DNA per 50 µL reaction, this can be varied between 5 ng-500 ng. It is important to avoid using template resuspended in EDTA-containing solutions (e.g. TE buffer) since EDTA chelates free Mg²⁺.

Initial denaturation: The initial denaturation step is required to activate the enzyme and fully melt the template. We recommend 1 minute of initial denaturation at 95 °C, however for more complex templates such as eukaryotic genomic DNA, longer initial denaturation times of up to 3 minutes may be required.

Denaturation: Our protocol recommends a 15 s cycling denaturation step at 95 °C, which is also suited to GC-rich templates (>55%). For low GC content amplicons (40-45%), the denaturation step can be decreased to 5 s.

Annealing temperature and time: The optimal annealing temperature is dependent upon the primer sequences and is usually 2-5 °C below the lower T_m of the pair. We recommend starting with a 55 °C annealing temperature and, if necessary, running a temperature gradient to determine the optimal annealing temperature. Depending on the reaction the annealing time can also be reduced to 5 s.

Extension temperature and time: The extension step should be performed at 72 °C. The extension time depends on the length of the amplicon and the complexity of the template. An extension time of 10 s is sufficient for amplicons under 1 kb or up to 5 kb for low complexity template such as plasmid DNA. For amplification of fragments over 1 kb from high complexity template, such as eukaryotic genomic DNA, longer extension times are recommended. In order to find the fastest optimal condition, we suggest increasing the extension time up to 30 s/kb.

Multiplexing: When doing multiplex PCR the recommended 2-step cycling protocol may be optimized as follows:

- Annealing/extension temperature: we highly recommend initially using a temperature gradient to determine the optimal annealing temperature needed for the primer set used.
- Annealing/extension time: in most cases a 4 min annealing/extension step is largely sufficient. However in order to reduce the overall cycling time this step can be reduced down to 1 min, especially in the case of a lower number of multiplex amplicons.
- Cycling number: we recommend starting with 25 cycles and if necessary, optimizing this parameter. An excess of cycles may generate diffuse bands, too few may result in weak or no amplification.

Troubleshooting Guide

Problem	Possible Cause	Recommendation
No PCR product	Missing component	- Check mix set-up and volumes used
	Defective component	- Check the aspect and the concentrations of all components as well as the storage conditions. If necessary test each component individually in control reactions
	Cycling conditions not optimal	- Decrease the annealing temperature - Run a temperature gradient to determine the optimal annealing temperature - Increase the extension time, especially if amplifying a long target - Increase the number of cycles
	Difficult template	- Increase the denaturation time
Smearing or Non-Specific products	Excessive cycling	- Decrease the number of cycles
	Extension time too long	- Decrease the extension time
	Annealing temperature too low	- Increase the annealing temperature
	Primer concentration too high	- Decrease primer concentration
	Contamination	- Replace each component in order to find the source of contamination - Set up the PCR and analyze the PCR product in separate areas.

Technical Support

If the troubleshooting guide does not solve the difficulty you are experiencing, please contact your local distributor or our Technical Support with details of reaction set-up, cycling conditions and relevant information.

Email: mbi.tech@meridianlifescience.com

Associated Products

Product Name	Pack Size	Cat No
Agarose	500 g	BIO-41025
Agarose tablets	300 g	BIO-41027
HyperLadder™ 1kb	200 Lanes	BIO-33025
SureClean Plus	1 x 5 mL	BIO-37047

Bioline Reagents Ltd
UNITED KINGDOM

Tel: +44 (0)20 8830 5300
Fax: +44 (0)20 8452 2822

Meridian Life Science Inc.
USA

Tel: +1 901 382 8716
Fax: +1 901 382 0027

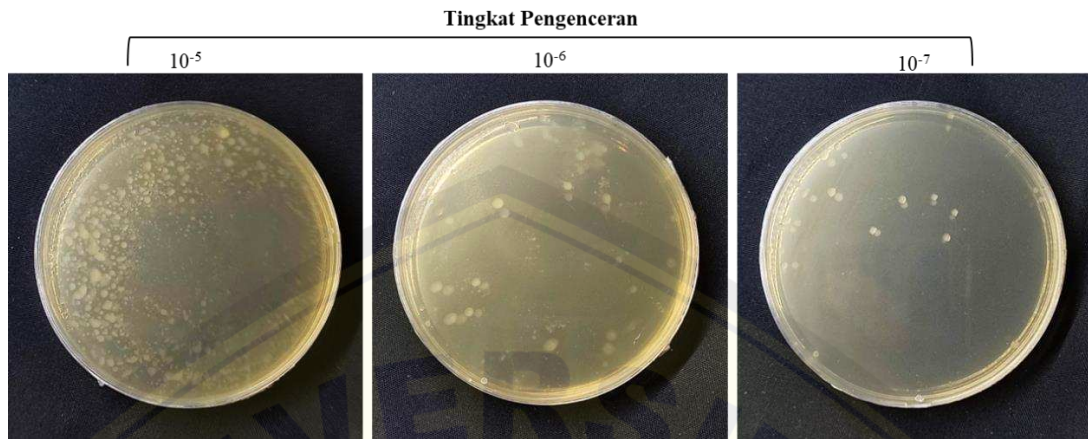
Bioline GmbH
GERMANY

Tel: +49 (0)3371 60222 00
Fax: +49(0)3371 60222 01

Bioline (Aust) Pty. Ltd
AUSTRALIA

Tel: +61 (0)2 9209 4180
Fax: +61 (0)2 9209 4763

Lampiran 3. Perhitungan Koloni Bakteri XooN01



Perhitungan Koloni Bakteri XooN01 adalah sebagai berikut :

(a) Pengenceran 10^{-5}

$$CFU/ml = \frac{214}{0,1 ml \times 10^{-5}} = 2,14 \times 10^8 CFU/ml$$

(b) Pengenceran 10^{-6}

$$CFU/ml = \frac{23}{0,1 ml \times 10^{-6}} = 2,3 \times 10^8 CFU/ml$$

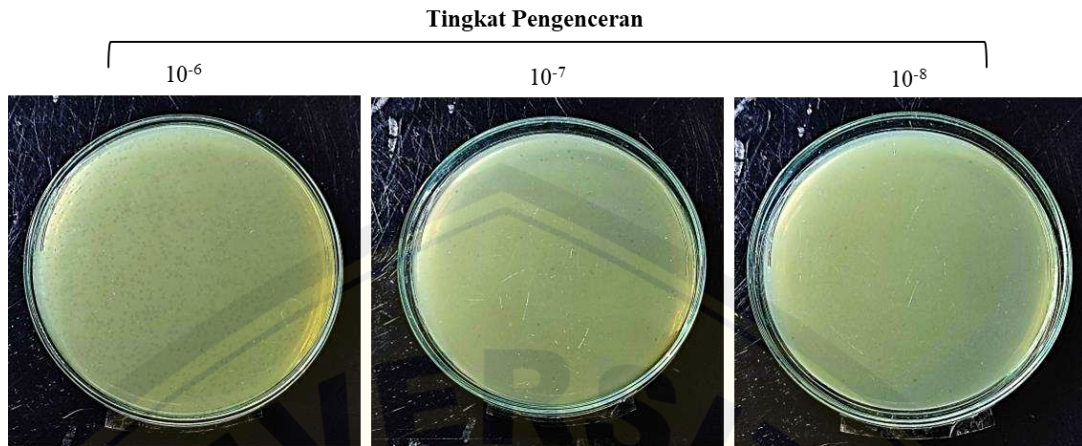
(c) Pengenceran 10^{-7}

$$CFU/ml = \frac{23}{0,1 ml \times 10^{-7}} = 23 \times 10^8 CFU/ml$$

Nilai rata – rata ketiganya adalah $9,13 \times 10^8 CFU/ml$

Lampiran 4. Perhitungan Rata-Rata Diameter Plak

Sampel	Ukuran plak (mm)
1	1,7
2	2,5
3	2,4
4	2,4
5	2,1
6	3
Mean	2,35
SD	0,43

Lampiran 5. Perhitungan Titer Fag XooM01

Perhitungan Perhitungan Titer Fag XooM01 adalah sebagai berikut :

(a) Pengenceran 10^{-6}

$PFU/ml =$ Terlalu banyak (tidak bisa dihitung)

(b) Pengenceran 10^{-7}

$$PFU/ml = \frac{74}{0,01 \text{ ml} \times 10^{-7}} = 7,4 \times 10^{10} \text{ PFU/ml}$$

(c) Pengenceran 10^{-8}

$$PFU/ml = \frac{23}{0,01 \text{ ml} \times 10^{-7}} = 2,3 \times 10^{11} \text{ PFU/ml}$$

Lampiran 6. Hasil Perhitungan ImageJ Ulangan 1

H-1					H+4				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	5000	65,854	41	163	dH20	5000	70,047	27	174
TL	5000	68,532	44	159	TL	5000	67,217	33	192
Fag	5000	65,780	47	159	Fag	5000	82,036	36	200
TL + Fag	5000	62,739	52	80	TL + Fag	5000	83,694	42	199
H+0					H+6				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	5000	109,706	32	238	dH20	5000	66,501	30	179
TL	5000	113,998	43	235	TL	5000	72,870	37	173
Fag	5000	120,445	46	243	Fag	5000	84,304	40	188
TL + Fag	5000	139,355	53	250	TL + Fag	5000	89,904	44	197
H+2					Data Pemandangan				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	5000	100,841	40	198	1,00E+06	5000	73,930	44	190
TL	5000	98,401	46	223	1,00E+05	5000	61,566	44	118
Fag	5000	97,365	49	222	1,00E+04	5000	49,694	41	69
TL + Fag	5000	111,468	58	243	1,00E+03	5000	45,515	36	67

Lampiran 7. Hasil Perhitungan ImageJ Ulangan 2

H-1					H+4				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	6000	60,334	41	163	dH20	6000	67,785	27	174
TL	6000	61,721	44	159	TL	6000	64,148	33	192
Fag	6000	60,456	47	159	Fag	6000	77,498	36	200
TL + Fag	6000	58,763	52	80	TL + Fag	6000	79,577	42	199
H+0					H+6				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	6000	104,345	32	238	dH20	6000	63,256	31	179
TL	6000	98,632	43	235	TL	6000	68,884	37	173
Fag	6000	113,156	45	243	Fag	6000	79,652	40	188
TL + Fag	6000	131,457	53	250	TL + Fag	6000	85,132	44	197
H+2					Data Pemandangan				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	6000	93,981	39	198	1,00E+06	6000	69,781	44	190
TL	6000	91,337	46	223	1,00E+05	6000	58,939	44	118
Fag	6000	90,772	48	222	1,00E+04	6000	48,848	40	69
TL + Fag	6000	104,981	57	243	1,00E+03	6000	44,660	36	67

Lampiran 8. Hasil Perhitungan ImageJ Ulangan 3

H-1					H+4				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	7000	54,841	41	163	dH20	7000	67,747	27	174
TL	7000	55,031	44	159	TL	7000	61,530	33	192
Fag	7000	54,871	47	159	Fag	7000	74,228	36	200
TL + Fag	7000	52,653	52	80	TL + Fag	7000	76,249	42	199

H+0					H+6				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	7000	99,143	30	238	dH20	7000	60,764	30	179
TL	7000	93,072	41	235	TL	7000	66,157	37	173
Fag	7000	106,742	45	243	Fag	7000	76,190	40	188
TL + Fag	7000	124,755	53	250	TL + Fag	7000	81,870	44	197

H+2					Data Pemandang				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	7000	86,871	40	198	1,00E+06	7000	66,776	44	190
TL	7000	84,238	46	223	1,00E+05	7000	57,564	44	118
Fag	7000	83,345	49	222	1,00E+04	7000	48,081	39	69
TL + Fag	7000	97,798	58	243	1,00E+03	7000	44,088	36	67

Lampiran 9. Hasil Perhitungan ImageJ Ulangan 4

H-1					H+4				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	8000	48,324	41	163	dH20	8000	60,827	27	174
TL	8000	49,472	44	159	TL	8000	59,428	33	192
Fag	8000	48,211	47	159	Fag	8000	71,384	36	200
TL + Fag	8000	46,679	52	80	TL + Fag	8000	73,858	42	199
H+0					H+6				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	8000	95,838	27	238	dH20	8000	58,956	31	179
TL	8000	88,664	40	235	TL	8000	64,211	37	173
Fag	8000	101,889	45	243	Fag	8000	73,303	40	188
TL + Fag	8000	119,475	53	250	TL + Fag	8000	79,131	44	197
H+2					Data Pemandang				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	8000	79,982	39	198	1,00E+06	8000	64,434	43	190
TL	8000	77,342	46	223	1,00E+05	8000	56,288	42	118
Fag	8000	76,746	48	222	1,00E+04	8000	47,499	39	69
TL + Fag	8000	90,234	57	243	1,00E+03	8000	42,702	34	67

Lampiran 10. Hasil Perhitungan ImageJ Ulangan 5

H-1					H+4				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	9000	45,721	41	163	dH20	9000	57,267	28	174
TL	9000	46,235	44	159	TL	9000	57,993	32	192
Fag	9000	45,534	47	159	Fag	9000	69,499	36	200
TL + Fag	9000	42,658	52	80	TL + Fag	9000	72,053	40	199
H+0					H+6				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	9000	91,547	27	238	dH20	9000	57,462	31	179
TL	9000	85,161	39	235	TL	9000	62,105	36	173
Fag	9000	98,298	45	243	Fag	9000	71,330	39	188
TL + Fag	9000	115,770	51	250	TL + Fag	9000	77,164	44	197
H+2					Data Pemandangan				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	9000	72,823	40	198	1,00E+06	9000	61,867	42	190
TL	9000	70,403	46	223	1,00E+05	9000	55,138	42	118
Fag	9000	69,376	49	222	1,00E+04	9000	46,885	39	69
TL + Fag	9000	83,264	58	243	1,00E+03	9000	42,733	35	67

Lampiran 11. Hasil Perhitungan ImageJ Ulangan 6

H-1					H+4				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	10000	43,234	41	163	dH20	10000	54,699	27	174
TL	10000	45,431	44	159	TL	10000	56,532	32	192
Fag	10000	43,103	47	159	Fag	10000	67,487	36	200
TL + Fag	10000	39,743	52	80	TL + Fag	10000	69,956	40	199
H+0					H+6				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	10000	87,768	27	238	dH20	10000	55,563	30	179
TL	10000	82,502	36	235	TL	10000	60,775	36	173
Fag	10000	95,195	44	243	Fag	10000	69,624	39	188
TL + Fag	10000	112,382	51	250	TL + Fag	10000	75,566	44	197
H+2					Data Pemandangan				
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max
dH20	10000	65,987	39	198	1,00E+06	10000	60,198	41	190
TL	10000	63,387	46	223	1,00E+05	10000	53,705	41	118
Fag	10000	62,652	48	222	1,00E+04	10000	46,242	38	69
TL + Fag	10000	74,421	57	243	1,00E+03	10000	41,876	33	67

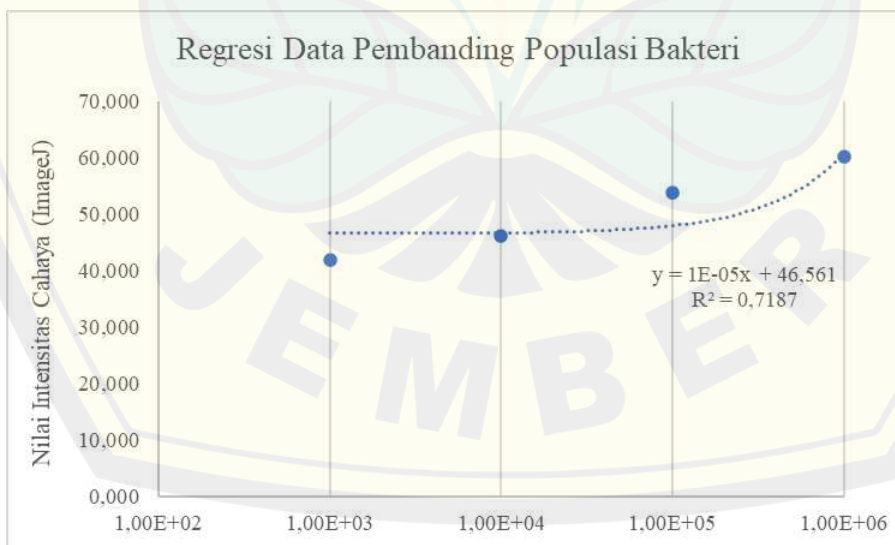
Lampiran 12. Rata – Rata Perhitungan ImageJ dan Analisis Regresi

Hasil Rata - Rata Data ImageJ				
dh2o	TL	Fag	TL + Fag	
53,051	54,404	52,993	50,539	H-1
98,058	93,672	105,954	123,866	H+0
83,414	80,851	80,043	93,694	H+2
62,562	61,141	73,689	75,898	H+4
60,417	65,834	75,734	81,461	H+6

Hasil Perhitungan Sebelum Normalisasi				
dh2o	TL	Fag	TL + Fag	
6,49E+05	7,84E+05	6,43E+05	3,98E+05	H-1
5,15E+06	4,71E+06	5,94E+06	7,73E+06	H+0
3,69E+06	3,43E+06	3,35E+06	4,71E+06	H+2
1,60E+06	1,46E+06	2,71E+06	2,93E+06	H+4
1,39E+06	1,93E+06	2,92E+06	3,49E+06	H+6

Hasil Perhitungan Setelah Normalisasi				
dh2o	TL	Fag	TL + Fag	
4,50E+06	3,93E+06	5,30E+06	7,33E+06	H+0
3,04E+06	2,64E+06	2,71E+06	4,32E+06	H+2
9,51E+05	6,74E+05	2,07E+06	2,54E+06	H+4
7,37E+05	1,14E+06	2,27E+06	3,09E+06	H+6

Hasil Rata - Rata Data Pemanding			
1,00E+06	1,00E+05	1,00E+04	1,00E+03
66,164	57,2	47,875	43,596



a = 0,00001

b = 46,561