

**PENGELOLAAN
KOLEKSI
PATOGEN TANAMAN**

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Dr. John Alcorn atas tinjauannya pada buku panduan ini. Bantuan dana dari Badan Pembangunan Internasional Australia (Australian Agency for International Development, AusAID) sangat kami hargai. Ucapan terima kasih secara khusus kami sampaikan kepada Mr. Eli Szandala dari Office of the Chief Plant Protection Officer, Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, yang mengkoordinasikan pembuatan buku panduan ini.

Banyak dari metode-metode yang dipertelakan di dalam buku pegangan ini dibahas oleh para peserta yang diundang untuk menghadiri lokakarya yang diselenggarakan di Chiang Mai, Thailand pada tanggal 20 November 2004. Kami ingin mengucapkan terima kasih kepada Dr. Srisuk Poonpolgul (Bangkok, Thailand), Ms. Srisurang Likhitekaraj (Bangkok, Thailand), Dr. Kartini Kramadibrata (Bogor, Indonesia), Dr. Lee Su See (Kepong, Malaysia), Dr. Hien Thuy Phan (Hanoi, Vietnam), dan Mr. Eli Szandala (Canberra, Australia) atas sumbangan mereka yang berharga.

Penulis Utama

Dr. Roger Shivas dan Dr. Dean Beasley, Plant Pathology Herbarium, Queensland Department of Primary Industries and Fisheries, Australia.

Penyumbang Naskah Tulisan

Dr. John Thomas dan Dr. Andrew Geering, pakar Virologi, Queensland Department of Primary Industries and Fisheries, Australia.

Dr. Ian Riley, pakar Nematologi, University of Adelaide, South Australia, Australia.

Tim Penterjemah

Kartini Kramadibrata, 'Herbarium Bogoriense', Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor, Indonesia

N. Wulijarni-Soetjipto, PROSEA Network Office, Bogor, Indonesia

M. Machmud, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Departemen Pertanian, Bogor, Indonesia

"Daftar catatan yang tidak dapat dibuktikan kebenarannya hanyalah kertas sampah belaka"

R.W.G. Dennis, dalam *British Ascomycetes* (1968),
J. Cramer, Lehre, Jerman

© Negara Persemakmuran Australia 2005

Buku panduan Pengelolaan Koleksi Patogen Tanaman dilindungi hak cipta. Namun anda dapat men *download*, menampilkan, mencetak dan memperbanyak bahan-bahan ini untuk kepentingan pribadi, penggunaan bukan komersial atau digunakan dalam organisasi anda. Seluruh panduan ini dilindungi *Undang-undang Hak Cipta 1968*, selain bagian yang diizinkan untuk digunakan sesuai dengan Undang-Undang tersebut.

ISBN 0-9751686-7-3

DAFTAR SINGKATAN

AMV	Alfalfa Mosaic Virus
ACIAR	Australian Centre for International Agricultural Research
ASEAN	Association of Southeast Asian Nations
ASEANET	The Southeast Asian LOOP of BioNET International
AusAID	Australian Agency for International Development
BO	Herbarium Bogoriense
BRIP	Queensland Plant Pathology Herbarium
DAFF	Department of Agriculture, Fisheries and Forestry
DAR	New South Wales Plant Pathology Herbarium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GA	Glycerol Agar
GBIF	Global Biodiversity Information Facility
GPS	Global Positioning System
KBA	King's B Agar
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IJSB	International Journal of Systematic Bacteriology
IJSEM	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
IMI	CABI Bioscience, UK Centre
IPPC	International Plant Protection Convention
ISPM	International Standard for Phytosanitary Measures
LOOP	Locally Organised and Operated Partnership
LNYSV	Lettuce Necrotic Yellow Virus
MEA	Malt Extract Agar
MTA	Material Transfer Agreement
NA	Nutrient Agar
NSW	New South Wales
OCPPO	Office of the Chief Plant Protection Officer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PEMV	Pea Enation Mosaic Virus
PRA	Pest Risk Analysis
PRSV	Papaya Ringspot Virus
QDPIF	Queensland Department of Primary Industries and Fisheries
RIRDC	Rural Industries Research and Development Corporation
RNA	Ribonucleic Acid
SCBV	Sugarcane Baciliform Virus
SEM	Scanning Electron Microscope
SPA	Sucrose Peptone Agar
SPS	Sanitary and Phytosanitary
SWG	Standard Weight Gauge
TMV	Tobacco Mosaic Virus
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virus
TWA	Tap Water Agar
UV	Ultra Violet
VIDE	Virus Identification Data Exchange
WFCC	World Federation for Culture Collections
WTO	World Trade Organization

KATA PENGANTAR

Pembuatan buku pegangan tentang Pengelolaan Koleksi Patogen Tanaman ini dilakukan atas pesanan Departemen Pertanian, Perikanan dan Kehutanan Pemerintah Australia (Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, DAFF). Maksudnya adalah untuk menyediakan bahan acuan bagi negara-negara di kawasan (Asia Tenggara) yang akan membuat daftar hama penyakit berdasarkan spesimen untuk penyakit-penyakit tanaman guna mempermudah perdagangan komoditas pertanian secara internasional.

Pembentukan Organisasi Perdagangan Dunia (World Trade Organization, WTO) pada tahun 1995 digembar-gemborkan sebagai menyediakan era baru dalam liberalisasi perdagangan. Sementara perdagangan komoditas pertanian telah berkembang sebagai hasil dari kewajiban yang ditetapkan oleh Persetujuan WTO tentang Penerapan Tindakan-tindakan Kesehatan dan Kesehatan Tanaman (Persetujuan SPS), sasaran itu tidak tercapai oleh banyak negara yang sedang berkembang. Hasil ini dihubungkan dengan kekurangan-kekurangan dalam koleksi hama arthropoda dan herbarium penyakit tanaman yang membatasi kemampuan banyak negara untuk mempertelakan status kesehatan industri pertanian dan kehutanannya. Sebagai akibatnya, beberapa Organisasi Perlindungan Tanaman Nasional tidak dapat melakukan analisis risiko hama penyakit yang kuat dan dapat dipercaya. Sementara situasi seperti ini masih terjadi, negara-negara berkembang di kawasan ini akan berada dalam keadaan yang merugikan dalam merundingkan akses ke pasar-pasar yang baru untuk komoditas pertaniannya.

Dalam Pasal 9 dari Persetujuan SPS, negara-negara maju setuju untuk memberi bantuan teknis kepada negara-negara berkembang yang menjadi anggota untuk meningkatkan kapasitasnya dalam hubungannya dengan langkah-langkah SPS. Australia telah memberi tanggapan terhadap kewajibannya dengan berbagai cara, termasuk melalui program-program regional dan bilateral yang dibiayai melalui Badan Pembangunan Internasional Australia (Australian Agency for International Development, AusAID). Kegiatan bantuan ini meliputi berbagai macam hal, termasuk membuat daftar hama penyakit berdasarkan spesimen, yang merupakan fokus dari program yang dikelola oleh Office of the Chief Plant Protection Officer, DAFF dengan sasaran kebutuhan negara-negara di Asia Tenggara. Program tersebut memberi tekanan pada peningkatan kemampuan para ilmuwan dalam lima bidang utama sebagai berikut:

- Pengawasan hama penyakit tanaman;
- Diagnosa;
- Pengawetan spesimen;
- Pemeliharaan dan pengelolaan koleksi; dan
- Pengelolaan data.

Buku pegangan ini memberi risalah tentang berbagai cara dan teknik yang digunakan di dalam semua cabang ilmu patologi tanaman, termasuk informasi tentang kelompok-kelompok patogen utama yang secara ekonomi penting, metode pengumpulan spesimen di lapangan, media pertumbuhan, isolasi dan pengawetan

spesimen, juga informasi dan petunjuk tentang pengelolaan herbarium dan koleksi kultur. Untuk memperluas dampaknya, buku pegangan ini telah diterjemahkan ke dalam bahasa-bahasa Vietnam, Thai, dan Indonesia.

Lois Ransom
Chief Plant Protection Officer
Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry

DAFTAR ISI

UCAPAN TERIMA KASIH	i
DAFTAR SINGKATAN	ii
KATA PENGANTAR	6
DAFTAR ISI	8
DAFTAR GAMBAR	11
DAFTAR TABEL	11
1 PENDAHULUAN	6
1.1 KEWAJIBAN INTERNASIONAL	6
1.2 STATUS KOLEKSI BIOLOGI DI NEGARA-NEGARA ASEAN.....	8
1.3 PENTINGNYA CATATAN BERDASARKAN SPESIMEN	8
1.4 MEMBANGUN HERBARIUM PENYAKIT TANAMAN YANG PADAT KOLEKSI DI NEGARA-NEGARA ASEAN.....	9
2 KOLEKSI PATOGEN TANAMAN	10
2.1 HERBARIUM	10
2.2 KOLEKSI KULTUR.....	10
2.3 MEMBANGUN KOLEKSI.....	11
2.4 DAFTAR HAMA PENYAKIT	12
3 MEMBANGUN KOLEKSI	16
3.1 MEMPERBANYAK JUMLAH KOLEKSI	16
3.2 PENGUMPULAN SPESIMEN DARI LAPANGAN	16
3.3 PENANGANAN SPESIMEN	18
3.3.1 Daun, batang dan buah.....	19
3.3.2 Akar dan tanah.....	21
3.3.3 Jamur besar	22
3.4 PELABELAN SPESIMEN.....	23
3.5 SURVEI DAN PENGAMBILAN CONTOH.....	24
4 PEMERIKSAAN SPESIMEN	25
4.1 PEWARNAAN JAMUR DAN BAKTERI	25
4.2 MIKROSKOP CAHAYA.....	27
4.3 PEMOTRETAN.....	29
4.3.1 Pemberian nama dan pengelolaan berkas catatan.....	29
5 ISOLASI JAMUR, BAKTERI DAN NEMATODA DI LABORATORIUM	31
5.1 ISOLASI JAMUR.....	32
5.1.1 Wadah lembab	33

5.1.2	Teknik pengenceran	34
5.1.3	Pertumbuhan dan sporulasi	35
5.2	ISOLASI BAKTERI	36
5.3	ISOLASI NEMATODA	39
5.3.1	Contoh tanah	39
5.3.2	Contoh tanaman	42
5.3.3	Pengawetan dan perekatan	44
5.4	MEDIUM PERTUMBUHAN	45
6	PENGAWETAN DAN PENYIMPANAN SPESIMEN	31
6.1	SPESIMEN HERBARIUM	31
6.1.1	Spesimen kering	31
6.1.2	Spesimen tipe	33
6.1.3	Kultur kering	34
6.1.4	Kaca obyek (Gelas preparat)	35
6.1.5	Pengepakan dan pengangkutan	35
6.2	KULTUR	36
6.2.1	Pertumbuhan pada agar-agar	37
6.2.2	Di dalam minyak mineral	37
6.2.3	Penyimpanan di dalam air	37
6.2.4	Proses kering-beku	38
6.2.5	Penyimpanan di dalam tanah	38
6.2.6	Penyimpanan di dalam silika gel	38
6.2.7	Penyimpanan pada kertas saring	39
6.2.8	Kriopreservasi	39
6.2.9	Nitrogen cair	39
7	IDENTIFIKASI PATOGEN	56
7.1	JAMUR	56
7.1.1	Patogen akar	57
7.1.2	Patogen batang	57
7.1.3	Patogen daun	58
7.1.4	Patogen buah dan biji	60
7.1.5	Jamur karat	61
7.1.6	Jamur api	62
7.2	BAKTERI	63
7.3	FITOPLASMA	65

7.4	VIRUS DAN VIROID.....	66
7.4.1	Jenis virus dan catatan-catatan.....	66
7.4.2	Gejala virus.....	68
7.5	NEMATODA.....	71
7.5.1	Perlunya identifikasi.....	72
7.5.2	Membedakan nematoda parasit tanaman.....	72
7.5.3	Identifikasi jenis.....	73
7.6	TEKNIK-TEKNIK DIAGNOSA.....	74
7.6.1	Mikroskop elektron payar.....	74
7.6.2	Teknik biokimia dan molekuler.....	74
7.6.3	Serologi (imunologi).....	75
7.6.4	Metode berdasar asam nukleat.....	75
8	PEMELIHARAAN CATATAN SPESIMEN.....	75
8.1	PANGKALAN DATA.....	75
9	PEMELIHARAAN KOLEKSI.....	77
9.1	FASILITAS HERBARIUM.....	77
9.2	PENGENDALIAN KUMBANG HERBARIUM.....	77
9.3	PENGENDALIAN TUNGAU KULTUR.....	78
9.4	PEMINJAMAN.....	79
9.5	KEAMANAN.....	81
10	DAFTAR PUSTAKA PILIHAN.....	82

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Peralatan yang diperlukan untuk menempatkan herbarium penyakit tanaman dan kultur penyakit tanaman	12
Gambar 2	Sumber-sumber informasi untuk membuat daftar hama penyakit tanaman berdasarkan urutan pilihan	13
Gambar 3	Contoh daftar penyakit pada pepaya.....	14
Gambar 4	Informasi yang diperlukan untuk catatan hama penyakit, dimodifikasi dari ISPM 8.....	15
Gambar 5	Perlengkapan yang biasa digunakan untuk koleksi spesimen penyakit tanaman.....	19
Gambar 6	Desikator untuk menyimpan contoh daun yang terinfeksi virus	21
Gambar 7	Contoh catatan koleksi lapangan yang digunakan di herbarium BRIP .	24
Gambar 8	Bagan penampang melintang untuk membuat lemari ‘lampu hitam’	36
Gambar 9	Cawan goresan isolasi bakteri yang memperlihatkan.....	38
Gambar 10	Penampakan Whitehead untuk mengekstrak nematoda dari tanah dan tanaman.....	40
Gambar 11	Corong Baermann untuk mengekstrak nematoda dari tanah dan tanaman.....	41
Gambar 12	Ekstraksi nematoda dari jaringan tanaman dengan cara pengkabutan	43
Gambar 13	Contoh label paket yang digunakan di herbarium BRIP	32
Gambar 14	Paket-paket herbarium yang digunakan oleh Herbarium Ustilaginales Vánky (HUV) dan QDPI&F Plant Pathology Herbarium BRIP	36
Gambar 15	Gejala-gejala virus (dari kiri ke kanan), lingkaran klorotik, bercak cincin, dan mosaik	69
Gambar 16	Perbandingan morfologi anterior beberapa kelompok nematoda.	73
Gambar 17	Modul katalog pangkalan data KE EMu.....	75
Gambar 18	Alamat internet dan homepage dua pangkalan data taksonomi yang penting	76
Gambar 19	Jejak-jejak tungau yang tertinggal dalam tetes-tetes kecil kondensasi pada tutup cawan Petri.....	79

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Beberapa gejala umum dan pertelaan penyakit tanaman.....	18
---------	--	----

1 PENDAHULUAN

Pentingnya koleksi biologi, termasuk herbarium penyakit tanaman dan kultur hidup patogen tanaman, telah menjadi pokok bahasan sejumlah makalah yang diterbitkan di dalam pustaka dan tinjauan ilmiah. Di dalam makalah yang berjudul *Mutual Responsibilities of Taxonomic Mycology and Plant Pathology*, Walker (1975) menyitir tidak kurang dari 18 pustaka acuan yang para penulisnya mengemukakan pentingnya peran taksonomi di dalam biologi terapan dan pentingnya pekerjaan taksonomi jamur misalnya di bidang mikologi dan patologi tanaman. Dampak makalah-makalah tersebut pada tingkat dukungan yang diberikan kepada herbarium dan taksonomi penyakit tanaman belum diketahui. Mempertimbangkan situasi di Australia yang sebagian besar koleksinya menjadi tanggung jawab badan-badan Pemerintah Negara Bagian, tampaknya sama sekali tidak mungkin banyak dampaknya.

Mengapa pemerintah-pemerintah begitu enggan membantu koleksi biologi untuk menopang studi taksonomi dapat diperdebatkan, tetapi mungkin ada kaitannya dengan kegagalan para pakar taksonomi dalam memberi perhatian kepada kebutuhan para pengguna yang berpotensi ... *banyak pakar taksonomi sering tidak menyadari kebutuhan dan pekerjaan para pakar biologi terapan, termasuk pakar patologi tanaman, dan beberapa di antaranya cenderung memutuskan hubungan dirinya dengan bidang praktek dan penelitian biologi yang lebih luas* (Walker, 1975). Bagaimanapun juga, dengan berdirinya Organisasi Perdagangan Dunia (World Trade Organization) pada tahun 1995 dengan aturan-aturannya yang diterapkan pada perdagangan komoditas pertanian, kesehatan tanaman telah menjadi isu kebijakan pokok dalam perdagangan. Pemerintah di mana-mana berada di bawah tekanan dari para pemilihnya untuk menggunakan ketentuan-ketentuan dari Persetujuan tentang Penerapan Tindakan-tindakan Kesehatan dan Kesehatan Tanaman¹⁾ (Agreement on the Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) guna memperoleh keuntungan kompetitif sebanyak-banyaknya, yaitu membuka pasar lebar-lebar yang semula tertutup atas dasar karantina yang diragukan dan tidak memasukkan komoditas yang dapat berisiko terhadap industri dalam negeri. Persetujuan SPS menetapkan persyaratan-persyaratan, berdasarkan asas-asas ilmiah dan penilaian risiko, untuk melindungi industri pertanian dari hama penyakit asing²⁾, namun, pada waktu yang sama juga memudahkan perdagangan komoditas pertanian. Persetujuan SPS memberi peluang kepada para anggotanya untuk mengelola perdagangan komoditas pertanian atas dasar kesehatan dan keselamatan, tetapi larangan-larangan harus transparan dan secara teknis dapat dibenarkan.

1.1 KEWAJIBAN INTERNASIONAL

Konvensi Perlindungan Tanaman Internasional (The International Plant Protection Convention, IPPC) dan Persetujuan SPS menentukan kewajiban-kewajiban bagi calon negara pengekspor untuk memperlengkapi calon negara pengimpor dengan

¹⁾ Tindakan-tindakan Kesehatan dan Kesehatan Tanaman (Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS) adalah standar atau peraturan dalam negeri, yang mencakup hal-hal seperti mikroba kontaminan, racun, logam berat, dan residu pestisida di dalam makanan, serta hama, gulma dan patogen.

²⁾ Istilah 'hama penyakit' mencakup arthropoda, patogen dan nematoda tanaman.

daftar hama penyakit yang mungkin berkaitan dengan komoditas yang akan diekspor. Hal ini termasuk:

- IPPC menetapkan kewajiban-kewajiban untuk memberikan informasi resmi tentang teknik dan biologi yang diperlukan untuk analisis risiko hama penyakit sebagai pengakuan atas pentingnya informasi khusus tentang status hama penyakit dari suatu produk yang disediakan para eksportir,^{3) 4)}
- pasal 6.3 dari Persetujuan SPS yang menyatakan bahwa "Anggota-anggota pengeksportir yang menegaskan bahwa daerah dalam wilayahnya adalah daerah bebas hama atau bebas penyakit atau daerah dengan kelaziman hama penyakit rendah akan menyediakan bukti yang diperlukan tentang itu, yang secara obyektif memperlihatkan kepada anggota pengimpor bahwa daerah-daerah seperti itu berturut-turut akan tetap bebas hama atau bebas penyakit atau dengan kelaziman hama penyakit yang rendah. Untuk keperluan ini, akses yang layak akan diberikan, atas permintaan, kepada anggota pengimpor untuk pemeriksaan, pengujian dan prosedur lain yang berkaitan".
- Lampiran B, paragraf 3(b) dari Persetujuan SPS yang menyatakan bahwa "setiap Anggota akan menjamin tersedianya penyelidikan yang bertanggung jawab untuk menyediakan jawaban terhadap semua pertanyaan yang layak dari para Anggota yang berminat, juga untuk menyediakan dokumen-dokumen yang terkait mengenai: (b) prosedur pengawasan dan pemeriksaan, produksi dan perlakuan karantina, prosedur persetujuan toleransi pestisida dan bahan makanan tambahan, yang dioperasikan di dalam wilayahnya".

Untuk memenuhi kewajiban-kewajiban ini, dan agar dapat melakukan analisis risiko hama penyakit serta menetapkan peraturan-peraturan tentang kesehatan tanaman untuk mencegah pemasukan, kenyataan adanya atau penyebaran hama penyakit, negara-negara perlu mempertahankan catatan-catatan hama penyakit yang dapat dipercaya.

Menurut "International Standard for Phytosanitary Measures" (ISPM) nomor 8⁵⁾, "penyediaan catatan-catatan hama penyakit yang dapat dipercaya dan penentuan status hama penyakit merupakan komponen-komponen dari sejumlah kegiatan yang amat diperlukan yang dicakup dalam IPPC dan oleh asas-asas yang dicatat dalam ISPM No. 1: *Asas-asas karantina tanaman dalam kaitannya dengan perdagangan internasional*, dan standar internasional untuk tindakan-tindakan kesehatan tanaman yang telah dikembangkan darinya".

ISPM 8 menyatakan bahwa:

"Semua negara boleh menggunakan informasi status hama penyakit untuk:

³⁾ International Plant Protection Convention, 1997: Pasal VII: Kerja sama internasional: 1. "Pihak-pihak yang mengadakan kontrak perlu bekerja sama satu sama lain seluas-luasnya yang dapat dipraktekkan dalam mencapai maksud dan tujuan Konvensi ini dan khususnya akan: ... c) bekerja sama, sejauh dapat dipraktekkan, dalam memberikan informasi teknik dan biologi yang perlu untuk analisis risiko hama penyakit."

⁴⁾ ASPM 11, Analisis Risiko Hama Penyakit untuk Hama Penyakit Karantina, 1.2 Informasi: "Ketentuan informasi resmi mengenai status hama penyakit adalah suatu kewajiban dalam IPPC (Pasal VIII.1c) yang dipermudah oleh butir-butir kontak resmi (Pasal VIII.2)."

⁵⁾ ISPM 8, Penentuan status hama tanaman suatu areal, IPPC, FAO, Nov. 1998.

- maksud dan tujuan PRA;
- merencanakan program-program pengelolaan hama penyakit tingkat nasional, regional dan internasional;
- membuat daftar hama penyakit di tingkat nasional; serta
- membangun dan mempertahankan daerah-daerah bebas hama penyakit.

Agar negara-negara memperoleh manfaat dari semangat liberalisasi perdagangan yang terwujud di dalam persetujuan pendirian WTO, mereka harus tunduk kepada ketentuan-ketentuan yang ditetapkan oleh IPPC dan WTO dalam Persetujuan SPS. Infrastruktur yang mendukung kesehatan tanaman sangat diperlukan, jika tugas karantina adalah untuk menilai risiko perpindahan hama tanaman bersama komoditas perdagangan.

1.2 STATUS KOLEKSI BIOLOGI DI NEGARA-NEGARA ASEAN

Pada tahun 2001/2002, Badan Pembangunan Internasional Australia (AusAID) mendukung suatu prakarsa untuk meninjau dan menilai koleksi hama arthropoda dan herbarium penyakit tanaman di negara-negara ASEAN. Prakarsa ini berasal dari keputusan yang diambil pada pertemuan Komisi Koordinasi ASEANET⁶⁾ LOOP kedua yang diselenggarakan pada tahun 2000, ketika para delegasi membuat rekomendasi untuk mendokumentasikan koleksi biologi dari seluruh negara anggota.

Para penulis laporan mengenai status koleksi hama penyakit tanaman di ASEAN harus mengamati bahwa, untuk sebagian besar atau sebagian kecil, tidak satupun negara di kawasan Asia Tenggara dapat memberikan pertelaan yang memadai mengenai status kesehatan industri pertaniannya. Masalah ini sebagian besar disebabkan oleh sedikitnya jumlah spesimen penyakit tanaman yang disimpan di herbarium di seluruh kawasan. Koleksi hama arthropoda lebih banyak jumlahnya daripada herbarium penyakit tanaman. Para pakar entomologi umumnya juga lebih berpengalaman dalam hal pengawetan spesimen dan pengelolaan koleksi daripada rekan imbangannya dalam patologi tanaman.

1.3 PENTINGNYA CATATAN BERDASARKAN SPESIMEN

Informasi mengenai ada atau tidak adanya hama atau patogen tersedia dari banyak sumber dengan berbagai tingkat kepercayaan. Meskipun demikian, dalam hubungannya dengan perdagangan internasional, catatan-catatan yang didasarkan pada spesimen bukti (*voucher specimen*) yang disimpan di dalam koleksi yang dikelola dengan baik menyediakan tanda bukti yang paling dapat dipercaya tentang status kesehatan tanaman dari suatu negara. Spesimen bukti, bersama-sama dengan data yang menyertainya, yang mendokumentasikan hal-hal seperti lokasi tempat spesimen dikoleksi, tanggal koleksi, kolektor, tanaman inang, dan identitas patogen,

⁶⁾ ASEANET adalah LOOP dari BioNET International untuk Asia Tenggara, suatu badan kerjasama untuk meningkatkan diri dalam taksonomi biosistemik

merupakan catatan-catatan hama dan penyakit. Koleksi yang cukup kaya, memuat entri ganda dari jenis yang sama pada tanaman inang yang berbeda dan dari wilayah geografi dan areal produksi yang berlainan. Spesimen-spesimen ini dapat diperiksa ulang untuk memeriksa identitasnya atau untuk memperoleh data yang lebih akurat mengenai keadaan pada waktu spesimen diperoleh dan daerah sebarannya. Di pihak lain, laporan-laporan yang diterbitkan tetapi tidak didukung oleh spesimen bukti tidak dapat divalidasi kebenarannya dan berpotensi menjadi halangan bagi perdagangan pertanian. Laporan-laporan yang salah dapat menjadi sangat sulit, makan waktu, dan mahal untuk membantah guna memuaskan calon rekanan dagang. Spesimen dan material lain yang berada di dalam koleksi biologi dapat menjadi alat yang sangat kuat untuk membantu penawaran akses pasar dan untuk membenarkan tindakan-tindakan guna mengeluarkan jenis-jenis asing yang berpotensi mengganggu.

1.4 MEMBANGUN HERBARIUM PENYAKIT TANAMAN YANG PADAT KOLEKSI DI NEGARA-NEGARA ASEAN

Pembentukan koleksi penyakit tanaman di negara-negara Asia Tenggara akan sangat terbantu apabila para pakar praktis patologi tanaman diberi kesadaran tentang pentingnya menyimpan spesimen di laboratorium-laboratorium tertentu. Prioritas bantuan yang diberikan oleh Pemerintah Australia adalah menyelenggarakan lokakarya-lokakarya kecil yang diikuti oleh para ilmuwan kesehatan tanaman dan atasan mereka untuk menjelaskan pentingnya koleksi biologi dalam menyokong perdagangan, dan peran yang dapat dimainkan oleh profesional kesehatan tanaman dalam memperbanyak jumlah koleksi. Lokakarya-lokakarya semacam ini perlu ditindaklanjuti dengan program-program pelatihan bagi mereka yang bekerja sebagai pakar patologi tanaman, untuk memberikan jaminan bahwa mereka mengetahui cara mengawetkan spesimen dan mengirimnya ke herbarium-herbarium yang ditunjuk. Buku pegangan ini memuat informasi yang dapat membantu semua pakar praktis patologi tanaman dalam memenuhi tanggungjawabnya untuk membantu memperbanyak jumlah koleksi herbarium penyakit tanaman nasional dan koleksi-koleksi patogen tanaman, serta memberikan acuan siap pakai yang berguna bagi kurator herbarium dan koleksi.

2 KOLEKSI PATOGEN TANAMAN

2.1 HERBARIUM

Herbarium merupakan koleksi spesimen-spesimen biologi, tempat tanaman atau tumbuhan dan jamur yang mati, dikeringkan, dipres atau diawetkan dan disimpan secara permanen bersama dengan berbagai informasi tentang spesimen-spesimen tersebut. Kebanyakan herbarium botani hanya memiliki sedikit spesimen mikologi dan patologi tanaman. Sebagai perbandingan, hanya sedikit jumlah herbarium yang dibaktikan untuk mikologi atau patologi tanaman. Herbarium penyakit tanaman sebenarnya merupakan koleksi rangkap dua yang memuat spesimen-spesimen inang dan patogennya, termasuk jamur, bakteri, virus, viroid, nematoda, fitoplasma, dan organisme mirip riketsia.

Herbarium mikologi dan informasi yang terdapat di dalamnya digunakan oleh para pakar taksonomi, mikologi, patologi tanaman, ilmuwan kesehatan tanaman, petugas karantina tumbuhan, bioprospektor, dan pembuat kebijakan dalam berbagai disiplin, termasuk keamanan hayati dan konservasi keanekaragaman hayati. Semua herbarium yang dikenal secara resmi memiliki singkatan, misalnya Herbarium Bogoriense (BO) dan CABI Bioscience, UK Centre (IMI). Setiap spesimen dalam suatu koleksi memiliki satu nomor unik yang didahului dengan singkatan nama herbarium. Apabila nomor aksesori (nomor tambahan) dari suatu spesimen diketahui, maka spesimen itu dapat diketahui tempatnya dengan bantuan *Index Herbariorum* yang merupakan daftar alamat yang diterbitkan dan memuat lebih dari 3.000 herbarium umum di dunia dan lebih dari 9.000 orang staf yang berasosiasi dengan herbarium-herbarium tersebut. Daftar alamat herbarium tersebut tersedia di internet [<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>] dan informasi dapat ditelusuri menurut nama lembaga, singkatan, anggota staf dan bidang keahliannya. *Index Herbariorum* merupakan proyek kerjasama antara Perhimpunan Internasional Taksonomi Tumbuhan (International Association for Plant Taxonomy) dan Kebun Raya New York (New York Botanical Garden).

2.2 KOLEKSI KULTUR

Koleksi kultur mengurus isolat-isolat jamur dan bakteri hidup yang disimpan dalam keadaan stabil hingga diperlukan untuk digunakan di masa mendatang. Teknik-teknik pengawetan (preservasi) kultur berkisar dari pertumbuhan terus-menerus hingga metode-metode yang dapat mengurangi, atau idealnya menghentikan, metabolisme.

Federasi Dunia untuk Koleksi Kultur (The World Federation for Culture Collections, WFCC) [www.wfcc.info] memainkan peran internasional yang penting dalam koleksi, pembuktian keaslian, pemeliharaan dan penyebaran kultur mikroorganisme dan kultur sel. Maksud dan tujuannya adalah untuk mempromosikan dan mendukung pembangunan koleksi kultur dan jasa-jasa yang terkait, sebagai penghubung, dan membuat jaringan informasi antar koleksi dan para penggunanya, untuk menjamin ketahanan hidup jangka panjang dari koleksi kultur. WFCC telah mengembangkan

pangkalan data internasional mengenai sumber-sumber kultur di seluruh dunia. Pangkalan data ini dipelihara di Lembaga Genetika Nasional (The National Institute of Genetics) di Jepang dan memiliki catatan tentang lebih dari 500 koleksi kultur yang berasal dari 62 negara. Catatan-catatan itu memuat data tentang organisasi, pengelolaan, jasa, dan minat ilmiah dari koleksi-koleksi. Pangkalan data tersebut menjadi sumber informasi yang penting bagi semua kegiatan mikrobiologi dan juga berperan sebagai pusat untuk kegiatan data di antara para anggota WFCC.

2.3 MEMBANGUN KOLEKSI

Spesimen-spesimen yang ditemukan di herbarium dan di koleksi kultur sangatlah berbeda. Herbarium menyimpan spesimen-spesimen mati, sedangkan koleksi kultur memelihara isolat-isolat mikroorganisme yang hidup. Para pakar patologi tanaman perlu bekerja dengan kedua tipe material itu, baik material tumbuhan yang mati maupun kultur yang hidup. Seringkali, herbarium patologi tanaman juga mengurus koleksi kultur. Kadangkala, beberapa kelompok yang berbeda dalam suatu organisasi, masing-masing bertanggung jawab terhadap satu koleksi. Bukan hal yang luar biasa bagi badan-badan atau departemen-departemen pemerintah yang berlainan memiliki tanggung jawab untuk mengurus herbarium dan koleksi kultur. Idealnya, di suatu wilayah atau negara terdapat hubungan yang erat antara herbarium dan koleksi kultur yang memelihara patogen tanaman.

Perlengkapan dasar yang diperlukan untuk menempatkan herbarium dan koleksi kultur ditunjukkan pada Gambar 1. Baik herbarium maupun koleksi kultur, keduanya dapat berbagi peralatan administratif dan eksternal, misalnya pangkalan data spesimen dari catatan-catatan koleksi.



Gambar 1 Peralatan yang diperlukan untuk menempatkan herbarium penyakit tanaman dan kultur penyakit tanaman

2.4 DAFTAR HAMA PENYAKIT

Daftar hama penyakit merupakan kompilasi (himpunan) hama dan penyakit yang tercatat di suatu negara atau wilayah yang diketahui berpengaruh terhadap tanaman inang tertentu. Informasi yang berkaitan dengan status kesehatan (penyakit) tanaman pertanian, pepohonan hutan, jenis-jenis asli dan yang diintroduksi memiliki banyak kegunaan, tetapi daftar ini penting khususnya bila negara-negara mencoba untuk mengeksport komoditas ke pasar-pasar luar negeri.

Daftar hama penyakit yang paling dapat dipercaya adalah yang didukung oleh spesimen-spesimen bukti, sedangkan yang kurang dapat dipercaya adalah daftar hama penyakit yang tidak didukung oleh spesimen, tetapi hanya oleh pustaka atau laporan-laporan lembaga. Tingkat dapat dipercaya (reliabilitas) juga bergantung kepada keterampilan para kolektor dan pendeterminasi, cara mendeterminasi, cara mengidentifikasi, dan tingkat mutu pencatatan atau penerbitan. Laporan-laporan

yang dibuat oleh pakar taksonomi yang diterbitkan di majalah internasional setelah disetujui referee lebih dapat dipercaya daripada laporan yang tidak memiliki tingkat validasi seperti ini (Gambar 2).

Sumber-sumber informasi menurut pilihan

1. Koleksi hama penyakit di fakultas pertanian, fasilitas penelitian, universitas, dan lembaga-lembaga lain.
2. Pustaka primer: jurnal ilmiah, makalah penelitian, buku, laporan karantina, surat-menyurat dari petugas kesehatan dan karantina tanaman.
3. Pustaka sekunder: *CABI crop protection compendium*.
4. Pustaka 'abu-abu': prosiding seminar, pamflet, laporan PRA (*Pest Risk Analysis*).
5. Informasi lainnya: konsultasi dengan ahli-ahli lokal dan luar negeri, laporan surat kabar, dan sumber-sumber elektronik (internet).

Gambar 2 Sumber-sumber informasi untuk membuat daftar hama penyakit tanaman berdasarkan urutan pilihan

Format daftar hama penyakit bergantung kepada kebutuhan para penggunanya. Informasi apa yang mereka perlukan? Apa yang akan mereka lakukan dengan daftar itu? Gambar 3 menunjukkan suatu contoh daftar hama penyakit yang merinci patogen-patogen yang ditemukan pada tanaman inang di suatu lokasi tertentu disertai dengan nama-nama umum dari penyakit-penyakit yang diakibatkannya.

CARICACEAE

***Carica papaya* L. (pepaya)**

Alternaria tenuis Nees - Bercak kasar dan keras pada buah

Ascochyia caricae Pat. - Bercak hitam

Botryosphaeria rhodina (Berk. & M.A. Curt.) Arx - Busuk buah

Colletotrichum acutatum J.H. Simmonds - Bercak pada buah masak

Corynespora cassiicola (Berk. & M.A. Curt.) C.T. Wei - Bercak pada daun

Glomerella cingulata (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk - Bercak pada buah masak

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

Phytophthora cinnamomi Rands - Busuk akar

Sclerotium rolfsii Sacc. - Rebah semai

Thanatephorus cucumeris (A.B. Frank) Donk - Rebah semai

Verticillium dahliae Kleb. - Layu

Gambar 3 Contoh daftar penyakit pada pepaya

Daftar hama penyakit dibuat dari hasil:

- Pengamatan (*surveillance*);
- Pengumpulan spesimen;
- Pengawetan spesimen dalam koleksi yang dipelihara dengan baik;
- Survei yang direncanakan dengan baik, yang menjamin ditargetkannya komoditas dan daerah produksi terkait;
- Kerja sama dengan badan-badan lain; dan
- Jaminan catatan-catatan koleksi spesimen yang memenuhi standar ISPM 8.

Menurut sejarah, penyusunan daftar hama penyakit merupakan hal yang sulit, tidak mudah, mencerminkan masalah dalam pengaksesan informasi di berbagai herbarium yang terpencar dan seringkali merupakan bagian dari lembaga-lembaga yang berbeda, termasuk:

- Departemen Pertanian dan Departemen Kehutanan nasional atau negara bagian;
- Museum ilmu pengetahuan alam;
- Lembaga penelitian komoditas tanaman tertentu, dan
- Para ilmuwan peneliti dan lembaga akademis.

Mengingat pentingnya informasi yang ada di herbarium penyakit tanaman dan koleksi patogen, maka semua catatan perlu dimasukkan ke dalam pangkalan data dan tersedia secara elektronik bagi para penggunanya. Sistem teknologi informasi khusus juga tersedia, yang dapat mempermudah pencarian lokasi spesimen dan catatan-catatan penyakit di berbagai koleksi dengan mudah dan cepat. Perangkat lunak yang diperlukan untuk tugas ini relatif murah, namun proses penambahan catatan ke dalam

pangkalan data lebih mahal. Cara memperoleh data merupakan masalah yang terus menerus ada dan terdapat dimana-mana selama tahap awal pengembangan pangkalan data. Oleh karena itu, diperlukan tanggung jawab terus menerus dari lembaga-lembaga terkait untuk menyediakan sumber-sumber guna entri data. Pertimbangan penting lainnya dalam pengembangan pangkalan data ialah mutu dan jumlah informasi pokok yang mendasari. Di banyak lembaga, diperlukan sejumlah pekerjaan yang nyata dalam bidang taksonomi, baik dalam menguji kebenaran catatan-catatan yang ada maupun membersihkan timbunan spesimen yang belum diidentifikasi. Yang juga penting ialah bahwa negara-negara membuat standar data minimal untuk catatan-catatan hama penyakit guna menjamin agar dapat memenuhi standar internasional yang ditentukan dalam IPPC (ISPM 8). ISPM 8 mendaftar informasi dasar yang diperlukan untuk membuat catatan hama penyakit (Gambar 4).

Apa yang ada di dalam catatan hama penyakit yang benar ?

1. Nama ilmiah hama/ penyakit (marga, jenis, takson di bawah jenis)
2. Tingkat kehidupan atau keadaan
3. Kelompok taksonomi
4. Cara identifikasi (termasuk nama pengidentifikasi)
5. Tanggal koleksi (termasuk nama kolektor)
6. Rincian tempat koleksi:
 - a. tempat (kota & negara bagian, kabupaten atau propinsi)
 - b. negara
 - c. koordinat GPS (garis lintang & garis bujur)
7. Nama ilmiah tanaman inang (marga, jenis, takson di bawah jenis)
8. Kerusakan tanaman inang
9. Prevalensi
10. Acuan bibliografi

Gambar 4 Informasi yang diperlukan untuk catatan hama penyakit, dimodifikasi dari ISPM 8

Di kebanyakan negara tidak terdapat pusat penyimpanan informasi kesehatan tanaman, karena koleksi acuan yang memiliki catatan-catatan penyakit biasanya terpecah di banyak lembaga. Hal ini menghambat arus informasi yang tersedia dan, karena tingkat-tingkat prioritas yang berbeda boleh jadi selaras dengan masing-masing koleksi, mutu data juga dapat sangat bervariasi. Perkembangan mutakhir dalam teknologi informasi saat ini memberi peluang untuk menanggulangi masalah ini. Teknologi pangkalan data yang telah disebar-luaskan memberi peluang bagi pangkalan-pangkalan data yang beragam dan terisolasi secara geografis untuk dihubungkan satu sama lain, sehingga semua data yang tersedia dapat diakses dari satu tempat. Pada dasarnya, teknologi dapat digunakan untuk menciptakan pangkalan data tunggal, secara nasional ataupun regional yang dapat diurus dan diperbaharui secara teratur di tingkat lokal. Selanjutnya, catatan-catatan penyakit dapat diakses melalui situs internet, dengan pertimbangan yang layak diberikan kepada kepemilikan, pengawasan akses dan otorisasi (data tertentu boleh jadi dilindungi dengan 'password'). Pertanyaan-pertanyaan dari pengguna dapat menghasilkan daftar jenis (spesies), dan memberikan informasi tentang sebaran dan kisaran tanaman inangnya.

Sistem pangkalan data yang telah disebar-luaskan, yang memiliki kemampuan untuk mengumpulkan dan mengintegrasikan data kesehatan tanaman dari sejumlah lembaga, mungkin untuk digunakan, dengan syarat:

- Lembaga-lembaga yang bertanggung jawab terhadap koleksi patogen memiliki catatan-catatan penyakit yang disimpan di dalam pangkalan data elektronik yang memiliki hubungan dengan internet;
- Tersedia sumberdaya untuk mengembangkan/mengadaptasikan perangkat lunak ‘pintu gerbang’ (*gateway*) atau ‘perantara’ (*broker*) khusus yang diperlukan untuk menghubungkan berbagai macam sumber yang mendasari pangkalan data;
- Lembaga-lembaga tersebut bersedia berbagi data dan memiliki tanggung jawab terus menerus untuk mengurus koleksinya sebagai bagian dari jaringan. Hal ini termasuk memenuhi data standar minimum yang telah disepakati.

3 MEMBANGUN KOLEKSI

3.1 MEMPERBANYAK JUMLAH KOLEKSI

Sumber utama spesimen-spesimen di dalam koleksi patologi tanaman adalah dari para ilmuwan kesehatan tanaman profesional yang bekerja di laboratorium diagnostik, yang biasanya bertempat di departemen-departemen pemerintah, pusat-pusat penelitian, atau universitas. Spesimen-spesimen yang dikumpulkan dari lapangan, terutama selama survei, biasanya dikirim ke laboratorium diagnostik untuk menentukan apakah spesimen akan disimpan atau tidak. Spesimen-spesimen yang mewakili catatan baru tentang patogen, tanaman inang, atau lokasi, sebaiknya disimpan di herbarium yang telah dikenal. Beberapa herbarium memiliki staf yang bertugas mendiagnosis dan kebanyakan memiliki pakar yang akan menentukan identitas kelompok-kelompok patogen tertentu.

Spesimen-spesimen seringkali berasal dari staf dan mahasiswa universitas dan pusat-pusat penelitian. Hal ini terutama karena semua karya yang dipublikasikan seharusnya mencantumkan nama herbarium tempat spesimen-spesimen disimpan. Spesimen-spesimen ini memberikan jalan yang dapat dipercaya untuk memeriksa atau membetulkan identitas patogen yang dicatat dalam survei dan penelitian (ekologi, epidemiologi, filogenetika, morfologi, dan molekuler).

Lebih lanjut spesimen-spesimen dapat bertambah ketika duplikat dan eksikata (seperangkat spesimen kering berlabel) dipertukarkan antar herbarium. Hadiah, pinjaman, dan pembelian merupakan cara lain untuk menambah koleksi spesimen. Pinjaman permanen, yaitu bila seluruh spesimen dipinjamkan untuk waktu tidak terbatas dari satu lembaga kepada lembaga lain, merupakan cara yang bermanfaat untuk melindungi koleksi berharga, baik yang tidak dapat diakses maupun yang tidak dapat disimpan dan diurus secara memadai.

3.2 PENGUMPULAN SPESIMEN DARI LAPANGAN

Kebanyakan spesimen dalam koleksi patogen tanaman berasal dari lapangan, baik dari lingkungan pertanian maupun dari alam bebas. Spesimen tanaman berpenyakit dapat dikenal dari gejala-gejala dan tanda-tanda yang khusus. Gejala adalah perubahan penampilan tanaman atau bagian-bagiannya yang dapat dilihat, yang muncul karena suatu penyakit (Tabel 1). Gejala dapat merupakan akibat dari gangguan terhadap kemampuan tanaman untuk melakukan fotosintesis secara efisien, berkembang-biak, menyerap air, atau mengangkut zat-zat hara.

Gejala	Uraian
antraknos (<i>anthracnose</i>)	jejas hitam, nekrosis, disebabkan oleh <i>Colletotrichum</i>
embun hitam (<i>black mildew</i>)	koloni jamur parasit (Meliolales) yang hitam dan rapat, biasanya di permukaan daun tanaman tropik
hawar (<i>blight</i>)	kematian jaringan tanaman yang terjadi secara cepat dan menyebar luas

kanker (<i>canker</i>)	jejas nekrosis cekung yang sering terdapat pada batang berkayu, cabang, atau akar
rebah semai (<i>damping-off</i>)	kerebahan dan pembusukan semai dekat permukaan tanah sebelum muncul atau segera setelah muncul di atas tanah, disebabkan oleh jamur seperti <i>Pythium</i> dan <i>Rhizoctonia</i>
mati pucuk (<i>dieback</i>)	kerontokan daun sebagian, kematian ranting dan cabang, dan bahkan kematian seluruh bagian tanaman
bulai, embun berbulu (<i>downy mildew</i>)	'bloom' keputih-putihan pada daun dan batang yang disebabkan oleh koloni sporangiosfor dan sporangia anggota Peronosporales
enasi (<i>enation</i>)	pertumbuhan abnormal dan kecil dari jaringan inang, sering berupa perluasan mendatar dari pembuluh-pembuluh, terutama pada daun dan bunga
fasiasi (<i>fasciation</i>)	pertumbuhan berlebihan (proliferasi) pada tunas yang tampak sebagai berkas-berkas tipis dan mendatar dari tunas yang melengkung atau keriting
puru, nyali (<i>gall</i>)	pembengkakan yang abnormal atau tumor
gumosis (<i>gummosis</i>)	keluarnya getah dari jaringan inang
lesio, belur (<i>lesion</i>)	areal tertentu dan terbatas dari jaringan yang sakit
mosaik (<i>mosaic</i>)	variasi tak sempurna dari warna hijau muda dan hijau tua pada daun, yang merupakan gejala dari banyak penyakit virus
filodium (<i>phylloidy</i>)	bunga yang berubah bentuk menjadi struktur seperti daun
embun tepung (<i>powdery mildew</i>)	'bloom' seperti tepung berwarna putih di permukaan tanaman, terdiri atas miselium jamur, konidiofor dan konidia jamur embun tepung (Erysiphales)
bisul, pustul (<i>pustule</i>)	lepuh di tempat munculnya jamur
buncak akar (<i>root knot</i>)	pembengkakan atau puru (nyali) pada akar yang disebabkan oleh nematoda tertentu
busuk (<i>rot</i>)	pelunakan dan disintegrasi jaringan tanaman oleh enzim yang dihasilkan patogen (dapat keras, lunak, kering, basah, hitam, putih, dsb.)
karat (<i>rust</i>)	bisul yang dibentuk oleh jamur karat (Uredinales)
kudis (<i>scab</i>)	areal sakit yang kasar, dangkal, menyerupai kerak
lepuh (<i>scald</i>)	jaringan yang tampak seakan-akan terbakar oleh air panas
lubang gotri (<i>shot hole</i>)	penyakit daun dengan jaringan mati yang luruh dan meninggalkan lubang bundar
jamur api (<i>smut</i>)	massa spora hitam pada daun, batang dan bunga, disebabkan oleh jamur api (Ustilaginomycetes)
jamur jelaga (<i>sooty mold</i>)	lapisan koloni saprobik yang rapat dari jamur yang berwarna gelap dan dangkal (seringkali Capnodiales) yang hidup pada kotoran serangga

menghijau (<i>virescence</i>)	(seringkali afid atau kutu) pada permukaan daun dan cabang munculnya warna hijau di bagian-bagian tanaman yang biasanya tidak berwarna hijau, terutama pada bunga
layu (<i>wilt</i>)	hilangnya pembengkakan dan terkulainya bagian-bagian tanaman
sapu setan (<i>witches' broom</i>)	proliferasi (pertumbuhan yang tidak teratur dan berlebihan) pada kuncup dan tunas yang muncul pada atau dekat tempat yang sama

Tabel 1 Beberapa gejala umum dan pertelaan penyakit tanaman

Tanda adanya penyakit adalah kehadiran patogen yang dapat dilihat, misalnya tubuh buah atau kotoran yang berkaitan dengan penyakit. Beberapa tanda umum penyakit adalah:

- **Askomata, aservuli, konidiofor, piknidia**, struktur tubuh buah jamur kecil yang menghasilkan konidia
- **Basidiokarp**, tubuh buah Polyporales atau Agaricales
- **Miselium**, massa hifa jamur (benang-benang jamur)
- **Ooze**, cairan lengket yang keluar dari luka atau lubang
- **Rizomorff**, untaian hifa jamur seperti tali (seringkali berwarna tua).

3.3 PENANGANAN SPESIMEN

Pemilihan spesimen, baik untuk mendiagnosis penyakit tanaman maupun sebagai sumber taksonomi, memerlukan kehati-hatian. Contoh-contoh tanaman terbaik untuk dikumpulkan adalah yang berada pada tingkat awal hingga pertengahan perkembangan penyakit, ketika patogen masih aktif. Contoh-contoh tanaman berpenyakit parah seringkali tidak dapat digunakan, karena patogennya mungkin sudah tidak dapat hidup dan organisme saprob mungkin sudah mengkolonisasi jaringan-jaringan nekrotik, sehingga isolasi patogen sulit dilakukan. Pemilihan material juga penting. Pengetahuan dasar tentang gejala dan cara terbentuknya diperlukan untuk menjamin bahwa bagian tanaman yang dikumpulkan terinfeksi patogen. Pada beberapa kasus, gejala-gejala penyakit dapat muncul di satu bagian tanaman, tetapi patogennya ditemukan di tempat lain, misalnya, penyakit layu yang gejalanya muncul pada daun, meskipun patogennya terdapat di dalam sistem pembuluh pada akar dan batang. Daftar perlengkapan yang berguna untuk perjalanan koleksi dapat dilihat pada Gambar 5.

Perlengkapan			
Gunting Stek	Pengepres tanaman	Koran	Label
Lensa tangan	Sekop	Kantong kertas	Kantong plastik
Gunting	Tinta penanda	Amplop	Pensil
GPS	Gergaji tangan	Parang	Peti es
Peta	Pustaka		

Gambar 5 Perlengkapan yang biasa digunakan untuk koleksi spesimen penyakit tanaman

Beberapa asas penting pada waktu mengumpulkan dan menangani spesimen penyakit tanaman adalah:

- Tentukan identitas tanaman inang. Apabila identitas tanaman inang tidak jelas maka material tanaman yang sehat, terutama sekali bunga dan buah, sebaiknya dikumpulkan. Anda seharusnya yakin bahwa material sehat yang dipilih untuk identifikasi inang adalah benar-benar tanaman inang. Hal ini khususnya penting sewaktu mengumpulkan jamur api dan penyakit lainnya yang merusak perbungaan rumput-rumputan yang seringkali tumbuh dalam populasi campuran.
- Gunakan kantong kertas untuk spesimen. Jangan membungkus material tanaman herba segar dengan plastik, karena akan menyebabkan contoh tanaman berembun yang mendorong jasad saprob cepat menduduki dan membusukkan jaringan tanaman. Kantong plastik sebaiknya hanya digunakan untuk penyimpanan jangka pendek spesimen yang lembab.
- Contoh-contoh tanaman perlu dipak untuk menghindari terjadinya kerusakan oleh peremasan dan kondensasi. Kelembaban permukaan akan mendorong pertumbuhan saprob dan menyebabkan contoh tanaman tidak berguna.
- Tulislah label dengan pensil; tinta tidak cocok, karena luntur jika lembab.
- Dapatkan izin-izin yang diperlukan untuk koleksi dan pemindahan spesimen. Di beberapa daerah koleksi spesimen biologi mungkin dilarang, misalnya di taman-taman nasional dan lahan pribadi. Perpindahan spesimen antar negara memerlukan izin-izin impor dan ekspor serta izin karantina.

3.3.1 Daun, batang dan buah

Daun-daun sebaiknya dikumpulkan ketika permukaannya kering, tetapi jika hal ini tidak mungkin, keringkan daun-daun itu dengan cara menghisap menggunakan kertas koran sebelum meletakkannya di antara tumpukan koran baru atau kertas penghisap lain. (**Jangan** menggunakan kertas tisu, karena hancur jika basah dan sulit dibersihkan dari contoh tanaman). Pres dan keringkan material daun, pastikan untuk membentangkan daun-daun agar tidak tumpang tindih. Apabila daunnya tebal atau berdaging sekali, kertas koran perlu diganti setiap hari hingga daun menjadi kering.

Potongan-potongan batang yang dikumpulkan sebaiknya memiliki areal jaringan yang sehat dan yang sakit. Selanjutnya, secara hati-hati, bungkuslah contoh-contoh

tanaman tersebut satu per satu dengan kertas koran, karena jika dipak bersama-sama mudah rusak.

Sewaktu mengumpulkan spesimen berdaging seperti buah, pilihlah contoh yang tingkat perkembangan gejala penyakitnya masih dini hingga tingkat pertengahan. Pembusukan sekunder dan saprob seringkali menguasai buah pada tingkat perkembangan gejala yang lanjut, sehingga sulit untuk mendiagnosis patogen penyebabnya. Bungkuslah spesimen buah secara terpisah dengan kertas koran yang kering dan jangan membungkusnya dengan plastik.

Jamur karat dan jamur api

Ketika mengumpulkan jamur karat, periksalah kedua sisi daun untuk menemukan teliospora yang berwarna hitam-coklat dan urediniospora yang kuning-jingga. Jamur api sering merusak perbungaan atau bagian-bagian perbungaan, rerumputan dan 'sedges'. Determinasi tanaman inang secara hati-hati perlu sekali agar identifikasi jamur api dapat dilakukan dengan tepat, namun hal ini sulit dilakukan jika perbungaan telah rusak. Lipatlah contoh tanaman yang sakit dengan kertas koran, sehingga spora jamur karat dan jamur api ada di dalamnya.

Penyakit-penyakit bakteri

Contoh tanaman yang diduga berpenyakit bakteri lebih sulit dikumpulkan dan dikirim ke laboratorium yang jauh, karena kehancuran jaringan seringkali terjadi secara cepat. Taruhlah contoh di dalam kantong kertas dan bungkuslah dengan kertas koran yang dibasahi agar tidak menjadi kering. Jika mungkin, taruhlah contoh di tempat yang sejuk dan jauh dari sinar matahari. Spesimen-spesimen bercak daun dan hawar yang dipres dan dikeringkan sebaiknya disimpan untuk digunakan sebagai material herbarium dan juga sebagai sumber acuan. Banyak bakteri patogen yang dapat bertahan hidup selama berbulan-bulan, atau bahkan bertahun-tahun di dalam material kering yang disimpan pada suhu kamar.

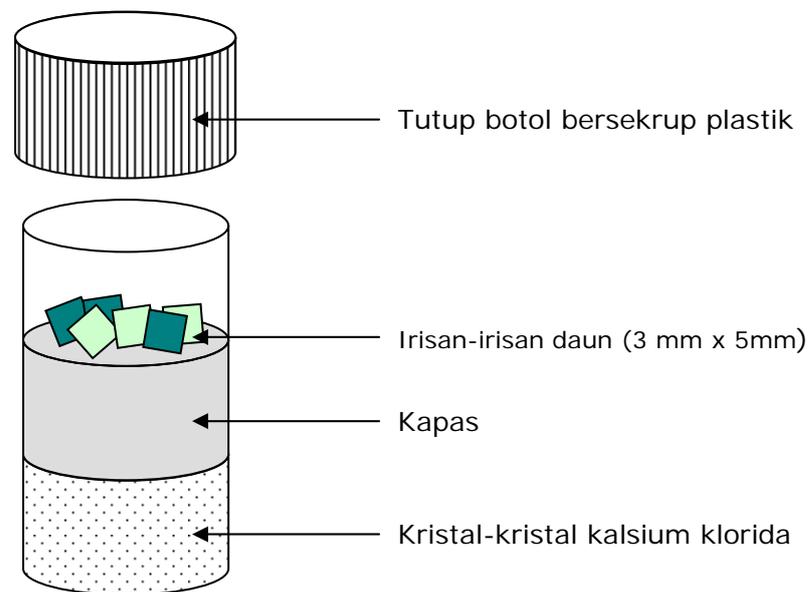
Penyakit-penyakit virus

Material tanaman yang diduga terinfeksi virus dapat dikumpulkan dan diawetkan untuk sementara dengan menggunakan desikator kecil (Gambar 6). Desikator tersebut dibuat dengan cara mengisi tabung plastik dengan kristal-kristal kalsium klorida (CaCl_2) atau silika gel hingga sepertiga isinya. Spesimen sebaiknya dipisahkan dengan kapas dari bahan pengering tersebut. Teknik ini paling baik dilakukan pada suhu $0-4^\circ\text{C}$, tetapi juga cukup baik pada suhu kamar.

Gunting atau pisau skalpel yang aman digunakan untuk mengiris jaringan daun. Jika daun berdebu, tertutup jamur jelaga atau serangga sisik (kutu kebul) dapat dibersihkan dengan cara menyekanya, menggunakan air atau alkohol. Irisan-irisan daun sebaiknya diambil dari bagian tengah helai daun. Irislah daun menjadi potongan-potongan berukuran 3 mm x 5 mm dan taruhlah 5–10 lembar di dalam setiap desikator. Setiap akan memotong contoh tanaman, gunting dan pisau pengaman yang digunakan perlu disterilkan dengan alkohol atau larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 10% untuk menghindari kontaminasi silang.

Cara lain, spesimen-spesimen yang diduga terinfeksi virus dapat ditempatkan di dalam kantong plastik bersama-sama dengan beberapa kertas yang dibasahi dan ditaruh di dalam peti es untuk diangkut ke laboratorium diagnostik spesialis. Kondisi

ini memungkinkan material tanaman tetap segar.



Gambar 6 Desikator untuk menyimpan contoh daun yang terinfeksi virus

3.3.2 Akar dan tanah

Jaringan akar yang sakit atau struktur patogen yang berasosiasi dengan perakaran seringkali sangat mudah rusak. Jangan mencabut tanaman dari tanah, karena dengan cara ini jaringan yang sakit atau patogen akan terpotong, sehingga diagnosis menjadi lebih sulit.

Kurangilah tanah yang berlebihan atau, jika mungkin, cucilah akar-akar dengan hati-hati, kecuali jika contoh tersebut akan diperiksa keberadaan nematodanya. Tanah mengandung banyak mikroorganisme yang siap mengkolonisasi jaringan yang mati atau hampir mati. Saprob-saprob ini dapat mengganggu upaya untuk memperoleh patogen dari jaringan yang sakit. Ketika melepaskan tanah dari perakaran, **jangan** menggosok perakaran tersebut, karena hal ini dapat menyebabkan hilangnya jaringan akar yang mungkin penting dalam diagnosis penyakit. Bungkuslah perakaran dengan kertas koran untuk dibawa ke laboratorium.

Contoh tanah yang cukup banyak perlu diambil untuk memberi gambaran yang tepat mengenai situasi penyakit. Kendala utama dalam pengumpulan contoh tanah yang banyak ialah bobot dan volume tanah yang diambil. Waktu dan ruangan yang diperlukan untuk pemrosesan contoh juga harus dipertimbangkan.

Patogen-patogen bawaan tanah biasanya tidak tersebar secara merata di dalam tanah; mereka cenderung membentuk kelompok-kelompok atau kumpulan, baik pada kondisi yang paling sesuai maupun di sekitar tempat infeksi. Strategi yang terbaik ialah mengumpulkan sejumlah contoh secara acak dengan memperhitungkan sebaran patogen yang tidak merata. Pada dasarnya, semakin banyak contoh tanah yang diambil semakin akurat keseluruhan penilaian penyakit.

Jumlah contoh yang dikumpulkan beragam, bergantung kepada kondisi saat itu, tetapi umumnya sejumlah contoh individual perlu diambil, kemudian dicampur menjadi satu, menjadi contoh yang sebenarnya. Material gabungan beberapa contoh tersebut dicampur rata, kemudian diambil bagian contoh yang lebih kecil. Jika mengambil contoh untuk nematoda, penanganan tanah harus dilakukan secara hati-hati agar tidak menimbulkan kerusakan fisik pada nematodanya karena goresan.

Pengambilan contoh tanah yang sangat basah atau sangat kering sebaiknya dihindari. Contoh tanah sebaiknya diambil dari kedalaman minimal 5–10 cm di bawah permukaan, karena di sini, di zona akar, patogen-patogen tanaman cenderung paling banyak dijumpai. Jika pertanaman memperlihatkan bidang-bidang yang pertumbuhannya tidak baik, contoh tanah yang diambil dari tempat yang paling terpengaruh dipisahkan dari contoh tanah dari daerah yang sehat, sehingga dapat dibuat perbandingan. Masing-masing contoh tanah sebaiknya memiliki bobot sekitar 250–300 g.

Jika semuanya memungkinkan, sebaiknya perakaran dimasukkan ke dalam contoh atau dibawa secara terpisah. Untuk tanaman herba, kira-kira 25–100 g contoh jaringan akar cukup memadai (bobot yang lebih rendah sesuai untuk sayuran, sedangkan bobot yang lebih tinggi lebih cocok untuk tanaman dengan perakaran besar, seperti pisang). Untuk tanaman berkayu mungkin perlu menggali hingga kedalaman 30 cm dekat pangkal pohon atau sampai ditemukan perakaran yang menunjukkan batas antara jaringan sehat dan yang sakit.

Contoh-contoh tanah sebaiknya ditaruh di dalam kantong plastik yang kuat dan diberi label kertas dengan tulisan pensil atau label plastik yang ditempatkan di dalam kantong. Contoh-contoh tersebut sebaiknya ditaruh di tempat yang sejuk, tidak ditaruh di bawah terik matahari atau di kendaraan terkunci yang diparkir di bawah sinar matahari. Contoh-contoh seharusnya diperlakukan dengan hati-hati dan segera diproses atau dikirim untuk dianalisis. Jika pengiriman atau pemrosesan dengan segera tidak memungkinkan, contoh-contoh dapat disimpan di dalam lemari es dengan suhu 4–8°C selama beberapa hari tanpa mengalami kemunduran.

3.3.3 Jamur besar

Jamur-jamur berdaging, terutama sebagian besar anggota Agaricales, paling mudah ditemukan, tetapi seringkali paling sulit untuk dibawa ke laboratorium. Beberapa spesimen yang sehat dari berbagai tingkat perkembangan sebaiknya dikumpulkan. Jangan mengambil jamur besar dengan cara mencabutnya dan usahakan agar batangnya tidak patah. Galilah jamur-jamur itu sedemikian rupa sehingga tidak merusak bagian pangkalnya. Jamur-jamur itu sebaiknya dibungkus satu per satu dengan kertas koran dan ditaruh dengan hati-hati di dalam wadah agar tidak terpencet.

Spesimen-spesimen jamur besar perlu segera dikeringkan. Bergantung kepada situasi, hal ini dapat dilakukan dengan beberapa cara:

- di dalam oven dengan ventilasi-kipas (45°C, semalam);
- dengan pengering buah listrik; dan

- menggunakan sumber panas, misalnya api kemah, pemanas gas, lampu minyak, atau di bawah sinar matahari.

Cetakan-cetakan spora, terutama sekali warnanya, merupakan pertolongan penting untuk mengidentifikasi jamur-jamur besar yang memiliki bilah. Cetakan spora dibuat dengan memotong pileus (tudung) dan menempatkannya (dengan bilah ke arah bawah) di atas kertas karton putih selama 15 menit hingga beberapa jam. Wadah perlu digunakan untuk menutupi material itu guna melindunginya agar aliran udara tidak mengganggu cetakan. Mungkin sulit untuk melihat cetakan spora jamur berspora putih, dan sebaiknya digunakan kertas karton hitam. Warna spora mudah dilihat dari cetakan spora dan ini juga memberikan kesan yang jelas tentang pola bilah.

3.4 PELABELAN SPESIMEN

Spesimen yang diberi label tidak sebagaimana mestinya sebenarnya tidak ada gunanya, bagaimanapun baiknya contoh tersebut. Rincian informasi koleksi yang seharusnya menyertai spesimen termasuk :

- Nama tanaman inang dan bagian tanaman yang terserang;
- Letak tempat yang sebenarnya, kota, negara bagian/propinsi/kabupaten, negara (garis bujur/garis lintang, dan ketinggian tempat, jika diketahui). Alat Sistem Posisi Global (*Global Positioning System*, GPS) adalah cara terbaik untuk memperoleh koordinat yang tepat. GPS mengikuti jalan satelit yang mengorbit bumi. Dengan menggunakan tiga satelit, GPS dapat menghitung garis bujur dan garis lintang dengan benar. Dengan menggunakan empat satelit, GPS dapat menentukan ketinggian tempat. Koordinat-koordinat yang ditentukan oleh GPS memungkinkan dikembangkannya peta sebaran yang akurat untuk patogen tanaman;
- Tanggal koleksi;
- Nama kolektor (nomor koleksi, jika diberikan); dan
- Gejala penyakit dan keparahannya (misalnya, jumlah tanaman yang terserang).

Semua spesimen yang diserahkan kepada suatu herbarium harus diberi label sebagaimana mestinya (Gambar 7). Nama orang yang menyerahkan spesimen dan rincian kontakannya adalah penting. Alasan untuk menyerahkan contoh itu juga harus dinyatakan dengan jelas, misalnya untuk diagnosis atau untuk disimpan.

BRIP

Genus *Puccinia*

Species *asparagi*

Host genus *Asparagus* species *officinalis*

Host variety/cultivar UC157

Common name *Asparagus*

Symptom(s) reddish lesions on stems, some whole ferns dead, sporadic appearance of symptoms in block

Collector(s) Christine Horlock and Liot-Heng Cheah

Date collected 15 August 2003 Collector No. CMH 6093

Grower Ian Neilson

Precise location "Miandetta", Little Bridge Rd, approx. 6 km east of Warrivik

Town Warrivik State QLD, Australia

Latitude 28° 16.368 S Longitude 152° 05.701 E

Additional information Symptoms appear to indicate early and late infection, mainly urediniospores at this stage, some teliospores too.

Gambar 7 Contoh catatan koleksi lapangan yang digunakan di herbarium BRIP

3.5 SURVEI DAN PENGAMBILAN CONTOH

Survei digunakan untuk menentukan jenis dan beratnya penyakit tanaman yang mempengaruhi tanaman inang. Survei penyakit tanaman diperlukan untuk:

- Menentukan sebaran dan status hama penyakit di suatu daerah. Hal ini mungkin untuk persyaratan daerah bebas yang memberi kemudahan ekspor dan akses pasar dengan cara menentukan ada tidaknya penyakit-penyakit tertentu yang penting dari sudut karantina;
- Memprioritaskan masalah-masalah penyakit dan memberi pedoman untuk pengelolaan hama penyakit agar pengalokasian sumber-sumber perlindungan tanaman dapat dilakukan;
- Menemukan penyakit-penyakit asing dan yang baru muncul;
- Menilai kerugian tanaman dan menentukan tingkat kesehatan tanaman;
- Memahami dinamika hama penyakit;
- Mengidentifikasi inang pilihan;
- Menilai kemandirian tindakan-tindakan pengendalian;
- Menentukan kelaziman (prevalensi) hama tanaman dan menghubungkannya dengan kerusakan tanaman; serta
- Mengidentifikasi musuh-musuh alami.

Survei dapat bersifat kualitatif atau kuantitatif. Survei kualitatif menentukan apakah penyakit tanaman tertentu ada atau tidak ada. Survei kuantitatif menentukan

banyaknya penyakit tanaman tertentu, khususnya dalam kaitannya dengan jumlah kerusakan yang disebabkan pada tanaman inang.

Survei tersebut harus meliputi tempat-tempat yang mewakili suatu kawasan dan mencakup wilayah yang cukup luas untuk memperoleh tingkat keakuratan yang dikehendaki. Maksud dan tujuan survei akan menentukan perlengkapan, teknik dan keterampilan yang diperlukan untuk melakukan survei. Jumlah informasi yang akan dikumpulkan dan tingkat keakuratan akan menentukan skala survei.

Tatacara pengambilan contoh sebaiknya sederhana, mewakili dan dapat dipercaya. Taksiran kasar mengenai ukuran contoh dapat diperoleh dari survei percobaan yang menaksir intensitas penyakit untuk sejumlah ukuran contoh yang berlainan. Dengan membandingkan hasil-hasil ini dimungkinkan untuk memilih ukuran contoh terkecil yang diperlukan untuk memperoleh taksiran yang dapat dipercaya mengenai intensitas penyakit.

Merupakan hal yang penting bahwa pola pengambilan contoh yang mana saja memperhitungkan sebaran penyakit. Tanaman-tanaman yang sakit mungkin dapat memiliki sebaran secara acak, teratur atau mengelompok. Pengambilan contoh secara acak seringkali memberikan hasil yang baik, karena banyak penyakit tanaman memiliki sebaran yang mengelompok. Kadang-kadang diperlukan pola-pola pengambilan contoh yang lebih sistematis.

Untuk survei khusus, informasi yang lebih rinci mengenai cara terbaik untuk melakukan survei tersebut harus diperoleh. Pertimbangan-pertimbangan lainnya adalah pemilihan waktu survei dan kelayakan bagian tanaman yang diambil contohnya sebagai indikator penyakit. Untuk informasi lebih lanjut mengenai cara melakukan survei di kawasan Asia-Pasifik dapat mengacu kepada Dr. Teresa McMaugh¹³⁾ di Office of the Chief Plant Protection Officer (OCPPO), Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, DAFF.

¹³⁾ Dr. McMaugh sedang mengkoordinasi penerbitan buku *Guidelines for Plant Pest Surveillance in Asia and the Pacific* yang dibiayai oleh Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) dan Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC).

4 PEMERIKSAAN SPESIMEN

Pemeriksaan spesimen dimulai dengan meneliti sifat-sifat makroskopik yang dapat dilihat dengan mata telanjang dan di bawah mikroskop stereo. Langkah berikutnya ialah menyiapkan kaca obyek dan memeriksa struktur jamur yang mana saja berada di bawah mikroskop ganda. Pada tahap ini, penting untuk mengambil ukuran, membuat gambar, dan jika mungkin membuat potret, terutama apabila patogen tidak dikenal oleh kolektor. Idealnya, catatan, gambar dan potret ini sebaiknya disimpan bersama-sama dengan spesimen herbarium.

4.1 PEWARNAAN JAMUR DAN BAKTERI

Kebanyakan jamur dan bakteri dapat diamati dengan mikroskop di dalam setetes kecil air di bawah kaca penutup. Asam laktat dapat digunakan sebagai medium penempel (*mounting*) untuk jamur. Seringkali perlu mewarnai jamur yang memiliki struktur hialin. Dua pewarna penting untuk jamur yang berstruktur hialin ialah biru katun (*cotton blue*) dan lakto-fuksin (*lacto fuchsin*).

Biru katun (atau biru tripan)

Biru katun (atau biru tripan)	0,1 g
Asam laktat	25 ml
Gliserol	50 ml
Air suling	25 ml

Lakto-fuksin

Asam fuksin	0,1 g
Asam laktat	100 ml

Pengamatan bakteri di dalam jaringan tanaman yang terinfeksi ternyata sangat sulit dilakukan. Penggunaan larutan toluidin biru O 0,1% dalam air membantu penemuan bakteri. Irislah sepotong kecil perbatasan antara jaringan yang sakit dan yang sehat, letakkan pada kaca obyek yang bersih dan tambahkan setetes pewarna. Letakkan kaca penutup di atas preparat dan periksa pada perbesaran 400x. Jika ada, seringkali mungkin untuk melihat bakteri yang bergerak di sekitar pinggir-pinggir jaringan yang diiris. Bakteri berwarna biru tua, sedangkan jaringan tanaman berwarna lebih pucat, biru kehijauan.

Toluidin biru O

Toluidin biru O	0,05 g
Air suling	50 ml

Salah satu pembagian yang penting pada bakteri adalah antara mereka yang dapat menahan kompleks kristal lembayung (*crystal violet*) dan yodium terhadap pencucian (*elution*) dengan etanol (Gram positif) dan mereka yang tidak dapat menahan (Gram negatif). Pewarna Gram penting sebagai penentu ciri utama untuk banyak bakteri tanaman. Zat-zat kimia dan tata cara pewarnaan Gram adalah sebagai berikut:

Larutkan 2 g kristal lembayung ke dalam 20 ml etanol 95%. Larutkan 0,8 g amonium oksalat ke dalam 80 ml air suling. Campurlah kedua larutan itu.

Larutan kristal lembayung	
Kristal lembayung	2 g
Etanol 95%	20 ml
Amonium oksalat	0,8 g
Air suling	80 ml

Geruslah yodium dan kalium yodida bersama-sama, kemudian larutkan ke dalam air dan aduk dalam wadah tertutup selama beberapa jam hingga semuanya larut.

Larutan yodium Lugol	
Yodium	1 g
Kalium yodida	2 g
Air suling	300 ml

Buatlah larutan pewarna safranin untuk stok dengan cara melarutkan 2,5 g safranin O ke dalam 100 ml etanol 95%, kemudian encerkan dengan air suling 1:10 untuk digunakan.

Pewarna safranin	
Safranin O	2.5 g
Etanol 95%	20 g

Buatlah suspensi keruh sel-sel bakteri dari kultur yang sedang tumbuh aktif (biasanya berumur 24–48 jam) dalam air steril. Oleskan satu lup (*ose*) penuh suspensi ini ke atas kaca obyek yang bersih. Olesan itu sebaiknya kira-kira 1 cm² sehingga cukup untuk dapat dilihat. Keringkan kaca obyek di udara, kemudian fiksasi dengan cara melewatkan kaca obyek itu beberapa kali di atas nyala api lampu Bunsen. Jangan biarkan kaca obyek menjadi terlalu panas. Fiksasi menjamin bahwa bakteri akan tetap menempel di permukaan kaca obyek selama proses pewarnaan sesudah itu.

Genangi kaca obyek dengan larutan kristal lembayung selama 1 menit. Tuang cairan yang berlebihan dan cuci kaca obyek dengan air keran yang mengalir perlahan

hingga tidak ada lagi pewarna yang dengan jelas dihilangkan dari olesan itu. Genangi kaca obyek dengan larutan yodium Lugol selama 1 menit. Kaca obyek dicuci lagi dengan air keran yang mengalir perlahan dan dikeringkan dengan kertas isap. Cucilah dengan etanol 95% yang mengalir perlahan selama beberapa detik (tidak lebih dari 30 detik) untuk menghilangkan pewarna yang mungkin masih ada, dan dikeringkan dengan kertas isap. Lakukan pewarnaan lagi dengan cara menggenanginya dengan larutan safranin selama 20 detik. Cuci lagi dengan air dan keringkan dengan kertas isap. Periksa kaca obyek di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x setelah ditetesi dengan minyak imersi. Bakteri Gram-positif berwarna biru-lembayung, sedangkan bakteri Gram-negatif berwarna merah-merah muda.

Reaksi Gram dapat dikonfirmasi dengan uji kelarutan kalium hidroksida (KOH). Ambillah satu ose penuh kultur bakteri yang sedang tumbuh aktif dan campur dengan setetes larutan KOH 3% di atas kaca obyek yang bersih dan aduk hingga diperoleh suspensi yang rata. Angkat ose beberapa sentimeter dari kaca obyek. Jika benang lendir bakteri terangkat oleh ose (kira-kira 5-20 mm panjangnya) maka bakteri itu adalah Gram negatif. Jika dihasilkan suspensi berair dan tidak tampak adanya benang lendir setelah ose digerakkan berulang-ulang, maka kultur bakteri itu adalah Gram positif. Perusakan dinding sel organisme Gram negatif yang diikuti dengan pembebasan DNA, yang sangat kental di dalam air, menghasilkan benang lendir. Dinding sel bakteri Gram positif lebih tahan terhadap KOH dan tetap melekat, sehingga tidak ada DNA yang dibebaskan. Uji ini perlu dilakukan bila hasil pewarnaan Gram meragukan.

4.2 MIKROSKOP CAHAYA

Mikroskop stereo berguna untuk pemeriksaan awal spesimen. Mikroskop ganda berkekuatan tinggi yang memberikan perbesaran hingga 1000x diperlukan untuk memeriksa morfologi bakteri dan jamur-jamur mikro.

Untuk memeriksa jamur, sebagian kecil dari jaringan berspora diambil dengan menggunakan mikroskop stereo dengan bantuan jarum penempel atau skalpel runcing dan ditaruh di dalam setetes pewarna, biasanya lakto-fuksin (0,1 g asam fuksin dan 100 ml asam laktat), atau cairan penempel seperti asam laktat (100 ml asam laktat, 200 ml gliserol dan 100 ml air suling). Jika material tanaman terlalu banyak, sedikit tekanan pada kaca penutup dapat menolong memencarkan struktur menjadi bidang optik yang tipis. Gelembung-gelembung udara dapat dihilangkan dari bantalan (*mount*) dengan cara melewati kaca obyek secara hati-hati di atas nyala api (usahakan agar tidak ada jelaga yang tertinggal di permukaan bawah kaca obyek). Jika kaca obyek dipanaskan terlalu kuat, kaca penutup akan meledak dan terlempar.

Teknik pita perekat sangat berguna terutama untuk memperlihatkan orientasi spora kering, juga rangkaian spora dan bentuk konidiofor. Tahanlah sepotong pita dengan pinset pada koloni jamur atau permukaan daun. Kemudian, pita ditaruh dengan sisi yang lengket di sebelah atas, pada setetes pewarna atau cairan perekat pada kaca obyek yang bersih. Akhirnya kaca penutup ditaruh di atas preparat dan dapat diperiksa di bawah mikroskop.

Beberapa jamur memiliki rangkaian spora yang rapuh, yang mudah berantakan jika udara bergerak sedikit. Kultur kaca obyek dapat mengatasi masalah ini. Kultur kaca obyek dibuat dengan menggunakan cawan Petri sebagai ruang pelembab yang berisi tabung gelas bengkok yang bersandar pada kertas saring lembab. Sebalok agar-agar steril kira-kira 1 cm² ditaruh pada kaca obyek yang telah disterilkan dengan nyala api yang bersandar pada tabung gelas bengkok itu. Jamur diinokulasikan pada keempat tepi balok agar-agar steril itu dan sebuah kaca penutup steril ditaruh di atasnya. Setelah beberapa hari, kaca obyek itu dapat ditempelkan pada mikroskop, dan struktur-struktur jamur yang tidak terganggu diamati ketika mereka tumbuh. Balok agar-agar kemudian dapat dikeluarkan dan dua bantalan (*mount*) kaca obyek konvensional dibuat dari kaca obyek dan kaca penutup. Jika dibiarkan kering sebelum hal ini dilakukan, maka kecil kemungkinannya struktur-struktur jamur itu akan hancur.

Untuk beberapa patogen, hubungan tempat antara tubuh buah dan jaringan inang, atau letak konidiofor di dalam tubuh buah, merupakan ciri-ciri taksonomi yang penting. Irisan-irisan jaringan yang tipis memungkinkan struktur-struktur ini dapat dilihat di bawah mikroskop. Irisan-irisan jaringan dapat dibuat dengan tangan menggunakan skalpel di bawah mikroskop stereo atau dengan mikrotom yang canggih. Mikrotom beku khususnya berguna untuk memotong tipis hingga agak tipis irisan-irisan jaringan beku yang segar. Mikrotom beku biasanya dilengkapi dengan panggung (*stage*) tempat jaringan dibekukan secara termoelektrik atau dengan pendingin yang mendedarkan ulang suhu rendah.

Bakteri seringkali sulit untuk diamati di dalam jaringan yang terinfeksi. Penggunaan Toluidin Biru O dapat mempermudah penemuan bakteri. Pewarnaan Gram berguna untuk membedakan dua kelompok bakteri yang berbeda dalam sifat-sifat biokimianya, yaitu Gram positif dan Gram negatif. Sel-sel bakteri Gram positif berwarna ungu tua, sedangkan sel-sel bakteri Gram negatif berwarna merah. Informasi yang lebih banyak tentang teknik ini dapat dilihat dalam Bab 7. Identifikasi patogen.

Mempertahankan kualitas optik suatu mikroskop memerlukan perawatan yang teratur. Tiap mikroskop sebaiknya diservis setiap 6–12 bulan. Di lingkungan tropik yang lembab, jamur dapat tumbuh pada lensa dan permukaan optik, sehingga mempengaruhi kualitas optik mikroskop, dan merusak permukaan-permukaan ini secara permanen apabila dibiarkan tidak diperiksa. Di daerah tropik, semua mikroskop sebaiknya disimpan di dalam ruangan ber-AC dan dengan alat pengering udara.

Penyimpanan mikroskop di dalam ruangan ber-AC tidak cukup mengurangi kelembaban untuk mencegah tumbuhnya jamur. Suatu cara selain menggunakan alat pengering udara komersial ialah dengan menyimpan mikroskop di dalam lemari berpengering udara atau dalam 'kotak panas', bila tidak digunakan. 'Kotak panas' adalah kotak kayu atau plastik yang cukup besar untuk menyimpan mikroskop dan bola lampu 25 W. Sebaiknya kotak cukup rapat, sehingga udara tidak dapat masuk. Bola lampu bertindak sebagai alat pengering udara dengan memberikan cukup banyak panas untuk menurunkan kelembaban di dalam kotak, dan menjaga kotak itu beserta isinya agar tetap kering. Perlengkapan kamera di daerah tropik sebaiknya juga disimpan di dalam 'kotak panas'.

4.3 PEMOTRETAN

Jika mungkin, buatlah potret (gambar terawang berwarna atau gambar digital) spesimen penyakit tanaman selama pengumpulan di lapangan. Membuat potret di lapangan akan memberi kesempatan kepada anda untuk membangun koleksi acuan gambar mengenai gejala-gejala penyakit tanaman seperti yang terjadi di alam. Buatlah sejumlah potret dan pilihlah beberapa yang terbaik sewaktu anda mencetak atau men'download'nya (dalam kasus gambar digital). Juga disarankan untuk menyimpan buku catatan harian (yaitu yang mencatat rincian koleksi spesimen untuk setiap gambar) guna menghindari keragu-raguan bila telah sampai kembali di laboratorium.

Pembuatan potret spesimen penyakit tanaman di laboratorium memberi kesempatan pengendalian yang lebih banyak terhadap kondisi lingkungan meskipun mungkin diperlukan pencahayaan tambahan. Sayangnya, cahaya buatan dapat juga menciptakan bayangan-bayangan yang tidak dikehendaki. Abu-abu muda merupakan latar belakang yang terbaik untuk potret, latar belakang hitam dan putih dapat menghasilkan pencahayaan yang kurang atau berlebih terhadap benda yang dipotret.

Gambar digital gejala penyakit tanaman sangat berguna, karena dapat dikirimkan kepada rekan sejawat dengan cepat, dan tidak mudah mengalami kemunduran seperti film negatif atau gambar terawang, yang dapat menjadi tertutup oleh pertumbuhan jamur, khususnya di daerah tropik. Gambar-gambar digital dapat diambil secara langsung dari sumbernya yaitu kamera digital, sken (*scan*) dari potret berwarna atau gambar terawang, atau bahkan langsung dari spesimen.

4.3.1 Pemberian nama dan pengelolaan berkas catatan

Kamera digital secara otomatis memberi nama-nama yang unik untuk berkas-berkas catatan (*files*) gambar, misalnya IMG_001.jpg, dan DSCF0001.jpg. Nama-nama ini seringkali tidak ada artinya sewaktu membaca-baca berkas catatan di komputer. Akses ke perangkat lunak pengelolaan gambar (lihat bawah) dapat mengatasi masalah ini, sebagaimana halnya dengan penamaan ulang berkas-berkas catatan gambar. Nama-nama berkas catatan yang deskriptif sebaiknya digunakan dalam pemberian nama, misalnya 'antraknos pada mangga.jpg'.

Jika koleksi gambar digital anda banyak, maka gunakan nomor-nomor juga untuk membantu mengkatalog gambar-gambar itu. Jangan lupa untuk menggunakan angka-angka nol di depan nomor misalnya 001 untuk 1, karena perangkat lunak komputer seringkali akan menyortir 100 sebelum 99. Jika gambar itu memperlihatkan gejala-gejala dari spesimen herbarium yang sesungguhnya, maka yang termudah adalah menggunakan nomor tambahan spesimen herbarium sebagai nama berkas catatan untuk gambar tersebut.

Yang terbaik adalah tidak menyimpan terlalu banyak berkas catatan di dalam satu *folder*. Jika terdapat banyak sekali berkas catatan, akan diperlukan banyak waktu untuk mencari satu gambar tertentu. Buatlah *folder-folder* untuk proyek-proyek baru dan bagilah menurut patogen, inang, negara atau tanggal. Salah satu cara terbaik untuk mengatur gambar ialah dengan menggunakan salah satu dari banyak paket

perangkat lunak yang ada untuk mengelola gambar. Program-program ini memungkinkan anda untuk mengatur gambar-gambar, menambah pertelaan, menciptakan cetakan tempel dan penyajian gambar terawang serta memprosesnya untuk setiap kumpulan, sehingga dapat dimuat dalam jaringan internet. Ada aneka rupa perangkat lunak pengelolaan gambar yang dapat digunakan untuk:

- Memperoleh gambar dari kamera;
- Melihat gambar;
- Mengkatalog gambar;
- Menyunting gambar; dan
- Mengirim gambar dalam ukuran kecil ke jaringan internet.

Beberapa perangkat lunak pengelolaan gambar yang tersedia sekarang ini ialah: Ablaze Image Manager, ThumbsPlus, Cumulus, Epson's File Factor, Piccolo, Photo Wallet, Polybites Polyview, Thumber, PIE, ACDSsee (PC and Mac), PicaView32, Image Fox, Graphic Workshop, Professional, GraphicConverter, Power Browser, IrfanView32, Photopage, Quisknailer, Compupic, Image Viewer, Photo Recall, Photo Explorer, EXIFRead, VuePrint, ImageAXS, iView Multimedia, Compupic Pro, Sony PictureGear, FlipAlbum, PictureWorks MediaCenter, JASC Media Center, Pictureshow, Qpict Media Organizer and DigiPics.

5 ISOLASI JAMUR, BAKTERI DAN NEMATODA DI LABORATORIUM

Setelah kembali dari perjalanan koleksi, spesimen-spesimen sebaiknya segera di pilah-pilah berdasarkan kelompok-kelompok utamanya. Prioritas perlu diberikan kepada spesimen yang cepat memburuk, seperti jamur makro yang berdaging atau spesimen-spesimen yang patogennya harus segera diisolasi dari jaringan tanaman. Contoh-contoh lainnya yang tidak kena pengaruh yang merugikan bila dibiarkan sesaat misalnya jamur karat dan jamur api, dapat dikeringkan di dalam alat pengepres tanaman, kemudian dibekukan pada suhu -20°C selama 7 hari dan diperiksa kemudian.

Virus tanaman dapat disimpan sementara di dalam desikator, seperti dijelaskan dalam Bab 3.3.1. Virus tanaman tidak dibahas lebih lanjut dalam Bab ini, karena virus tidak secara rutin diisolasi dan dimurnikan (pemisahan partikel virus dari komponen sel tanaman) dalam prosedur diagnostik.

Bakteri dan jamur patogen seringkali harus diisolasi dan dikulturkan dari spesimen tanaman berpenyakit sebelum dapat diidentifikasi. Patogen yang dapat tumbuh saprobik (parasit fakultatif atau nekrotrof) umumnya dapat ditumbuhkan dalam kultur, walaupun beberapa di antaranya memerlukan perlakuan khusus. Isolasi jamur dari material tanaman biasanya dilakukan dengan cara menaruh sepotong kecil jaringan ke dalam media agar-agar yang cocok, misalnya agar-agar air dalam cawan Petri steril. Spora yang diambil secara langsung dari tubuh buah dengan menggunakan jarum steril juga dapat diletakkan di atas permukaan agar-agar.

Banyak jamur dan bakteri saprobik tumbuh pada atau mengkontaminasi jaringan tanaman sebagai pengkoloni sekunder luka penyakit. Oleh karena itu, penting sekali untuk berhati-hati ketika menggunakan teknik steril guna menghindari terjadinya kontaminasi. Sterilisasi permukaan jaringan yang dipotong seringkali diperlukan untuk menghilangkan mikroorganisme saprobik yang biasanya tumbuh di permukaan tanaman.

Bersihkan permukaan tanaman yang akan dikerjakan, dengan kertas tisu atau kapas yang telah dibasahi dengan etanol 70% dan biarkan mengering. Permukaan yang halus, keras, dan tidak berpori, misalnya kaca adalah yang terbaik untuk membuat irisan material tanaman. Pinset dan pisau skalpel disterilisasi dengan cara mencelupkannya ke dalam etanol 95% dan melewatkannya dengan hati-hati di atas nyala api. Peralatan sebaiknya tidak dibiarkan terlalu lama di atas nyala api, karena akan rusak. Alkohol sangat mudah terbakar dan perlu sangat hati-hati dengan peralatan nyala api di dekat wadah berisi alkohol. Ose untuk inokulasi disterilkan dengan cara memanaskannya sampai merah dalam nyala api yang panas. Jarum harus dibiarkan sampai dingin sebelum digunakan.

Sterilisasi permukaan material tanaman yang sakit menghilangkan saprob dan memungkinkan bakteri atau jamur patogen untuk tumbuh tanpa gangguan bila material dilapiskan pada agar-agar. Etanol (70%) yang digunakan untuk menyeka permukaan atau merendam dapat mensterilkan seluruh permukaan. Tidak diperlukan pencucian pasca perlakuan, karena dapat tanpa dibakar atau dibiarkan menguap.

Natrium hipoklorit cair juga banyak digunakan dan sangat efektif sebagai desinfektan. Pemutih komersial mengandung 10–14% klorin tersedia. Ini biasanya digunakan pada pengenceran 10% (mengandung 1–1,4% klorin tersedia) dengan waktu pencelupan 1–5 menit. Larutan ini sebaiknya disimpan di dalam lemari es, karena kemampuannya akan hilang bila disimpan lama. Larutan encer yang baru sebaiknya dibuat lagi setiap 2–3 minggu. Kelemahan larutan hipoklorit adalah memiliki bau yang menyengat, meninggalkan residu, dan merusak pakaian jika terkena tumpahannya.

Prosedur yang tepat yang dipilih untuk isolasi bakteri dan jamur patogen bergantung kepada sifat dasar material tanaman inang dan patogen itu sendiri.

5.1 ISOLASI JAMUR

Prosedur dasar untuk mengisolasi jamur patogen dari jaringan tanaman adalah sebagai berikut:

1. Cucilah contoh jaringan di bawah air leding yang mengalir untuk menghilangkan tanah, debu, dan kontaminan lainnya;
2. Bila contoh terlalu banyak ditumbuhi saprob, sekaiah dengan etanol 70%. Hal ini dianjurkan untuk mensterilkan permukaan jaringan kayu yang sakit;
3. Irislah jaringan dari tepi utama luka yang berbatasan dengan jaringan yang sehat;
4. Letakkan irisan-irisan jaringan ke dalam larutan natrium hipoklorit 1% dalam etanol 10%. Hal ini perlu disesuaikan bergantung kepada sifat jaringan, karena misalnya, beberapa jaringan daun sangat berpori dan mungkin dapat mengabsorpsi cukup banyak larutan sterilan untuk dapat mematikan patogen. Waktu pencelupan untuk sterilisasi biasanya antara 1–5 menit;
5. Keluarkan irisan-irisan jaringan dari larutan untuk mensterilisasi dan cucilah dengan cara memindahkannya sebentar ke dalam air suling steril. Kemudian irisan-irisan tersebut sebaiknya dikeringkan di atas kertas saring steril, apabila memungkinkan, dilakukan di udara yang disaring dalam ruang isolasi (*laminar flow*), sebelum mengiris potongan jaringan kecil (kira-kira 2 mm x 2 mm) yang dilapiskan pada agar-agar air leding atau agar-agar dekstrosa kentang. Pengeringan penting, karena menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan. Ketika melapiskan potongan jaringan pada media agar-agar, tutup cawan Petri sebaiknya diangkat dan ditaruh kembali dengan hati-hati untuk menghindari masuknya kontaminan yang berasal dari udara;
6. Pelat isolasi sebaiknya diinkubasi dengan posisi terbalik untuk mencegah kondensasi uap air pada permukaan agar-agar. Kebanyakan jamur patogen tumbuh dengan baik pada suhu 25°C;
7. Kultur murni dapat diperoleh dari koloni yang berasal dari spora tunggal atau dari ujung hifa yang terdapat pada pelat isolasi awal. Kultur spora tunggal dapat dibuat dengan menyiapkan suspensi spora dalam air suling steril dan disebarkan di atas agar-agar air leding atau media lain yang sesuai. Pelat-pelat ini kemudian diinkubasikan di dalam ruang gelap pada suhu kamar selama 24 jam. Selanjutnya pelat-pelat itu diperiksa di bawah mikroskop

stereo dan spora-spora tunggal yang berkecambah pada sepotong kecil agar-agar dipindahkan dengan jarum inokulasi ke media yang sesuai;

8. Prosedur tersebut di atas dapat dimodifikasi sesuai dengan pengalaman atau mengikuti petunjuk yang tercantum dalam pustaka.

Dari daun

Pilihlah daun dengan bilur baru, karena jamurnya dalam keadaan paling aktif. Secara hati-hati, irislah potongan kecil jaringan dari bagian tepi bilur dengan gunting atau skalpel steril. Sterilisasi permukaan material daun biasanya perlu dilakukan, 1–3 menit dalam larutan natrium hipoklorit 10%, dilanjutkan dengan pembilasan dengan air steril. Selanjutnya, potongan-potongan daun ditaruh pada permukaan agar-agar dengan menggunakan pinset steril.

Dari batang

Bila terdapat bilur yang dalam atau bilur di bagian dalam jaringan pembuluh, contoh dapat diambil dari jaringan bagian dalam untuk menghindari diperlukannya sterilisasi permukaan. Contoh dibelah membujur dari bagian yang sehat ke arah bagian yang sakit dengan menggunakan pisau yang telah dibakar atau dengan alat lain yang sesuai untuk material berkayu.

Dengan menggunakan skalpel steril, pindahkan jaringan-jaringan dengan hati-hati dari tepi luka ke permukaan bagian dalam yang baru disingkap. Dengan menggunakan pinset steril pindahkan potongan jaringan yang panjangnya 3–5 mm ke cawan Petri yang berisi media agar-agar air leding atau media agar-agar lain yang sesuai. Pada batang yang tipis, biasanya bilur terbatas pada jaringan luar, atau tidaklah mungkin untuk mengambil contoh jaringan bagian dalam. Dalam hal ini, potongan-potongan kecil jaringan sebaiknya diambil dari tepi bilur dengan menggunakan skalpel steril, permukaan disterilkan (1–3 menit dalam natrium hipoklorit 10%), dicuci dengan air steril, dan disimpan pada permukaan agar-agar.

Dari akar

Cucilah akar-akar yang kecil dan halus untuk menghilangkan tanah yang berlebihan, kemudian taruhlah di dalam mangkuk yang bagian dasarnya rata atau cawan Petri berisi 2–3 cm air, sehingga bagian akar yang berpenyakit mudah dilihat. Pisahkan akar-akar itu dengan skalpel atau sepasang pinset. Selanjutnya, potonglah bagian akar yang mengarah ke tepi luka/bilur (sebaiknya panjangnya sekitar 5 mm) dengan menggunakan skalpel atau gunting steril. Sterilisasi permukaan juga dapat dilakukan sebentar, tetapi dengan material yang halus seperti itu, cara pencucian yang lama mungkin yang terbaik. Hal ini dapat dilakukan dengan menaruh potongan-potongan akar dalam saringan yang halus di bawah air leding bersih yang mengalir secara perlahan selama 30–90 menit. Selanjutnya, dengan menggunakan skalpel atau sepasang pinset steril, pindahkan potongan akar ke cawan Petri yang berisi media TWA (atau media agar-agar lain), dengan menaruh potongan-potongan ke dalam permukaan agar-agar.

5.1.1 Wadah lembab

Kadangkala gejala penyakit tampak jelas, tetapi patogen penyebabnya ternyata sulit diisolasi. Bila hal ini terjadi, material tanaman dapat diinkubasi di dalam wadah

lembab untuk merangsang pembentukan tubuh buah dan sporulasi. Kendalanya, saprob yang terdapat pada permukaan tanaman juga dirangsang pertumbuhannya. Penyekaan permukaan material sekilas dengan alkohol teknis atau larutan natrium hipoklorit 10% mungkin dapat menolong, tetapi dapat merusak struktur permukaan patogen yang ada. Cara lain, spesimen dapat juga dicuci dengan air steril dan dikeringkan sebelum inkubasi.

Wadah lembab sebaiknya diinkubasi pada suhu di bawah 25°C dan yang terbaik disimpan di tempat yang terang, misalnya di meja laboratorium, namun tidak langsung terkena sinar matahari dan pada suhu yang diusahakan tetap untuk menghindari kondensasi. Wadah ini harus diperiksa setiap hari, diamati di bawah mikroskop stereo dengan perbesaran rendah untuk melihat sporulasi. Selanjutnya, struktur spora dapat dipindahkan dengan menggunakan jarum halus yang steril untuk pemeriksaan mikroskopik yang lebih teliti atau untuk dikulturkan pada media agar-agar.

Cawan Petri dari gelas atau plastik merupakan wadah yang berguna untuk spesimen yang kecil atau datar seperti daun atau ranting. Kotak plastik paling cocok untuk material yang lebih besar, dan material yang sangat besar dapat diinkubasi di dalam kantong plastik besar atau kantong sampah yang telah diautoklaf.

Barang-barang yang digunakan untuk wadah lembab sebaiknya steril. Wadah yang bersih namun tidak steril sebaiknya diseka dengan alkohol 70% dan dibiarkan sampai kering. Kantong plastik yang digunakan sebaiknya baru. Kertas saring steril (diautoklaf) ditambahkan ke dalam cawan Petri atau kotak wadah dan dilembabkan dengan air suling steril. Kertas tisu penyerap steril yang biasa digunakan di laboratorium cocok untuk kantong plastik atau kotak plastik besar. Spesimen paling baik disimpan di atas kertas lembab pada potongan-potongan kisi plastik atau benda penopang lain yang serupa; penopang ini disterilisasi dengan mencelupnya dalam alkohol 70% dan dilewatkan di atas nyala api secara hati-hati.

5.1.2 Teknik pengenceran

Jamur mungkin dapat diisolasi dari tanah dan dari permukaan tanaman, seperti daun dan bunga, dengan cara mencucinya, diikuti dengan melakukan satu seri pengenceran untuk mendapatkan koloni tunggal pada media agar-agar yang sesuai, seperti TWA. Media yang kaya hara harus dihindari, karena menyebabkan pertumbuhan vegetatif yang berlebihan dengan mengorbankan sporulasi. Antibiotik seperti streptomisin sulfat sebaiknya juga ditambahkan ke dalam media agar-agar untuk menekan pertumbuhan bakteri.

Satu seri pengenceran dalam air steril dapat disiapkan dengan mencuci sedikit tanah atau material tanaman yang telah ditumbuk halus atau disaring yang dicampur rata dalam 10 ml air steril dalam botol McCartney yang berukuran 20 ml. Pipet steril kemudian digunakan untuk memindahkan 1 ml suspensi ini ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air steril. Pipet steril yang baru digunakan untuk mengaduk dan memindahkan 1 ml suspensi ini ke tabung kedua yang berisi 9 ml air steril.

Proses ini berlanjut sampai jumlah pengenceran yang diinginkan telah siap. Sebagian

kecil hasil pengenceran terakhir dipindahkan ke dalam cawan Petri steril berisi agar-agar dan disebarkan dengan menggunakan batang gelas steril. Cawan Petri itu lalu diinkubasikan sampai koloni-koloni jamur mulai tampak. Koloni-koloni itu harus segera disubkulturkan ke media agar-agar yang sesuai sebelum mereka mulai tumbuh saling menutupi satu sama lain.

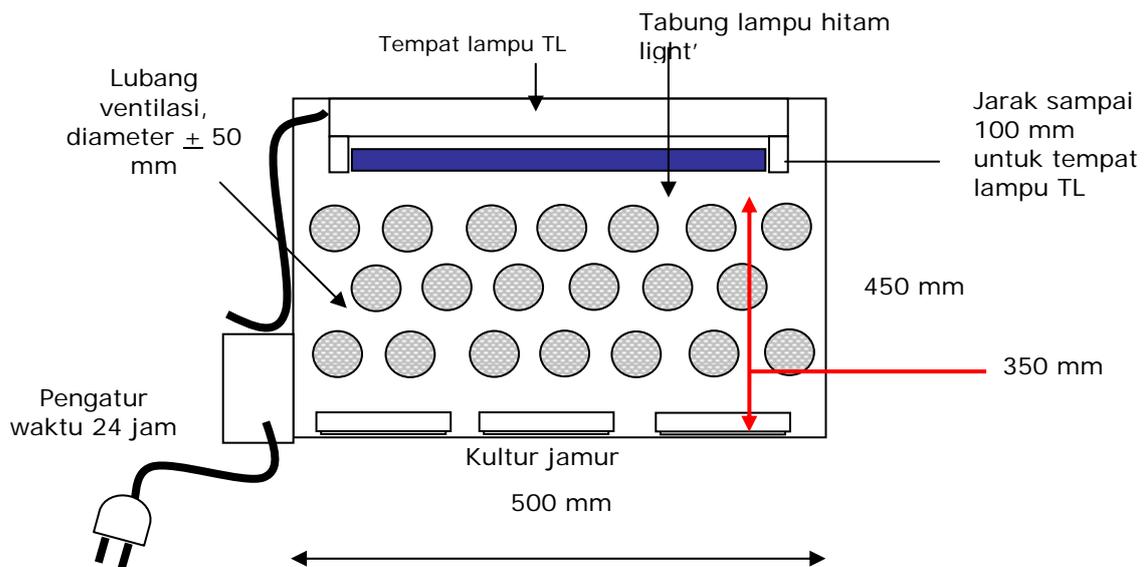
Kadangkala hanya ada sedikit sekali material jamur yang bersporulasi, seperti jamur askomiset atau jamur yang membentuk piknidia. Dalam hal ini, cara yang bermanfaat adalah memindahkan tubuh buah ke dalam setetes air steril pada kaca obyek yang telah dilewatkan di atas nyala api dan menunggu sampai spora dilepaskan. Kerapatan spora dapat dimonitor di bawah mikroskop ganda dan jika dianggap cukup, suspensi digoreskan pada pelat berisi media TWA. Spora tunggal yang berkecambah kemudian dipindahkan ke media tumbuh yang sesuai setelah kira-kira 24 jam.

5.1.3 Pertumbuhan dan sporulasi

Pada kebanyakan jamur patogen, produksi spora merupakan cara reproduksi dan persebaran di habitat alaminya. Kondisi tempat inkubasi kultur jamur akan menentukan seberapa baik jamur itu bersporulasi. Kebanyakan jamur akan tumbuh baik di laboratorium pada suhu kamar. Sporulasi sangat penting dalam identifikasi jamur dan juga diperlukan untuk produksi inokulum bagi uji patogenitasnya.

Lingkungan yang tidak alami, seperti inkubator yang gelap dan hangat serta media agar-agar yang kaya hara, merupakan kondisi yang tidak baik untuk terjadinya sporulasi pada kebanyakan jamur patogen tanaman. Sporulasi biasanya ditingkatkan dengan penambahan material daun inang yang telah disterilkan, misalnya jerami gandum, daun jagung, daun bunga anyelir, atau media yang 'kurus' seperti TWA.

Banyak jamur dapat dirangsang untuk bersporulasi di bawah lampu ultraviolet (UV) dekat (*near ultraviolet light*) atau 'lampu hitam' (*black light*). Walaupun 'lampu hitam' dapat berpengaruh terhadap pigmentasi, morfologi kasar koloni dan bahkan morfologi spora, namun pengaruh tersebut tidak cukup mengganggu proses identifikasi. Kotak 'lampu hitam' dapat dibuat untuk merangsang sporulasi pada jamur yang memerlukan lampu ultraviolet dekat (Gambar 8).



Gambar 8 Bagan penampang melintang untuk membuat lemari ‘lampu hitam’

Berikut ini adalah butir-butir panduan penggunaan ‘lampu hitam’ untuk merangsang sporulasi jamur.

- Lampu TL ultraviolet dekat (‘lampu hitam’) dapat diperoleh di pasaran dengan ukuran 20 W, 40 W, dan 80 W dengan panjang yang beragam. Lampu TL cahaya siang putih sejuk mengemisi sejumlah tertentu radiasi ultraviolet dekat dan dapat digunakan jika ‘lampu hitam’ tidak dapat diperoleh. Kombinasi lampu TL, misalnya satu tabung ‘lampu hitam’ di antara dua lampu TL cahaya siang putih sejuk, mungkin dapat digunakan. Sebaiknya jangan menggunakan lampu pijar;
- Siklus berganti antara perlakuan 12 jam lampu UV dan 12 jam gelap dapat diatur dengan pengatur waktu;
- Beberapa jamur memerlukan periode gelap untuk mulai bersporulasi, oleh karena itu, kotak sebaiknya kedap cahaya;
- Pencahayaan ‘lampu hitam’ sebaiknya dimulai 1–4 hari setelah inokulasi kultur dan dilanjutkan sampai akhir pertumbuhan. Pencahayaan kultur dengan ‘lampu hitam’ tidak ada manfaatnya jika jamur tidak memiliki waktu untuk tumbuh;
- Pada beberapa jamur, pengaruh lampu ultraviolet hilang pada suhu tinggi; dan
- Radiasi ultraviolet dekat ditransmisikan secara efektif melalui cawan Petri plastik dan oleh banyak plastik tidak berwarna lainnya.

5.2 ISOLASI BAKTERI

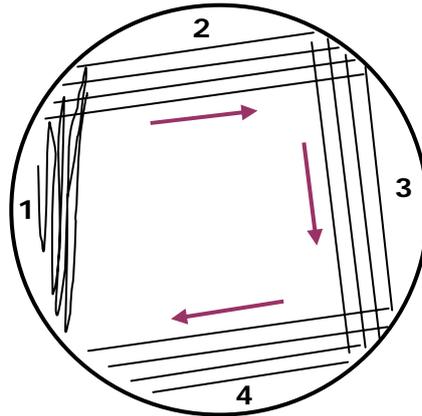
Jika bakteri merupakan patogen utama, sel-sel bakteri dapat ditemukan dalam jumlah besar bila material dipisahkan dari bagian tepi bilur yang sedang berkembang atau

jaringan pembuluh yang berubah warna. Prosedur dasar untuk menemukan adanya dan mengisolasi bakteri patogen dari jaringan tanaman adalah sebagai berikut:

1. Cucilah contoh jaringan dengan air leding yang mengalir untuk menghilangkan tanah di permukaan, debu, dan kontaminan lainnya. Bila material tanaman asal belum ditangani secara berlebihan, maka sterilisasi permukaan tidak diperlukan. Sterilisasi tidak diinginkan, terutama untuk material yang hampir kering atau sudah kering. Hal ini karena zat sterilan cepat menembus jaringan, yang dapat mematikan semua bakteri secara efektif. Jika diperlukan, pencelupan singkat dalam larutan natrium hipoklorit 10% sudah cukup untuk mensterilkan sebagian besar material. Setelah perlakuan tersebut, contoh sebaiknya dibilas dengan air steril. Jika contoh berupa bagian tanaman yang lebih tebal, seperti kuncup, buah, kanker dan nyal, maka sebelum isolasi, bagian tanaman ini dicelupkan ke dalam etanol 70% dan dilewatkan di atas nyala api.
2. Buatlah irisan yang bersih dari potongan jaringan yang dipilih dari batas antara jaringan yang sakit dan yang sehat, kemudian taruhlah ke dalam setetes air steril pada kaca obyek yang telah dilewatkan di atas nyala api. Jaringan-jaringan tanaman yang lebih tebal, setelah ditaruh pada kaca obyek, sebaiknya dipisah-pisah sebelum dilakukan pengamatan mikroskopik. Tutuplah perlahan-lahan dengan kaca penutup yang telah dilewatkan di atas nyala api dan segera amati dengan mikroskop fase kontras pada perbesaran kira-kira 400x. Menurunkan kondensor atau menutup diafragma bawah pentas mungkin perlu dilakukan untuk melihat sel-sel bakteri. Gumpalan bakteri akan mengalir dari bagian tepi potongan, jika bilur itu disebabkan oleh bakteri. Harus hati-hati agar tidak keliru dalam membedakan material seperti lateks, plastid, atau butir pati dengan bakteri. Jika aliran bakteri dari tepi potongan jaringan terlihat, kaca penutup dapat dipindahkan dan satu ose penuh suspensi digoreskan pada media agar-agar yang sesuai. Kadang-kadang perlu membiarkan jaringan tanaman di dalam air selama beberapa jam agar cukup banyak sel bakteri keluar dari jaringan, sebelum menggoreskan suspensi pada media isolasi.
3. Penggoresan sebaiknya dilakukan dengan ose platina yang dibuat dari kawat platina 24 SWG dengan menggosokkan ose yang penuh suspensi pada permukaan cawan agar-agar. Ada beberapa cara untuk melakukan hal ini. Cara pertama adalah dengan membuat pola berbiku-biku pada kuadran cawan mulai dari tepi. Kuadran-kuadran berikutnya sebaiknya digoresi masing-masing menutupi kuadran yang terakhir pada bagian tepinya (Gambar 9). Setiap kali sebelum penggoresan, ose sebaiknya dilewatkan di atas nyala api dan didinginkan dengan menyentuhkannya pada permukaan agar-agar. Cara kedua adalah menggoreskan satu ose penuh suspensi pada seluruh permukaan cawan dengan cara menggerakkannya perlahan-lahan dari bagian atas ke bawah dan pada waktu yang sama menggerakkannya secara cepat dari satu tepi cawan ke tepi yang lain. Tujuan cara-cara ini adalah untuk memperoleh individu-individu koloni bakteri yang terpisah dengan baik.
4. Media yang digunakan harus sesuai untuk pertumbuhan patogen yang dicurigai. Setelah dituangi agar-agar, cawan media isolasi sebaiknya dikeringkan dengan cara membalik tutup cawan, dan menopang bagian bawahnya pada tepi tutup yang dibalik selama 24 jam dalam inkubator yang bersih atau dengan cara membuka tutup-tutup cawan media di dalam lemari

alir udara (*laminar flow*) selama 30 menit. Hal ini perlu dilakukan dengan hati-hati untuk menghindari kontaminasi udara pada agar-agar.

5. Cawan berisi isolat sebaiknya diinkubasi dalam posisi terbalik untuk menghindari terjadinya kondensasi uap air pada permukaan agar-agar. Kebanyakan bakteri patogen tanaman tumbuh baik pada suhu 25–28°C.
6. Buatlah modifikasi prosedur di atas berdasarkan pengalaman atau seperti yang tercantum dalam pustaka.



Gambar 9 Cawan goresan isolasi bakteri yang memperlihatkan: 1. Inokulasi massa dari suspensi sel. 2. Goresan permulaan dari inokulasi massa dengan menggunakan ose yang dilewatkan nyala api dan didinginkan. 3. Goresan kedua. 4. Goresan ketiga, koloni-koloni tunggal seharusnya tumbuh di areal ini.

Setelah penggoresan, cawan diinkubasi pada suhu ruangan dan diperiksa setiap hari selama 4–5 hari atau sampai dengan 10–14 hari jika patogen yang dicurigai tumbuhnya lambat. Apabila diagnosis dilakukan berdasarkan gejala, patogen yang diharapkan seringkali dapat langsung dikenal dan dibuat sub-kulturnya, walaupun bakteri-bakteri lain juga ada di dalam cawan. Dengan spesimen yang baik dari tanaman yang berpenyakit dan potongan-potongan jaringan yang dipilih dengan baik, seringkali patogen tersebut merupakan satu-satunya organisme yang ditemukan. Bila lebih dari satu tipe koloni yang tumbuh, kerapatan relatif dari masing-masing tipe seharusnya dicatat. Organisme yang paling sering diisolasi, terutama jika diperoleh dari lokasi yang berbeda, perlu diperiksa kembali, kecuali jika dapat langsung dikenal sebagai saprofit. Pembuatan subkultur hanya dapat dilakukan pada koloni yang terpisah dengan baik, dan sebaiknya pada agar-agar miring dari media yang sama.

Metode isolasi lainnya mirip dengan yang digunakan untuk jamur. Potongan-potongan jaringan terinfeksi diletakkan secara langsung pada media agar-agar, dan pertumbuhan bakteri terjadi di sekitar potongan jaringan. Jika terdapat saprob, maka pertumbuhan mikrob besar kemungkinannya sebagian besar terdiri atas saprob, sehingga patogen yang tumbuhnya lambat akan hilang. Dengan alasan ini, maka metode ini sebaiknya hanya dapat digunakan jika metode pengenceran dianggap tidak sesuai.

5.3 ISOLASI NEMATODA

Nematoda atau cacing gelang tidak beruas adalah kelompok yang beragam, yang kebanyakan merupakan binatang mikroskopik. Mereka sebenarnya dapat ditemukan dalam segala keadaan, baik di tempat yang berair maupun yang hanya kadang-kadang berair. Nematoda memperoleh gizinya dari sumber-sumber yang berbeda, dan banyak jenisnya merupakan parasit yang sangat khusus. Kebanyakan tanaman dan binatang dapat menjadi inang dari satu jenis nematoda parasit atau lebih. Dengan demikian, banyak nematoda parasit merupakan hama penyakit yang bernilai ekonomi penting. Sebaliknya, jenis-jenis nematoda yang memangsa bakteri dan jamur, yang dianggap sebagai nematoda yang hidup bebas, mempunyai fungsi ekologi yang nyata. Sebagai contoh, nematoda yang hidup bebas berperan penting dalam siklus hara di dalam ekosistem tanah.

Nematoda parasit tanaman umumnya masuk ke dalam dua kelompok penting, yaitu: (1) kelompok yang tetap bergerak dan makan pada atau di dalam akar (nematoda bermigrasi), dan (2) kelompok yang menjadi menetap yang menyebabkan tanaman menghasilkan makanan dan struktur perlindungan (nematoda yang menetap). Jenis-jenis nematoda bermigrasi seringkali mempunyai bermacam-macam inang kecuali beberapa marga, hanya menyebabkan dampak ekonomi bila kepadatan populasinya tinggi. Jenis-jenis yang menetap adalah parasit yang sangat khusus, yang memanipulasi tanaman inang pada tingkat molekul, dengan dampak nyata pada hasil, tetapi seringkali berpengaruh terhadap lebih sedikit macam inang daripada jenis-jenis migran.

Untuk mengidentifikasi nematoda parasit perlu mengekstraksi spesimen dari tanah atau contoh tanaman dan mengawetkan spesimen yang diperoleh.

5.3.1 Contoh tanah

Untuk keperluan diagnosis dan koleksi, tanah dikoleksi dari lapangan pada mintakat akar yang aktif dari tanaman yang dicurigai terinfeksi penyakit. Jika menyelidiki kerusakan tanaman terpencar-pencar pada bidang-bidang kecil, dianjurkan untuk mengambil contoh di dekat tepi bidang-bidang kecil itu, yang kerapatan populasi nematodanya mungkin tertinggi dan juga untuk mengambil contoh dari areal yang tidak terpengaruh untuk digunakan sebagai pembanding. Kedalaman pengambilan contoh dan jumlah sub-contoh dapat menjadi penting, namun di luar jangkauan bagian bab ini.

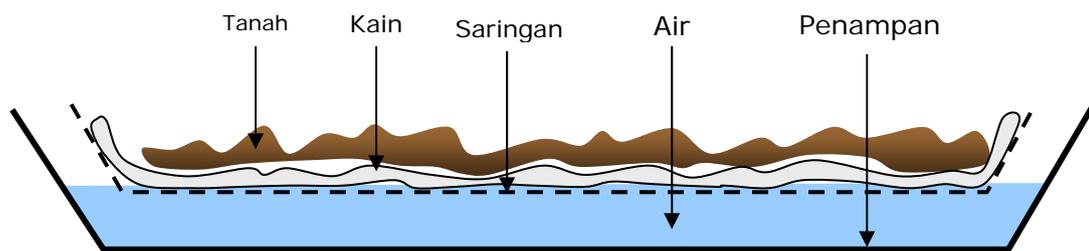
Sebaiknya mengambil contoh tanah yang lembab, karena beberapa nematoda yang dorman dalam tanah kering mudah rusak. Contoh tanah ditempatkan dalam kantong plastik dan harus dijaga agar tetap sejuk selama dalam pengangkutan dan harus diproses secepatnya. Beberapa nematoda, tetapi tidak semua jenis, dapat disimpan di dalam lemari es sebelum diproses. Contoh yang mudah rusak dapat disaring dengan saringan berukuran 10 mm untuk menghilangkan kotoran dan dicampur sampai rata, namun cara ini tidak selalu dapat digunakan untuk tanah yang 'berat'.

Metode ekstraksi nematoda ada yang aktif, bertumpu pada gerakan nematoda, atau pasif, dengan memisahkan nematoda berdasarkan ukuran dan kerapatan. Metode

paling sederhana untuk ekstraksi nematoda aktif ialah dengan menggunakan penampakan Whitehead atau corong Baermann. Walaupun sederhana, ekstraksi berlangsung 2-4 hari dan perolehan nematoda yang gerakannya lamban atau yang berukuran besar kurang baik. Metode pasif melibatkan penyaringan, penuangan, dan pengapungan dalam berbagai kombinasi, dengan berbagai macam bias dan keefektifannya. Penyaringan basah dan sentrifugasi diferensial diuraikan dalam buku panduan ini. Kista dari jenis-jenis heteroderid juga dapat ditemukan dari tanah dengan cara penyaringan basah.

Ekstraksi penampakan Whitehead

Contoh tanah disebarakan pada kertas tisu atau kain tenun halus pada saringan kasar yang ditaruh di atas bagian dasar penampakan yang diberi air sampai tanah jenuh (Gambar 10). Setelah dibiarkan 1–4 hari, nematoda yang aktif akan bergerak ke bawah dan melalui tisu masuk ke dalam air. Volume tanah yang digunakan bergantung kepada ukuran penampakan. Penampakan yang besar (450 mm x 300 mm) dapat digunakan untuk menyebarkan 200 g tanah dalam lapisan yang tipis. Lapisan tanah yang tipis meningkatkan efisiensi ekstraksi dan mengurangi waktu ekstraksi.

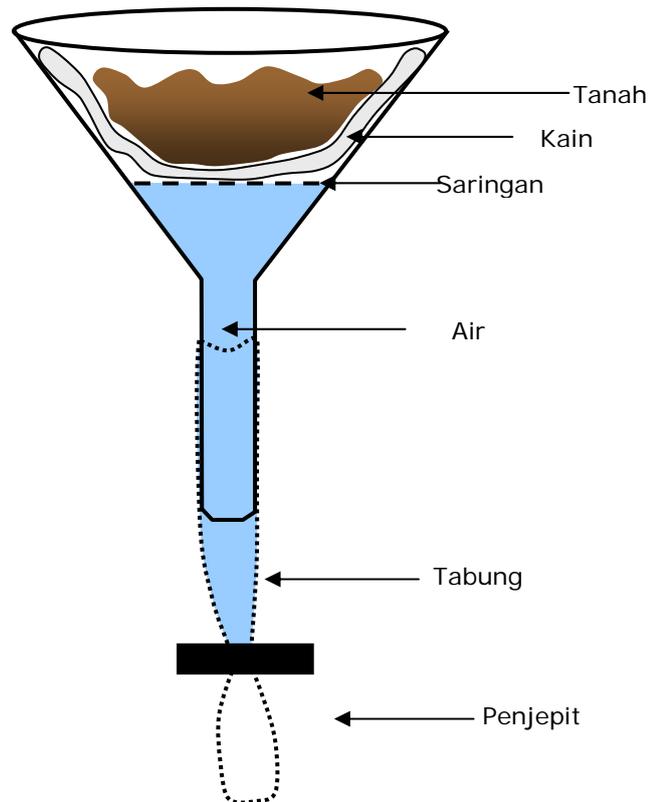


Gambar 10 Penampakan Whitehead untuk mengekstrak nematoda dari tanah dan tanaman

Sebelum mengumpulkan nematoda, saringan yang menyangga dipisahkan dengan hati-hati untuk mengurangi kontaminasi air dengan tanah. Selanjutnya, air dipindahkan ke dalam wadah yang sesuai (misalnya gelas ukur), sehingga nematoda akan tenggelam selama beberapa jam. Air sebaiknya dibuang dan hanya disisakan 5–20 ml, secara sangat hati-hati jangan sampai nematoda terbang. Cara lain, nematoda dapat diperoleh dengan melewati air melalui saringan yang halus (ukuran 20–38 μm). Saringan yang lebih halus harganya mahal dan sulit diperoleh. Nematoda dapat hilang melalui saringan, tetapi kehilangan ini dapat diatasi dengan menangkap dan menyaring kembali filtrat beberapa kali.

Corong Baermann

Contoh tanah diletakkan di atas kertas tisu atau kain tenun halus pada saringan yang menopangnya dalam corong yang di lehernya dipasang tabung plastik dan penjepit. Kemudian alat ini diisi air untuk menjenuhkan tanah (Gambar 11). Walaupun hanya sedikit volume tanah yang dapat diproses, tetapi metode ini mempunyai keuntungan, yaitu nematoda akan terakumulasi di dalam tabung di atas penjepit dan siap diambil secara langsung dengan melepaskan sedikit air (5–10 ml) ke dalam botol kecil.



Gambar 11 Corong Baermann untuk mengekstrak nematoda dari tanah dan tanaman

Penyaringan basah dan sentrifugasi diferensial

Tanah disuspensikan dalam wadah bervolume 4 liter dengan air yang mengalir, namun harus dihindari jangan sampai meluap. Partikel tanah yang besar dibiarkan tenggelam selama 10 detik dan air dilewatkan melalui saringan berukuran 38 μm dan filtratnya ditampung dalam wadah kedua. Nematoda-nematoda yang tertangkap dicuci dari saringan dan dimasukkan ke tabung sentrifus dengan sedikit air. Karena beberapa nematoda dapat menembus saringan, filtrat disaring kembali untuk mendapatkan nematoda yang lepas, dan cara ini dapat diulangi sampai tiga kali. Proses keseluruhan, mulai dari pencucian tanah, dapat diulang dua kali atau lebih untuk memperbaiki hasil keseluruhan. Nematoda kemudian diturunkan dengan cara diputar dengan cepat dalam tabung sentrifus dan supernatan dibuang dengan hati-hati sampai airnya tinggal sedikit. Selanjutnya, nematoda disuspensikan dalam larutan gula pekat (450 g/l) dan disentrifus ulang. Bahan organik yang mengambang dibuang dari permukaan larutan gula, sedangkan larutan gula yang di dalamnya terdapat nematoda dicuci dalam saringan 38 μm dan nematodanya diambil. Filtrat dapat diselamatkan dan disaring lagi dua kali untuk memperoleh hasil yang maksimum.

Larutan gula pekat akan mengering dan merusak nematoda, jadi prosesnya harus dilakukan dengan singkat. Senyawa-senyawa lain dapat digunakan untuk membuat larutan dengan kerapatan yang sesuai, seperti NaCl, MgSO_4 atau silika koloid (Ludox, DuPont de Nemours).

Ekstraksi kista

Tanah kering angin disuspensikan dengan air mengalir dalam gelas piala berukuran 4 l dan diusahakan agar tidak sampai meluap. Tanah dibiarkan tenggelam selama 10 detik, dan air dilewatkan melalui saringan kasar berukuran 710 μm di atas saringan 250 μm . Tanah dicuci dan disaring dua kali lagi. Kemudian, material organik pada saringan halus diendapkan pada kertas saring di dalam corong Buchner dalam keadaan hampa udara, sebelum dilakukan pengamatan kista di bawah mikroskop binokuler. Jika digunakan corong tirus dan material organik disuspensikan dalam etanol 70%, kista akan diendapkan dalam suatu pita ke arah atas kertas saring.

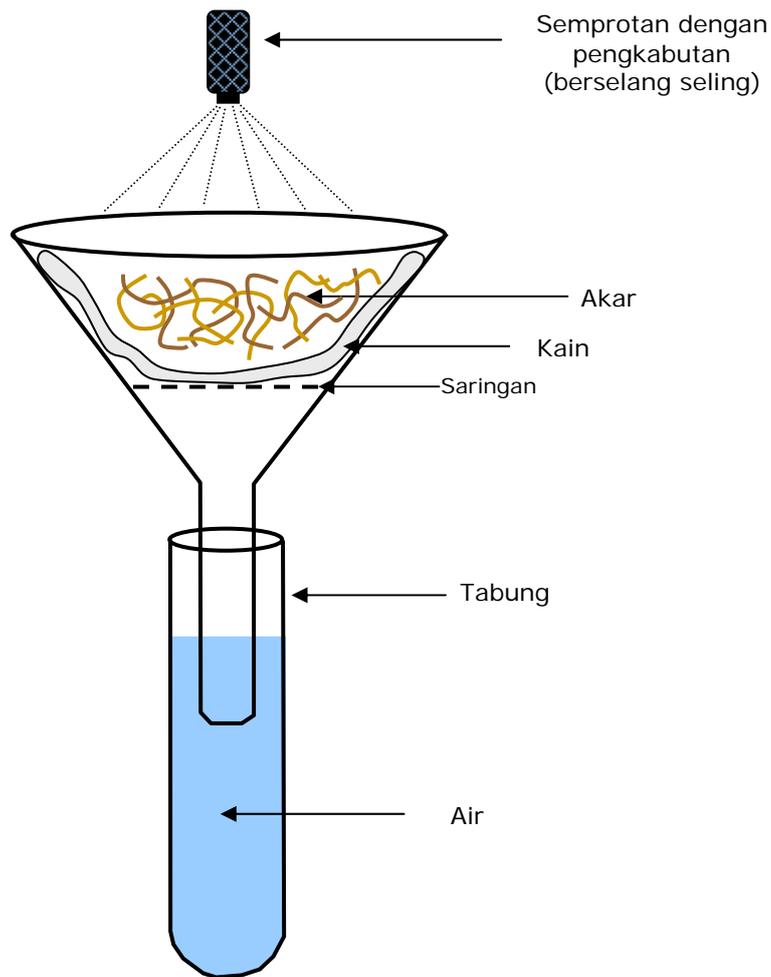
5.3.2 Contoh tanaman

Nematoda ditemukan di dalam akar, batang, daun, dan biji tanaman, sehingga metode ekstraksi yang digunakan beragam, bergantung kepada tipe contoh dan jenis nematoda. Endoparasit migran paling baik diekstrak dengan alat pengkabutan, walaupun penampam Whitehead atau corong Baermann dapat digunakan. Nematoda penetap perlu diambil dengan cara memotong-motong jaringan yang terinfeksi atau diawetkan secara *in situ*. Telur-telur beberapa nematoda penetap dapat diekstrak dengan cara mencuci dengan pemutih dan disaring, namun telur mempunyai nilai taksonomi terbatas, sehingga metode ini tidak dipertelakan di sini.

Nematoda penetap yang masih muda dan yang jantan dewasa yang bentuknya kecil dapat diekstraksi dengan cara pengkabutan.

Ekstraksi dengan pengkabutan

Lemari kaca untuk pengkabutan berisi corong-corong tempat meletakkan jaringan tanaman (yang dipotong sepanjang 10 mm jika cocok) dalam sebuah keranjang yang berlubang-lubang dan diairi dengan cara pengkabutan selama kira-kira 10 detik setiap 10 menit (Gambar 12). Airnya ditampung di dalam tabung yang akan terisi air hingga meluap, tetapi laju aliran air cukup lambat, sehingga nematodanya mengendap di dasar tabung dan dikumpulkan setelah 2-4 hari. Volume air di dalam tabung dikurangi dengan menggunakan aspirator secara hati-hati. Pengkabutan menjaga agar air mengandung cukup banyak oksigen dan menghilangkan racun yang dihasilkan oleh jaringan tanaman yang membusuk, sehingga nematoda tetap dalam keadaan baik. Penampam Whitehead dan corong Baermann dapat digunakan, tetapi memiliki lebih banyak keterbatasan untuk material tanaman daripada untuk tanah.



Gambar 12 Ekstraksi nematoda dari jaringan tanaman dengan cara pengkabutan

Pemotongan

Jaringan tanaman dapat dipisah-pisahkan di dalam cawan Petri berisi air dengan jarum atau skalpel yang berujung runcing di bawah mikroskop binokuler. Pencahayaan yang berupa kombinasi antara cahaya yang dipancarkan dan 'incident illumination' adalah yang terbaik. Nematoda yang dilepaskan dari jaringan biasanya siap untuk diamati dengan pencahayaan dari bawah dan miring atau tidak langsung. Membiarkan contoh untuk diam sesaat memungkinkan lebih banyak nematoda lepas dari jaringan yang dipotong. 'Incident illumination' mungkin menolong untuk tingkat pembengkakan nematoda penetap, seperti nematoda kista (*Heterodera* spp.), nematoda busuk akar (*Meloidogyne* spp.), dan nematoda nyali biji dan daun (*Anguina* spp.).

Jaringan tanaman dapat dibersihkan dengan pemutih dan diwarnai dengan berbagai metode untuk mengamati nematoda *in situ*. Walaupun cara ini cukup baik untuk keperluan diagnosis, namun tidak akan menghasilkan spesimen yang sesuai untuk dimasukkan ke dalam koleksi.

5.3.3 Pengawetan dan perekatan

Mematikan dengan pemanasan

Sebelum spesimen nematoda difiksasi dengan bahan pengawet, adalah penting untuk memamatkannya guna mempertahankan integritas struktur. Hal ini dilakukan dengan cara memberikan suhu kira-kira 60°C, di dalam air atau fiksatif. Air atau fiksatif panas dapat digunakan untuk menaikkan suhu sampai 60°C, diikuti dengan pendinginan secara cepat dengan air atau fiksatif dingin. Jika penangas air tidak tersedia, untuk mempertahankan suhu air atau fiksatif pada 60°C dapat dilakukan dengan menambahkan air mendidih dengan volume yang sama dengan air yang berisi nematoda agar mencapai suhu yang sesuai untuk membunuh nematoda dengan cara pemanasan. Cara lain, oven dengan suhu 55–60°C dapat digunakan untuk memanaskan nematoda dalam air yang dangkal, dengan pengamatan berinterval 1 menit, hingga nematoda mati. Selama proses mematikan nematoda dengan cara pemanasan, adalah penting untuk tidak memberi panas yang berlebih atau merebus nematoda, karena hal ini akan mengganggu struktur dalamnya.

Fiksasi

Metode yang paling sederhana untuk mengfiksasi nematoda ialah dengan menambahkan formaldehid pekat agar kadar akhirnya menjadi 2-5% atau membunuh dengan cara pemanasan dengan larutan formaldehid panas yang konsentrasinya dua kali lipat. Spesimen sebaiknya dibiarkan di dalam fiksatif sekurang-kurangnya selama 12 jam, tetapi sebaiknya selama 2 minggu, sebelum dilakukan proses selanjutnya. Penyimpanan di dalam larutan formaldehid untuk jangka panjang juga diperbolehkan.

Fiksatif lain yang biasa digunakan adalah larutan TAF (formaldehid 3%, trietanolamin 0,2% dalam air suling) dan larutan FA4:1 (formaldehid 4%, asam asetat 0,1% dalam air suling), tetapi kedua larutan ini kurang baik untuk penyimpanan jangka panjang. Etanol tidak dapat digunakan sebagai fiksatif untuk mempelajari morfologi nematoda, tetapi digunakan untuk mengawetkan nematoda yang akan dianalisis DNA-nya.

Perekatan

Perekatan spesimen secara permanen dilakukan dengan cara memindahkannya ke dalam gliserol dengan metode evaporasi lamban. Mula-mula spesimen diletakkan dalam beberapa ml gliserol 2–5% dalam air suling di dalam cawan gelas yang dangkal. Air diuapkan dalam waktu seminggu di dalam oven yang bersuhu kira-kira 40°C atau di dalam desikator. Cawan ditutup dengan tutup yang longgar untuk memperlambat laju penguapan.

Untuk memindahkan spesimen yang menarik ke kaca obyek, satu persatu nematoda perlu diambil di bawah mikroskop binokuler. Hal ini dilakukan dengan jarum halus, bulu yang diruncingkan, bulu mata yang ditempelkan pada jarum, atau sejenisnya. Nematoda dipisahkan setahap demi setahap ke permukaan dan diangkat melalui tegangan permukaan dengan gerakan tajam akhir dari jarum. Perlakuan ini dilaksanakan dalam cawan yang dangkal namun diperlukan pengaturan ulang fokus mikroskop secara teratur. Praktek perlu dilakukan agar menjadi ahli dalam proses ini, tetapi keahlian ini dapat mudah dikuasai untuk memperoleh individu nematoda

secara efisien.

Pindahkan beberapa sampai sepuluh nematoda yang mewakili berbagai tingkatan pada setetes gliserol tanpa air di atas kaca obyek yang bersih. Gunakan jarum untuk menaruh spesimen di tengah dan pastikan bahwa spesimen tidak mengambang. Untuk melindungi nematoda agar tidak lumat, beberapa potong serat gelas, kaca penutup yang pecah (No. 0), atau bilah lilin disusun di sekeliling spesimen. Kaca penutup, sebaiknya yang bundar, ditaruh di atas tetesan tadi untuk menghindari mengalirnya gliserol keluar dari kaca penutup. Jika digunakan bilah-bilah lilin atau lingkaran lilin (digunakan dalam bentuk cair yang dibiarkan membeku), kaca obyek perlu diletakkan di atas kompor listrik untuk mencairkan lilin. Selanjutnya kaca penutup di segel. Dahulu Glyceel digunakan secara rutin, namun sekarang tidak lagi dapat diperoleh, sebagai gantinya dapat digunakan misalnya dua bagian resin epoksi (misalnya 5 min. Araldite) atau DePeX (dari berbagai pemasok bahan kimia). Walaupun cat kuku digunakan, perekatan dengan cara ini tidak tahan lama di daerah yang beriklim hangat.

5.4 MEDIUM PERTUMBUHAN

Kebanyakan medium pertumbuhan dapat dibuat dari bahan dasar atau dapat diperoleh secara komersial. Sumber komersial mempunyai kualitas yang lebih konsisten daripada yang disiapkan dari bahan dasar.

Bakteri dihambat dengan cara menambahkan antibiotik pada agar-agar. Karena hampir semua antibiotik berubah sifatnya dengan pemanasan, biasanya antibiotik ditambahkan pada agar-agar cair yang steril (tepat di atas suhu pemadatan agar-agar).

*Penisilin (50 unit per ml), streptomisin (50 unit per ml) dan tetrasiklin (30 unit per ml) dapat digunakan tersendiri atau dalam kombinasi.
Khloramfenikol (50 mg per l) dapat diautoklaf dan ditambahkan pada saat persiapan.*

Jumlah agar-agar yang ditambahkan ke media dalam resep berikut ini boleh jadi berbeda bergantung kepada merek agar-agar. Sebaiknya ditambahkan cukup banyak agar-agar untuk menghasilkan gelatin yang cukup kuat untuk digoreskan. Jika air leding diketahui mengandung kotoran beracun sebaiknya diganti dengan air suling.

Agar-agar Dekstrosa Kentang (Potato Dextrose Agar, PDA) adalah medium yang baik untuk pertumbuhan dan isolasi jamur. Bersihkan kentang tanpa dikupas. Potonglah menjadi beberapa potongan dan rebus selama sekitar satu jam, kemudian saringlah kentang dan cairannya dengan saringan dan buanglah potongan-potongan yang kasar. Cara lain, kocoklah seluruh campuran dengan blender listrik. Selanjutnya, ke dalam filtrat kentang tambahkan larutan agar-agar dan dekstrosa, aduk, sambil menambahkan air leding hingga mencapai volume 1 liter. Kemudian, campuran diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Bahan-bahan untuk PDA

Kentang	200 g
Dekstrosa (glukosa)	20 g
Agar-agar	20 g
Air leding	1 liter

Resep ini dapat diubah dengan menggunakan sayuran dan biji-bijian lainnya. Setengah atau seperempat persentase PDA dapat dibuat dengan mengurangi jumlah kentang dan dekstrosa menurut perbandingan.

Agar-agar air leding (Tap water agar, TWA) adalah medium yang baik untuk mengisolasi banyak jamur. Jerami gandum, biji sereal, atau material tanaman lainnya yang steril dapat ditempatkan ke media untuk merangsang sporulasi banyak jamur. Campurkan agar-agar dalam air dan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Bahan-bahan untuk TWA

Agar-agar	20 g
Air leding	1 liter

Agar-agar air sari V-8 (V-8 juice agar, V-8J) adalah medium yang baik untuk pertumbuhan jamur, terutama *Phytophthora*. Saringlah jus V-8 agar bebas dari kotoran. Campurlah semua bahan dan sterilisasikan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Bila air sari V-8 tidak dapat diperoleh, bahan ini dapat diganti dengan campuran air sari tomat, wortel, dan seledri.

Bahan-bahan untuk V-8J

Air sari V-8, disaring	200 ml
CaCO ₃	3 g
Agar-agar	20 g
Air suling	800 ml

Agar-agar King's B (King's B agar, KBA) adalah medium yang baik untuk isolasi secara umum bakteri patogen tanaman, terutama kelompok pseudomonad yang berpendarfluor (berfloresensi) dan jenis-jenis *Erwinia*. Sesuaikan keasaman (pH) medium menjadi 7,2 dan sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 25 menit.

Bahan-bahan untuk KBA

Pepton proteose	20 g
Gliserol	10 g
K ₂ HPO ₄ (tanpa air)	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Agar-agar	15 g
Air suling	1 liter

Agar-agar gizi (Nutrient Agar, NA) adalah medium serbaguna yang baik untuk bakteri. Sesuaikan pH menjadi 7,4 dan sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Bahan-bahan untuk NA

Ekstrak khamir	3 g
Pepton	5 g
NaCl	5 g
Agar-agar	15 g
Air suling	1 liter

Agar-agar pepton sukrosa (Sucrose Peptone Agar, SPA) adalah medium yang baik untuk pertumbuhan dan isolasi berbagai bakteri patogen tanaman. Sesuaikan pH medium menjadi 7,2-7,4 dan sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Bahan-bahan untuk SPA

Sukrosa	20 g
Pepton	5 g
K ₂ HPO ₄ (tanpa air)	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
Agar-agar	12 g
Air suling	1 liter

Agar-agar ekstrak malt (Malt Extract Agar, MEA) adalah medium yang baik untuk pertumbuhan dan isolasi berbagai jamur dan khamir. Jumlah ekstrak malt yang digunakan dapat beragam. Campurlah bahan-bahan dan sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Bahan-bahan untuk MEA

Ekstrak malt	2 – 20 g
Agar-agar	20 g
Air suling	1 liter

Agar-agar gliserol (Glycerol Agar, GA) digunakan untuk mengawetkan kultur agar-agar kering sebagai spesimen herbarium. Autoklaf medium ini pada suhu 121°C selama 20 menit. Kultur agar-agar yang telah agak kering adalah kultur mengambang dengan sisi mengarah ke atas pada medium GA yang telah dituangkan ke dalam tutup cawan Petri yang terbalik. Lempengan ini kemudian dikeringkan selama 2-3 hari. Lempengan GA yang kering lebih mudah dilipat dan elastis seperti karet dibandingkan dengan medium agar-agar kering lainnya.

Bahan-bahan untuk GA

Gliserol	25 ml
Agar-agar	20 g
Air leding	1 liter

6 PENGAWETAN DAN PENYIMPANAN SPESIMEN

6.1 SPESIMEN HERBARIUM

Spesimen herbarium adalah sebagian bahan tanaman dan/atau jamur kering di dalam paket yang berlabel. Spesimen itu dapat juga terdiri atas kultur kering, kaca obyek, potret dan gambar. Paket spesimen dapat juga memuat lembar kertas catatan singkat, korespondensi, dan catatan-catatan lain yang berkaitan dengan spesimen.

6.1.1 Spesimen kering

Bahan tanaman dan jamur dipres (ditekan) dan dikeringkan dengan cara meletakkannya di antara beberapa lembar kertas penghisap atau koran. Kertas penghisap atau koran yang memuat spesimen, kemudian diletakkan di antara dua lembar karton bergelombang. Papan kayu (atau bahan lain yang kaku) ditempatkan pada kedua sisi tumpukan, dan tali pengikat digunakan untuk menekan spesimen. Tanaman-tanaman itu menjadi kering, sebaiknya tidak berkerut, dan spesimen yang bermutu tinggi dapat diperoleh dalam beberapa hari. Untuk mempercepat proses pengeringan, sumber panas atau udara buatan diperlukan, khususnya di daerah-daerah yang lembab seperti daerah tropik. Pada waktu pengeringan, kertas penghisap atau koran perlu diganti secara berkala.

Tanaman-tanaman seharusnya tetap dipres sampai benar-benar kering. Tanaman-tanaman yang sudah dipres dapat diletakkan di bawah sinar matahari, di dalam kamar ber-AC atau di dekat sumber panas untuk mempercepat pengeringan. Waktu yang diperlukan untuk pengeringan beragam, bergantung kepada tipe bahan tanaman dan kelembaban. Mengeluarkan tanaman-tanaman dari pres yang terlalu cepat akan mengakibatkan pengerutan atau pertumbuhan jamur pada permukaan spesimen. Pada umumnya, tanaman akan kering dalam waktu 5-10 hari. Sebelum ditempatkan di herbarium, spesimen-spesimen ini sebaiknya difumigasi atau ditaruh di dalam lemari es (*freezer*) untuk mencegah masuknya tungau dan serangga.

Cara termudah untuk mengawetkan spesimen anggota-anggota Agaricales yang besar dan Ascomycetes yang besar dan berdaging ialah dengan mengeringkannya secara cepat. Pengeringan akan mempengaruhi warna, bentuk dan ukuran, meskipun spesimen kering jauh lebih mudah dikelola dan dirawat daripada spesimen yang diawetkan di dalam cairan. Jamur-jamur besar dapat dikering-bekukan untuk mengawetkan warna dan bentuknya, tetapi sayangnya jamur-jamur itu mudah patah (rapuh) dan harus diperlakukan dengan hati-hati. Karena jamur-jamur besar seringkali tidak dapat dimasukkan ke dalam paket herbarium dan sangat mudah rusak, kotak karton kecil atau kantong plastik beritsleting dan silika gel yang mengindikasikan sendiri diperlukan untuk penyimpanan jangka panjang.

Spesimen herbarium kering dan kultur kering sebaiknya disimpan di dalam paket kertas (kualitas arsip) atau karton bebas asam yang berukuran standar (kurang lebih 10-15 cm lebar x 10 cm tinggi). Spesimen-spesimen tersebut sebaiknya lebih dulu dimasukkan ke dalam paket kertas yang lebih tipis dan bebas asam. Idealnya, semua

lembar catatan singkat, label, lem, tinta, dan plastik yang digunakan di herbarium sebaiknya bebas asam, untuk mencegah kerusakan pada spesimen. Pena khusus untuk menguji pH dapat digunakan untuk mengetahui apakah suatu kertas bebas asam.

Setiap paket sebaiknya diberi label di bagian depan (Gambar 13) yang disertai dengan:

- nomor tambahan herbarium;
- nama ilmiah patogen;
- substrat atau nama ilmiah inang tempat patogen ditemukan;
- tempat koleksi dilakukan, termasuk negara, propinsi, garis lintang dan garis bujur;
- nama kolektor dan nomor koleksi;
- tanggal koleksi;
- nama orang yang mengidentifikasi spesimen; dan
- acuan kepada publikasi yang menyitir spesimen seperti itu.

QUEENSLAND DEPARTMENT OF PRIMARY INDUSTRIES PLANT PATHOLOGY HERBARIUM (BRIP)	
BRIP 39807	Uredinales
<i>Racospermyces digitatus</i> (G. Winter) J. Walker	
Host:	<i>Acacia mangium</i> Willd.
Host family:	Mimosaceae
Symptom:	Phyllode rust
Locality:	Meunga QLD Australia
Collector(s):	Ivory, M.H.
Coll. No:	P9288
Coll. Date:	23 Oct 1997
Determiner:	Shivas, R.G.
Duplicates:	
Additional Comments:	

Gambar 13 Contoh label paket yang digunakan di herbarium BRIP

Setiap spesimen di herbarium diberi nomor tambahan yang unik, yang membedakannya dari spesimen-spesimen lain dalam koleksi. Nomor yang unik ini terdapat pada label paket spesimen herbarium (Gambar 13). Kombinasi dari nomor tambahan dan kode lembaga dari *Index Herbariorum* memungkinkan suatu spesimen dibedakan secara unik dari spesimen lain di dunia. Apabila suatu spesimen menghasilkan lebih dari satu takson, maka akhiran (a, b, c, dst.) diletakkan di belakang nomor tambahan, untuk mewakili setiap takson tertentu. Nomor tambahan yang sama digunakan di herbarium untuk bahan tanaman kering dan kultur yang berasal darinya.

Bilamana perlu, paket-paket duplikat dapat disiapkan dengan cara membagi spesimen menjadi beberapa paket. Setiap paket duplikat memuat informasi dan nomor tambahan herbarium yang sama dengan paket spesimen dari mana duplikat tersebut diambil. Paket-paket duplikat dapat disimpan atau dipertukarkan dengan spesimen-spesimen dari herbarium lain.

Sebagian besar spesimen herbarium dalam koleksi patologi tanaman adalah jamur. Pengaturan secara fisik spesimen-spesimen ini kebanyakan dilakukan dalam kelompok-kelompok di atas tingkat ordo dengan cara yang merefleksikan keturunan menurut evolusi (filogeni). Kebanyakan spesimen termasuk Ascomycotina atau Basidiomycotina dengan pengaturan lebih lanjut dalam kelompok-kelompok ini menurut abjad marga jamur. Beberapa kelompok patogen tanaman yang memiliki banyak anggota, sering disimpan secara terpisah, misalnya jamur karat (Uredinales), jamur api (Ustilaginomycetes) dan embun tepung (Erysiphales). Selanjutnya, pengaturan dalam setiap kelompok dilakukan menurut abjad marga inang (karena banyak jenis jamur karat, jamur api, atau embun tepung memiliki inang khusus).

Jamur-jamur anamorf (Deuteromycetes, Fungi Imperfecti, jamur aseksual, jamur berkonidia) paling baik disusun menurut nama-nama telemorf-nya, jika diketahui. Selanjutnya, beberapa jamur mungkin memiliki dua atau lebih nama anamorf (sinanamorf) yang termasuk dalam telemorf yang sama. Spesimen itu sebaiknya tetap disimpan menurut nama telemorfnya, bahkan apabila keadaan jamur seperti itu tidak terdapat pada spesimen. Dalam hal ini, tidak adanya tingkatan telemorf sebaiknya dicatat pada label spesimen.

Spesimen-spesimen yang terlalu banyak untuk ditemukan menurut posisi filogenetiknya yang benar di herbarium, sebaiknya diacu-silang dengan kartu (atau paket herbarium kosong) yang secara jelas menunjukkan di mana spesimen yang sesungguhnya dapat ditemukan. Demikian pula halnya dengan spesimen-spesimen yang sedang dipinjam, sebaiknya diacu-silang dengan meletakkan kartu pada posisi yang biasanya ditempati spesimen tersebut.

6.1.2 Spesimen tipe

Spesimen tipe adalah spesimen (atau gambar) tunggal yang mendasari nama ilmiah. Bila jamur baru dipertelakan dan diberi nama, maka spesimen herbarium harus ditunjuk sebagai acuan tetap untuk nama tersebut. Spesimen-spesimen tipe jamur harus diawetkan secara permanen dan dikeringkan. Kultur hidup tidak dapat ditunjuk sebagai spesimen tipe. Walaupun demikian, kultur jamur yang diawetkan dalam keadaan metabolismenya tidak aktif, dengan cara pengeringan-beku atau disimpan pada suhu yang sangat dingin, dapat digunakan sebagai spesimen tipe.

Menurut tradisi, bahan tipe ditempatkan dalam paket merah atau paket yang diberi batas atau tanda merah, agar mudah dikenal dalam koleksi herbarium. Beberapa contoh spesimen tipe adalah:

- Holotipe - Satu-satunya spesimen atau gambar yang ditunjuk oleh penulis sebagai tipe untuk nama baru;
- Isotipe - Spesimen yang merupakan duplikat holotipe;

- Lektotipe - Spesimen atau gambar dari bahan asli yang ditunjuk sebagai tipe, jika pada waktu penerbitan tidak ada holotipe yang diusulkan, atau jika holotipe hilang, atau jika holotipe termasuk lebih dari satu takson;
- Isolektotipe - Spesimen yang merupakan duplikat lektotipe;
- Sintipe - Spesimen mana saja yang disebut di dalam penerbitan bila tidak ada holotipe yang ditunjuk, atau satu atau dua atau lebih spesimen yang mana saja, yang secara serempak ditunjuk sebagai tipe;
- Paratipe - Spesimen yang disebut di dalam penerbitan, yang bukan holotipe, isotipe, atau salah satu sintipe;
- Neotipe - Spesimen atau gambar yang dipilih untuk menjadi tipe tata nama, jika semua bahan yang mendasari nama takson hilang atau rusak;
- Epitipe - Spesimen atau gambar yang dipilih untuk menjadi tipe tafsiran bila holotipe, lektotipe atau neotipe yang ditunjuk sebelumnya, atau semua bahan asli yang berhubungan dengan nama yang telah diterbitkan secara sah dapat dibuktikan berarti-dua dan tidak dapat diidentifikasi secara saksama untuk keperluan aplikasi nama takson secara tepat; dan
- Topotipe - Spesimen yang dikumpulkan di lokasi yang sama dengan holotipe.

6.1.3 Kultur kering

Sifat-sifat morfologi kultur jamur sangat penting dalam studi mikologi. Kultur kering merupakan satu-satunya cara untuk membuat spesimen-spesimen isolat yang permanen dari tanah, air, atau binatang inang. Kultur jamur kering ekstra berguna untuk menambah bahan inang kering, jika sporulasi jarang terjadi padanya. Kultur jamur dapat dikeringkan dan disimpan bersama dengan spesimen-spesimen dalam paket herbarium.

Kultur kering disiapkan dengan cara menumbuhkan jamur pada medium agar-agar yang sesuai di dalam cawan Petri hingga tingkatan yang diinginkan tercapai. Kultur itu kemudian dikeringkan di dalam cawan Petri hingga koloni lepas di dalam cawan. Kultur dalam cawan Petri dapat dikeringkan di ruang isolasi (*laminar air flow*) selama 2–3 hari. Setelah pengeringan, kultur dapat dipindahkan dari cawan Petri dan ditaruh dalam paket herbarium. Kultur dengan struktur jamur yang mudah rusak dapat disimpan di dalam cawan Petri yang tipis.

Kultur yang dikeringkan seperti tersebut di atas dapat melengkung, retak, dan tidak mungkin dipindahkan tanpa kerusakan. Hal ini dapat dihindari dengan cara memindahkan kultur yang sebagian kering dari cawan dan mengapungkannya di atas agar-agar gliserol (*Glycerol Agar*, GA) panas (lihat Media Pertumbuhan, Bab 5) yang telah dituang ke dalam tutup cawan Petri. Tutup yang sama yang telah menutup spesimen selama pertumbuhannya dapat digunakan, karena berisi bagian kecil-kecil kultur. Kultur tersebut kemudian dibiarkan terbuka sampai benar-benar kering. Hasilnya adalah cakram yang kering dan lentur, yang dapat dilepaskan dan ditaruh dalam paket herbarium.

Pengeringan mungkin tidak akan mematikan jamur. Mematikan kultur seringkali perlu dilakukan, karena beberapa jamur menghasilkan konidia di udara dalam jumlah besar yang dapat mengkontaminasi kultur-kultur lainnya di laboratorium. Menempatkan kultur-kultur ini di dalam desikator yang diberi formalin akan mematikan jamur. Cara lain, kultur dapat dimatikan dengan cara membalik cawan Petri yang mengandung kultur, menaruh kira-kira 1,5 ml formalin pada tutupnya, dan membiarkannya dalam kerudung uap selama 1–3 hari.

6.1.4 Kaca obyek (Gelas preparat)

Ujung-ujung kaca penutup yang ditempelkan pada asam laktat dapat ditutup rapat dengan dua hingga tiga lapis pernis kuku. Hal ini seharusnya dapat mencegah kaca obyek dari kekeringan selama beberapa tahun. Cara lain, larutan alkohol polivinil (dalam bentuk serbuk) dalam asam laktat dapat digunakan sebagai perekat. Ini secara berangsur-angsur akan mengeras dan membentuk preparat (*mount*) yang permanen.

Prosedur dehidrasi dapat digunakan untuk menghasilkan preparat yang permanen. Serangkaian dehidrasi memerlukan pencelupan spesimen tanaman atau jamur ke dalam serangkaian larutan etanol yang semakin pekat (misalnya 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan etanol absolut), masing-masing selama beberapa menit hingga semua air hilang. Kemudian spesimen itu dapat dibersihkan di dalam xilen dan ditempel dalam media seperti balsam Kanada.

Idealnya, kaca obyek seharusnya tidak disimpan dalam paket herbarium. Lebih baik kaca-kaca obyek ini disimpan di dalam laci khusus yang digunakan untuk kaca obyek. Masing-masing kaca obyek sebaiknya diacu-silang dengan nomor tambahan spesimen herbariumnya.

6.1.5 Pengepakan dan pengangkutan

Semua spesimen penyakit tanaman yang akan ditempatkan di herbarium sebaiknya disimpan di dalam paket kertas atau karton bebas asam (Gambar 14). Spesimen-spesimen yang sangat besar, paling baik disimpan di dalam kotak-kotak kardus untuk menghindari kerusakan. Setiap barang di dalam paket herbarium, misalnya lembar catatan koleksi, anotasi, gambar, dan kaca obyek sebaiknya diberi label yang jelas dengan nomor tambahan spesimen. Kultur kering sebaiknya ditaruh pada kertas saring dalam paket kertas tembus pandang dan disimpan bersama dengan bahan tanaman kering. Kaca-kaca obyek paling baik disimpan di dalam kotak kardus atau kotak plastik khusus untuk kaca obyek guna melindunginya agar tidak pecah.



Gambar 14 Paket-paket herbarium yang digunakan oleh Herbarium Ustilaginales Vánky (HUV) dan QDPI&F Plant Pathology Herbarium BRIP

Bila diangkut, spesimen-spesimen herbarium sebaiknya tetap berada di dalam paket-paket kertas atau karton. Kemudian, paket-paket herbarium ini sebaiknya diikat menjadi satu, dibungkus dengan koran atau plastik bergelembung (*bubble wrap*) dan dimasukkan ke dalam kotak kardus yang lebih besar untuk melindunginya. Kultur hidup yang dikering-bekukan, baik yang disimpan di dalam ampul maupun botol kecil dari gelas, sebaiknya dibungkus dengan kapas dan diletakkan di dalam paket pengiriman dari kardus yang berbentuk silinder.

6.2 KULTUR

Tujuan utama dari penyimpanan kultur jamur atau bakteri ialah mempertahankannya dalam keadaan dapat hidup tanpa perubahan morfologi, fisiologi atau genetik untuk jangka waktu selama yang diperlukan. Kultur perlu dipertahankan untuk dapat hidup sekurang-kurangnya selama penelitian dan seringkali untuk jangka waktu tak terbatas, khususnya jika kultur itu berasal dari bahan tipe atau telah terdaftar di dalam suatu publikasi. Tanpa kultur yang telah diidentifikasi, terutama bakteri, tidaklah mungkin untuk melakukan taksonomi perbandingan guna mengklasifikasi dan memberi nama takson baru.

Konvensi Keanekaragaman Hayati (*Convention of Biological Diversity*), yang ditandatangani oleh 180 negara, mempengaruhi kultur jasad renik (mikrob) yang dikumpulkan sejak tahun 1995. Konvensi tersebut memberikan kewenangan kepada negara asal dan bertujuan untuk memberikan pembagian keuntungan yang pantas dan adil, khususnya bagi negara asal, apabila eksploitasi ekonomi dari kultur tersebut membawa hasil. Tukar-menukar kultur antar koleksi seringkali memerlukan Persetujuan Serah-terima Bahan (*Material Transfer Agreement*, MTA). Implikasi MTA untuk koleksi kultur dan pelanggan belum jelas dan banyak hal yang berkaitan dengan koleksi masih harus dikembangkan.

Tidak semua cara pengawetan berikut ini cocok untuk semua jenis jamur dan bakteri yang tumbuh pada medium kultur. Mencoba-coba seringkali diperlukan untuk mendapatkan cara penyimpanan jangka panjang yang terbaik.

6.2.1 Pertumbuhan pada agar-agar

Kultur biasanya ditanam di dalam botol McCartney 20 ml, dengan leher lebar untuk menjamin agar lebih banyak sub-kultur yang dapat dikelola. Medium yang cocok sebaiknya digunakan, misalnya setengah ukuran resep medium PDA untuk jamur, dan NA untuk bakteri. Beberapa jenis jamur dan bakteri memerlukan medium khusus. Medium tersebut dituangkan ke dalam botol hingga kira-kira setengahnya, kemudian disterilkan. Botol tersebut lalu didinginkan dengan cara dimiringkan pada satu sisinya sehingga agar-agar mengeras dan membentuk medium agar-agar miring.

Medium agar-agar miring diinokulasi dengan jamur atau bakteri dan diinkubasi. Sesudah inkubasi, kultur harus disimpan di tempat yang sejuk dan bebas debu. Lemari es atau ruang dingin bersuhu 5–8°C paling cocok untuk menyimpan kultur. Beberapa jamur dan bakteri peka terhadap suhu dingin, karena itu sebaiknya disimpan pada suhu 15°C. Kultur tersebut harus dimonitor secara teratur, karena medium agar-agar cepat mengering di lingkungan yang berkelembaban udara rendah. Jika menyimpan jamur, hendaknya berhati-hati terhadap serangan tungau. Semua botol kultur sebaiknya disegel dengan film plastik (parafilm) atau ditutup rapat sebelum inkubasi dan selama penyimpanan. Kultur perlu dipindahkan ke medium yang baru setiap enam bulan. Kewaspadaan perlu dilakukan untuk menghindari hilangnya isolat yang berharga, walaupun pemindahan yang berulang kali dapat mempercepat perubahan morfologi, hilangnya patogenisitas dan berkurangnya sporulasi.

6.2.2 Di dalam minyak mineral

Cara ini berguna terutama di daerah tropik, karena mencegah kultur cepat mengering dan melindungi dari serangan tungau. Kultur ditumbuhkan seperti tersebut di atas, tetapi pada medium agar yang tidak terlalu miring. Hal yang penting adalah memastikan bahwa kultur itu tumbuh sehat, dan untuk jamur, yang menghasilkan banyak sekali spora. Kultur ditutup dengan minyak mineral hingga kedalaman 1 cm di atas bagian atas kemiringan agar. Minyak mineral yang digunakan harus steril, yang dapat diperoleh dengan autoklaf dua kali pada suhu 121°C selama 15 menit.

Minyak paling baik ditambahkan dengan dosis masing-masing untuk menghindari kontaminasi silang. Botol McCartney dengan tutup plastik dapat digunakan, tetapi mudah bocor jika terguling. Cara ini cukup sederhana, dan tidak memerlukan alat atau bahan kimia yang mahal. Bergantung kepada jenisnya, daya tahan hidup kultur dapat berlangsung 2–40 tahun, walaupun idealnya, kultur diperbaharui setiap lima tahun.

6.2.3 Penyimpanan di dalam air

Potongan (balok) agar-agar diiris dari tepi kultur jamur yang masih baru (umur seminggu), kemudian di rendam di dalam air suling steril dalam botol kecil Wheaton 5 ml atau botol McCartney 20 ml. Tutupnya disekrup dan disegel dengan film atau dibungkus rapat. Botol kecil itu kemudian disimpan pada suhu ruangan. Dengan cara ini kultur dapat disimpan hingga beberapa tahun. Cara penyimpanan ini cocok

terutama untuk jenis-jenis *Pythium* dan *Phytophthora*. Banyak bakteri juga dapat disimpan dengan cara ini. Ose inokulasi yang steril digunakan untuk memindahkan koloni-koloni bakteri berumur 24–48 jam ke dalam air suling steril.

6.2.4 Proses kering-beku

Proses kering-beku (*freeze-drying*) meliputi penghilangan air (pengerinan) dari kultur yang dibekukan dengan mengurangi tekanan secara bertahap melalui proses sublimasi. Sublimasi terjadi bila cairan yang beku berubah secara langsung menjadi gas tanpa melalui fase cair.

Kultur kering-beku disimpan di dalam ampul gelas atau gelas kecil yang disegel. Jamur-jamur penghasil spora yang berlimpah sangat sesuai untuk disimpan dengan proses kering-beku. Bakteri juga dapat disimpan baik dengan menggunakan cara ini. Daya hidup kultur dapat mencapai 10 tahun atau lebih. Alat untuk proses kering-beku relatif mahal untuk harganya dan perawatannya. Diperlukan petugas yang berpengalaman untuk mengoperasikan alat ini dan menyiapkan kultur untuk disimpan. Salah satu keuntungan proses kering-beku adalah kultur kering-beku tidak perlu disimpan di dalam lemari es, cukup disimpan pada suhu kamar.

Setelah proses kering-beku, satu ampul dari setiap isolat sebaiknya dibuka dan ditumbuhkan untuk memeriksa daya hidup dan kemurniannya, karena tidak semua jenis dapat bertahan hidup dalam proses ini. Menumbuhkan kembali kebanyakan jamur yang kering-beku dapat dilakukan dengan cara menaruh sepotong kultur kering-beku ke dalam cawan medium agar-agar yang baru saja dituang. Bakteri dan khamir kering-beku memerlukan waktu, 30 menit biasanya cukup, untuk mencair kembali, baik di dalam air kaldu daging maupun air suling, sebelum digoreskan pada medium agar-agar.

6.2.5 Penyimpanan di dalam tanah

Tanah diayak dan ditempatkan dalam botol McCartney 20 ml, kira-kira setengah penuh, kemudian disterilkan dengan cara pemanasan kering atau diautoklaf dua kali pada suhu 121°C selama 15 menit. Suspensi spora di dalam air suling steril dituangkan ke tanah steril tersebut dan diinkubasikan pada suhu 20–25°C selama kira-kira 15–10 hari. Sebaiknya, kultur tersebut disimpan di dalam lemari pendingin. Kultur ini dapat bertahan hidup untuk jangka waktu lama. Menghidupkan lagi kultur dapat dilakukan dengan cara memindahkan secara aseptik sebagian tanah dari botol ke medium agar-agar yang sesuai. Cara ini dapat digunakan untuk menyimpan jenis-jenis *Fusarium* yang seringkali mengalami mutasi jika dipelihara pada medium agar untuk jangka waktu lama.

6.2.6 Penyimpanan di dalam silika gel

Suspensi sel bakteri atau spora dalam susu skim 5% (bobot/volume) dituangkan ke dalam botol berisi silika gel yang sudah disterilkan dan didinginkan. Gunakan silika gel murni yang tidak berwarna, berukuran 6–22 mesh, dalam botol kecil dengan

tutup berdrat hingga setengah penuh, tutup dikendorkan, dan disterilkan di dalam oven. Silika gel di dalam botol dibiarkan mengering pada suhu kamar selama sekitar 14 hari hingga kristal-kristal silika terpisah. Selanjutnya, tutup botol diputar ke bawah hingga rapat dan botol disimpan di dalam lemari pendingin di atas silika gel indikator (berwarna) pada suhu 4–6°C. Apabila kultur diperlukan, beberapa kristal silika diambil dari dalam botol dan disebar pada medium agar-agar yang cocok. Ketahanan hidup dapat berlangsung hingga 11 tahun bergantung kepada jenisnya. Cara ini sesuai untuk organisme yang dapat bertahan hidup pada pengeringan beku, dan mencakup bentuk-bentuk miselium yang menghasilkan sklerotium dan klamidospora.

6.2.7 Penyimpanan pada kertas saring

Kertas saring steril diletakkan di dalam cawan Petri, kemudian beberapa tetes air suling steril ditambahkan sekedar untuk membasahi kertas saring. Kemudian potongan kultur jamur pada medium agar-agar diletakkan di atas kertas saring dan cawan Petri disimpan di dalam inkubator bersuhu 25°C, hingga jamur tumbuh di seluruh kertas saring. Setelah kertas saring benar-benar menjadi kering, dalam waktu 2–4 minggu, kertas saring itu dipotong secara aseptik menjadi potongan-potongan kecil dan dimasukkan ke dalam botol-botol kecil yang steril dan kedap udara, selanjutnya disimpan pada suhu 4°C. Untuk menghidupkan lagi kultur, ambil 1 atau 2 potong kertas saring dari botol dan pindahkan secara aseptik ke medium PDA. Pertumbuhan hifa dari potongan-potongan kertas saring biasanya jelas kelihatan dalam waktu 2 hingga 4 hari. Cara penyimpanan ini seringkali digunakan untuk jenis-jenis *Fusarium*.

6.2.8 Kriopreservasi

Penyimpanan mikroorganisme di dalam lemari es bersuhu sekitar -20°C hingga -85°C (kriopreservasi/*cryopreservation*) adalah cara pengawetan yang baik untuk kebanyakan jamur, bakteri, dan virus. Salah satu sistem penyimpanan yang paling sederhana dan paling populer untuk jamur dan bakteri melibatkan penggunaan manik-manik keramik berpori (*cryobeads*) yang disuspensikan di dalam cairan kriopreservasi, misalnya gliserol, dalam botol kecil dari plastik. Setelah diinokulasi dengan kultur, larutan yang berlebih sebaiknya diambil dengan menggunakan pipet steril dan botol kecil itu disimpan di dalam lemari es. Menghidupkan lagi kultur dilakukan dengan cara mengeluarkan satu manik-manik (dari dalam botol) dan menginokulasikannya ke dalam medium cair, atau menggoreskannya pada medium agar-agar yang sesuai.

6.2.9 Nitrogen cair

Penyimpanan mikroorganisme pada suhu yang sangat rendah, -190°C hingga -196°C, di dalam tabung berisi nitrogen cair (juga merupakan suatu kriopreservasi) adalah cara pengawetan yang terbaik untuk kebanyakan jamur dan bakteri. Kultur, jaringan tanaman atau suspensi spora, diberi perlakuan dengan krioprotektan (*cryoprotectant*), misalnya gliserol 10%. Untuk bakteri, mula-mula kultur bakteri

disuspensikan dalam medium nutrisi ekstrak daging, kemudian dipindahkan secara aseptik ke dalam ampul steril dan dibekukan hingga suhu yang sangat rendah di dalam uap nitrogen cair. Laju pendinginan sangat kritis, dan menghidupkan lagi yang terbaik dapat dicapai jika dilakukan secara perlahan-lahan. Pada suhu yang sangat rendah, metabolisme ditekan. Apabila organisme dapat bertahan hidup pada pembekuan awal, maka seharusnya ia mampu hidup untuk jangka waktu tak terbatas. Teknik ini membutuhkan peralatan yang mahal serta sumber nitrogen cair yang dapat diandalkan. Petugas yang berpengalaman diperlukan untuk menjamin kualitas penyimpanan yang optimum.

7 IDENTIFIKASI PATOGEN

Kunci (identifikasi) taksonomi untuk kebanyakan patogen tanaman tidak ada. Lagi pula, pustaka tentang patogen tanaman sangatlah banyak dan kompleks sehingga hanya spesialis saja yang rupanya mengetahui semua informasi yang tersedia tentang taksonomi kelompok tertentu. Meskipun demikian, dengan kebiasaan menggunakan kunci identifikasi, pustaka dan pemeriksaan spesimen, tugas identifikasi yang akurat menjadi lebih mudah dilaksanakan.

7.1 JAMUR

Jamur adalah mikroorganisme kecil, eukariota, biasanya membenang, dan pembawa spora, yang tidak mempunyai klorofil, mempunyai dinding sel yang berisi khitin, selulosa, atau keduanya. Tubuh jamur disebut miselium, dan tiap-tiap cabang atau filamen dari miselium disebut hifa. Pertumbuhan miselium terjadi di ujung hifa.

Jamur berkembang biak dengan spora. Spora merupakan alat reproduksi yang terdiri atas satu atau beberapa sel. Spora dibentuk secara aseksual atau sebagai hasil dari proses seksual. Pada jamur primitif, spora aseksual diproduksi di dalam kantong yang disebut sporangium. Sebagian dari spora-spora bergerak terus dan disebut zoospora. Jamur lainnya menghasilkan spora aseksual yang disebut konidia, dari hifa khusus yang disebut konidiofora. Pada jamur yang lain lagi, spora aseksual (konidia) dihasilkan di dalam struktur berdinding tebal yang disebut piknidia.

Kebanyakan kelompok jamur melakukan reproduksi seksual. Pada beberapa kelompok, dua sel (gamet) bergabung untuk menghasilkan zigot yang disebut zigospora. Pada jamur lainnya, zigot ini disebut oospora. Dalam kelompok jamur yang disebut Ascomycetes, spora seksual dihasilkan di dalam sel zigot yang disebut askus, dan sporanya disebut askospora. Pada kelompok jamur lain, yang dikenal sebagai Basidiomycetes, sel zigot disebut basidium dan sporanya disebut basidiospora.

Ada sekitar 250.000 jenis jamur patogen dijumpai pada tumbuhan. Hampir semua jamur ini menggunakan sebagian dari hidupnya pada tumbuhan inangnya dan sebagian lagi di dalam tanah atau pada sisa-sisa tumbuhan.

Organisme-organisme yang dipelajari oleh ahli mikologi pada umumnya termasuk dalam dunia (kingdom) Jamur, tapi beberapa di antaranya termasuk dalam Protozoa dan Chromista. Protozoa mencakup jamur lendir. Chromista mencakup Oomycetes, termasuk embun bulu maupun *Pythium* dan *Phytophthora*. Dalam dunia Jamur ada empat filum utama, yaitu Zygomycota, Chytridiomycota, Ascomycota, dan Basidiomycota.

Penyakit tanaman yang disebabkan oleh jamur patogen seringkali dapat dikenal berdasarkan bagian organ yang terinfeksi dan tipe gejala yang dihasilkan. Tipe-tipe umum gejala penyakit jamur adalah rebah semai, busuk akar, layu pembuluh, embun bulu dan embun tepung, bercak daun dan hawar daun, jamur karat, jamur api, antraknos, nyali, mati pucuk, dan penyakit pasca-panen (lihat Tabel 1).

7.1.1 Patogen akar

Infeksi jamur pada akar tanaman dapat menghambat penyerapan air dan translokasi hara, sehingga pucuk tanaman menjadi kerdil, daun menjadi layu dan kuning. Akar-akar muda biasanya mudah diserang jamur, dan kerusakan akar karena penanaman atau pada saat pemindahan seringkali memperburuk penyakit. Demikian juga, status hara tanah yang rendah (P atau K), salinitas, dan pH yang tak seimbang, semuanya ini memperlemah tanaman terhadap serangan busuk akar.

Busuk akar seringkali sulit didiagnosis, karena bisa jadi disebabkan oleh beberapa atau sekelompok jamur yang kompleks, seperti *Fusarium*, *Pythium*, *Macrophomina* bersama nematoda, atau serangkaian jamur. *Phytophthora* dan *Pythium* paling umum dijumpai di tanah basah. *Rhizoctonia* dan *Fusarium* merajai pada kondisi yang lebih hangat dan di tanah yang memiliki kandungan bahan organik tinggi.

Walaupun *Fusarium* dan *Phytophthora* dapat menyebabkan penyakit akar pada beberapa tanaman berkayu, tetapi kebanyakan busuk akar pada pohon-pohon seperti itu disebabkan oleh Basidiomycetes penghancur selulosa, seperti *Armillaria*, *Ganoderma*, *Rigidoporus* dan *Phellinus*. Informasi lebih lanjut tentang penyakit *Phytophthora* dapat dilihat pada Erwin dan Ribeiro (1996).

7.1.2 Patogen batang

Layu pembuluh

Patogen-patogen yang menyebabkan layu pembuluh biasanya hanya berhubungan dengan sistem pembuluh (xilem). Gejala-gejala penyakit termasuk hilangnya turgor, layu daun, perubahan warna daun menjadi kuning, dan pada kasus yang berat, tanaman roboh dan mati. Hanya setelah tanaman mati, jamur berpindah ke jaringan lain untuk bersporulasi. Empat marga jamur penyebab layu pembuluh adalah *Fusarium*, *Verticillium*, *Ceratocystis* dan *Ophiostoma*. Untuk informasi lebih lanjut tentang *Ceratocystis* dan *Ophiostoma* lihat Wingfield dkk. (1999).

Fusarium menyebabkan layu pembuluh pada banyak tanaman sayuran, bunga, buah, dan serat. Kebanyakan jenis-jenisnya yang penting termasuk kompleks *Fusarium oxysporum*. Ada banyak sekali forma khusus (*formae speciales*, *ff. spp.*), yang masing-masing mempunyai kisaran inang yang terbatas dan seringkali memiliki sejumlah ras patogen. Untuk informasi tambahan tentang teknik laboratorium untuk *Fusarium* lihat Burgess dkk. (1994).

Kanker

Kanker pada batang tanaman herba dihasilkan oleh jamur patogen seperti *Colletotrichum* dan *Phomopsis*, yang juga menyerang dedaunan dan buah. *Rhizoctonia solani* dan *Corticium rolfsii* adalah agen penyebab penyakit bilur yang penting pada bagian dasar batang tanaman herba, terutama kacang-kacangan. Seringkali miselium dapat dilihat pada permukaan inang. *Phytophthora* dan *Fusarium* seringkali menyerang tanaman berkayu, walaupun gejala luar agak sulit ditemukan.

Nyali

Nyali atau gal adalah pertumbuhan abnormal atau pembengkakan yang disebabkan oleh pembesaran hiperplastik jaringan tanaman akibat stimulasi oleh serangga, bakteri, virus, dan jamur patogen seperti *Exobasidium* dan *Synchytrium*.

Sapu setan

Penyakit ini mempunyai ciri khas berupa perkembangan yang abnormal, berlebihan, seperti sikat atau sapu pada tunas atau akar yang lemah. Contohnya adalah penyakit sapu setan pada coklat yang disebabkan oleh jamur *Crinipellis perniciosa*.

Kerak merah jambu (Pink crust)

Corticium salmonicolor adalah Basidiomycetes yang membentuk kerak datar berwarna merah jambu pada ranting dan cabang tanaman berkayu di kawasan tropik dan subtropik, menyebabkan penyakit merah jambu atau kerak merah jambu. Jamur penyakit ini masuk ke dalam pepagan dan kayu, mematikan ranting dan cabang, dan menyebabkan daun menjadi kisut.

7.1.3 Patogen daun

Gejala pada daun sangat penting dalam diagnosis penyakit tanaman. Beberapa penyakit daun disebabkan oleh saprob, yang lainnya disebabkan oleh patogen jamur obligat. Gejala umum dapat disebabkan oleh banyak patogen jamur yang berbeda, tetapi gejala yang spesifik cenderung berhubungan dengan kelompok patogen tertentu.

Pada daun, berbagai mikroorganisme dapat menyebabkan bercak nekrotik dan blobor, yang biasanya ditunjukkan dengan ciri bentuk dan pola tertentu. Sifat diagnostik penting lainnya ialah adanya tubuh buah jamur, umur daun dan ukuran areal yang rusak.

‘Bercak daun’ umumnya terbatas pada areal-areal yang kecil dari jaringan nekrotik. Walaupun, dalam beberapa kasus jaringan mungkin tidak mati, hanya berubah warna karena adanya organisme penyebab. Berbagai jamur patogen (dan hama serangga) dapat menyebabkan bercak daun. Bercak daun dapat pula dikelilingi oleh lingkaran klorotik.

‘Bercak target’ (*target spot*) terdiri atas satu seri cincin melingkar; ‘bercak cincin’ biasanya melingkar dengan pinggir gelap; ‘bercak daun bersegi’ dibatasi vena daun, dan ‘bercak mata’ biasanya berbentuk lensa dengan bercak gelap di tengah. ‘Lubang gotri’ adalah istilah yang digunakan untuk mempertelakan bercak daun dengan pusat nekrotik dari bercak rontok. Seringkali, ini merupakan hasil ikutan dari reaksi pertahanan tanaman inang untuk membatasi penyebaran penyakit.

Antraknos

Gejala antraknos berupa bercak atau bidang kecil nekrotik yang gelap, agak terbenam kadang dengan pinggir yang terangkat. Acervuli (*acervular conidiomata*) kadang-kadang dapat dijumpai tersusun dalam cincin atau lingkaran pada bilur. Gejala-gejala ini biasanya terjadi pada dedaunan, batang, dan buah. Infeksi yang berat dapat menyebabkan mati pucuk ranting atau cabang. Banyak ahli patologi

tanaman menggunakan istilah antraknos khusus untuk beberapa, namun tidak semua, penyakit yang disebabkan oleh *Colletotrichum*.

Karat putih

Jamur karat putih termasuk Peronosporales. Cirinya ialah adanya rangkaian sporangia yang dihasilkan di dalam sorus berwarna putih, di bawah epidermis. Gejalanya muncul seperti lepuh putih tepat di bawah epidermis. Oospora dapat dijumpai di dalam jaringan inang. Contohnya ialah karat putih pada *Brassica* (*Albugo candida*).

Hawar

Istilah hawar digunakan untuk mempertelakan pengerutan yang tiba-tiba dan luas serta kematian daun, bunga, pucuk, buah dan bahkan seluruh tanaman. Biasanya jaringan yang paling muda tumbuhnya diserang lebih dulu. Hawar disebabkan oleh berbagai jenis jamur patogen termasuk *Colletotrichum gloeosporioides* (hawar bunga mangga) dan *Phytophthora colocasiae* (hawar daun talas).

Lepuh

Lepuh yang mempengaruhi daun dicirikan oleh adanya bilir-bilir yang tampak rusak seperti tersiram air panas. Bilir-bilir kebanyakan memutih, tetapi dapat juga sebagian tembus pandang, dan biasanya tidak menunjukkan adanya klorosis. Contoh penyakit lepuh misalnya lepuh daun padi (*Gerlachia oryzae*) dan lepuh barley (*Rhynchosporium secalis*).

Blas

Bidang-bidang kecil nekrotik dan pucat pada daun yang disebabkan oleh jamur dan bakteri disebut blas. Hal itu dapat merupakan gejala penyakit atau stres, hasil pelukaan serangga, atau karena kondisi iklim yang berubah. Sebagai contoh patogen ialah *Pyricularia oryzae* pada padi dan beberapa rumput lain.

Kudis

Kudis adalah bilur dangkal yang memiliki ciri tersendiri, yaitu secara lokal sangat kasar dan berlubang-lubang kecil. Gejala-gejalanya meliputi penebalan abnormal dari lapisan permukaan dengan atau tanpa perkembangan gabus. Jamur dari marga *Elsinoë*, *Fusicladium*, *Sphaceloma*, *Venturia* dan *Cladosporium* kebanyakan menyebabkan kudis. Jamur kudis dapat pula dijumpai pada buah dan batang.

Embun bulu

Embun bulu disebabkan oleh jamur dari bangsa Sclerosporales (jenis-jenis yang menginfeksi rumput) dan Peronosporales (jenis-jenis yang menginfeksi tanaman dikotil). Kebanyakan dari jenis-jenis ini sangat bergantung kepada lapisan tipis air untuk bergerak di permukaan tanaman inang dan menyerang jaringan tanaman. Pada keadaan kelembaban tinggi, embun bulu dapat menyebabkan kerusakan berat pada tanaman pertanian. Contohnya, embun bulu pada tanaman jewawut (*Sclerospora graminicola*). Gejala-gejala tampak sebagai lapisan tepung putih pada permukaan bawah daun. Bentuk konidiofora dapat digunakan untuk membedakan marga yang berbeda. Informasi selanjutnya tentang embun bulu dapat dilihat pada Spencer (1981).

Embun tepung

Jamur embun tepung adalah parasit obligat yang termasuk suku Erysiphaceae, contohnya *Blumeria graminis* pada tanaman serealia dan rerumputan. Ciri khas jamur embun tepung adalah terbentuknya proliferasi miselium berwarna putih di permukaan dan konidia seperti tepung pada permukaan daun. Askomata yang kecil dan membulat kadang-kadang timbul di permukaan daun. Haustorium dibentuk di dalam sel epidermis; konidiofora dibentuk secara lateral pada hifa dan konidia tidak bersekat dibentuk dalam rantai basipetal. Kebanyakan jenis jamur ini mempunyai forma spesial (*formae specialis, f. sp.*) yang didasarkan pada jenis inangnya. Jamur embun tepung dapat beradaptasi pada lingkungan yang relatif kering, dan sebetulnya merupakan satu-satunya kelompok jamur parasit tanaman yang konidianya dapat berkecambah tanpa adanya air bebas. Informasi selanjutnya tentang embun tepung selanjutnya dapat dilihat pada Braun (1987).

Jamur jelaga

Jamur jelaga disebabkan oleh anggota-anggota Capnodiales dan Chaetothyriales. Mereka membentuk selaput hitam pada daun dan batang hidup dengan cara tumbuh pada tanaman dan kotoran serangga. Jamur jelaga biasanya berasosiasi dengan kerusakan yang disebabkan oleh hama pengisap cairan tumbuhan seperti kutu daun dan kutu perisai. Jamur jelaga dapat menurunkan fotosintesis secara nyata dan mempunyai potensi untuk mengurangi gegas tanaman dan menurunkan hasil panen. Informasi selanjutnya mengenai jamur jelaga dapat dilihat pada Hughes (1976).

Embun hitam

Jamur embun hitam termasuk Meliolales, seringkali dikacaukan dengan jamur jelaga. Jamur embun hitam merupakan patogen daun, yang umum dijumpai di hutan hujan tropik. Jamur ini seringkali bertukar dengan jamur jelaga. Kerusakan yang disebabkan biasanya tidak parah. Jamur ini dicirikan oleh adanya hifa yang kasar dengan hifopodia lateral yang pendek, askomata di permukaan, dan askospora yang besar dan gelap. Informasi selanjutnya tentang Meliolales dapat dilihat pada Hansford (1961) dan Hansford (1963).

7.1.4 Patogen buah dan biji

Beberapa patogen yang umum seringkali berasosiasi dengan busuk buah. Salah satu dari yang paling banyak berlimpah ruah adalah *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorfnya adalah *Glomerella cingulata*), yang biasanya berasosiasi dengan antraknos pada buah. Bilur ini umumnya membuka bila umurnya bertambah. Jenis-jenis *Phytophthora* berperan dalam pembusukan berbagai buah-buahan, contoh yang baik ialah pada coklat dan kelapa. *Phomopsis* dan *Fusicoccum* berasosiasi dengan busuk ujung batang tanaman buah-buahan tropik.

Buah-buahan biasanya rentan terhadap penyakit pasca panen yang timbul selama proses pengepakan, penyimpanan, transportasi dan penanganan. Penyakit pasca panen seringkali melibatkan patogen yang ada di lapangan namun tidak tampak. Penyakit akan terus berkembang bahkan dalam kondisi di dalam lemari es dan gejala-gejalanya akan tampak pada tingkat apa saja dalam proses, ketika kondisi lingkungan menjadi baik untuk perkembangan penyakit. Contoh-contoh penyakit pasca panen di antaranya ialah busuk alih (*Rhizopus stolonifer*), jamur pensil

(*Penicillium expansum*), kapang kelabu (*Botrytis cinerea*), busuk buah *Aspergillus* (*Aspergillus* spp.) dan busuk ujung batang (*Phomopsis* spp. dan *Fusicoccum* spp.). Informasi selanjutnya mengenai penyakit pasca panen yang disebabkan jamur dapat dilihat pada Pitt dan Hocking (1999).

Ergot

Penyakit ergot disebabkan oleh jamur dari bangsa Clavicipitales dan terdapat pada rerumputan termasuk sebagian besar sereal. Konidia jamur ergot *Sphacelia* menginfeksi bakal buah. Umumnya serangga menyebarkan konidia ini, yang terdapat dalam 'embun madu' yang keluar dari floret inang sebagai reaksi terhadap infeksi. Sklerotiumnya seringkali mengandung alkaloid yang beracun dan dapat mengkontaminasi biji-bijian untuk konsumsi manusia dan hewan. Informasi selanjutnya mengenai jamur Clavicipitales dapat dilihat pada White dkk. (2003).

7.1.5 Jamur karat

Penyakit karat disebabkan oleh jamur yang termasuk bangsa Uredinales. Gejala-gejalanya meliputi bisul bertepung pada daun dan batang. Spora jamur berwarna kuning, jingga atau coklat dan mempunyai penampakan seperti karat. Contohnya, *Puccinia polysora* pada jagung, *Puccinia purpurea* pada sorgum, dan *Phakopsora pachyrhizi* pada kedelai. Jamur karat dibahas secara luas oleh Cummins dan Hiratsuka (2003).

Jamur karat merupakan patogen tanaman yang bernilai ekonomi tinggi. Lebih dari 7.000 jenis jamur telah dipertelakan yang mencakup 160 marga, di antaranya yang terbesar adalah *Puccinia*. Paling sedikit 30 marga bersifat monotipe. Jamur karat selama daur hidupnya dapat membentuk lima tipe spora. Tipe spora ditulis dengan angka Romawi:

- O** Spermata (dibentuk dalam spermogonium).
- I** Esiospora (dibentuk dalam esium).
- II** Uredinospora (dibentuk dalam uredinium).
- III** Teliospora (dibentuk dalam telium).
- IV** Basidiospora (dibentuk di atas basidium oleh teliospora yang sedang berkecambah).

Jamur karat yang menghasilkan kelima tipe spora disebut makrosiklik. Banyak jamur karat yang tidak mempunyai kemampuan untuk menghasilkan satu tipe spora atau lebih misalnya jamur karat mikrosiklik yang hanya menghasilkan tipe III dan IV. Banyak jamur karat mempunyai dua tanaman inang yang tidak berkerabat, inang primer untuk tipe II, III dan IV, dan inang lainnya untuk tipe O dan I. Jamur karat dengan dua tanaman inang yang tidak berkerabat adalah heteroesius. Jamur karat yang mempunyai inang tunggal disebut autoesius.

Daur hidup jamur karat makrosiklik dan heteroesius yang khas adalah sebagai berikut:

1. Basidiospora yang sedang berkecambah menginfeksi daun tanaman inang.
2. Spermogonia yang dihasilkan di daun melepaskan sel-sel kecil (spermatia) dalam tetesan kecil yang disebarkan oleh serangga. Hifa reseptif di permukaan tumbuh keluar dari spermogonium (atau melalui epidermis) yang dibuahi oleh spermatia dari kelamin yang berlawanan.
3. Hifa yang terbentuk menghasilkan esium dan esiospora yang disebarkan oleh angin atau serangga. Esiospora hanya dapat menginfeksi inang lain.
4. Setelah menginfeksi, miselium membentuk uredinium dan urediniospora yang tampak seperti massa debu, berwarna jingga atau coklat. Urediniospora disebarkan oleh angin. Mereka menyebabkan infeksi baru pada inang yang sama dan beberapa generasi urediniospora mungkin dibentuk selama musim tumbuh.
5. Telium dengan teliospora dibentuk pada akhir musim tumbuh. Kadang-kadang teliospora dan urediniospora menempati sorus yang sama. Teliospora biasanya berfungsi sebagai spora yang sedang istirahat. Setiap sel teliospora mampu membentuk basidium tunggal, bersekat tiga, yang menghasilkan basidiospora pada sterigmata. Basidiospora disebarkan oleh angin.

Jika memeriksa material tanaman yang diduga terinfeksi jamur karat amatilah hal-hal berikut ini:

- Uredinium dan telium - terdapat di mana? Di bagian permukaan daun (atau bagian tanaman yang lain) yang mana?;
- Urediniospora - bentuk dan hiasan pada permukaan;
- Parafisa (sel steril) - jika ada, bentuk dan ukurannya;
- Pori kecambah - jumlah dan letak pada urediniospora; dan
- Teliospora - bentuknya, pembentukan sekat, dan ada tidaknya tangkai.

7.1.6 Jamur api

Penyakit jamur api disebabkan oleh jamur yang termasuk kelas Ustilaginomycetes. Ciri khas jamur ini ialah dibentuknya massa spora seperti tepung berwarna hitam (sori). Sori tampak di dalam atau di permukaan akar, batang, daun, perbungaan, bunga, kepala sari dan bakal buah.

Jamur api merupakan patogen tanaman pertanian dan tanaman hias yang sangat penting. Ada lebih kurang 2.000 jenis jamur api yang termasuk dalam 90 marga. Klasifikasi jamur api telah banyak berubah dalam beberapa tahun terakhir berdasarkan hasil penelitian ultrastruktur dan molekuler. Dalam sejarahnya, klasifikasi bergantung kepada cara perkecambahan spora. Informasi selanjutnya dapat dilihat pada Vánky (2002).

Ciri-ciri jamur api yang paling mencolok ialah massa spora seperti debu yang berwarna gelap (teliospora), di dalam sori pada organ-organ tertentu. Spora jamur api tidak bertangkai, sangat berbeda dengan teliospora jamur karat. Spora jamur api umumnya disebarkan oleh angin.

Teliospora berkecambah dan menghasilkan basidiospora (sporidia) yang berkecambah seperti koloni khamir dalam kultur. Di alam, dua basidiospora yang sedang berkecambah bergabung membentuk hifa infeksi. Biasanya hanya bagian-bagian tertentu dari tanaman inang yang rentan terhadap infeksi, misalnya bakal buah dan bunga.

Perubahan-perubahan mutakhir dalam klasifikasi jamur api berarti bahwa banyak nama jamur api telah berubah. Beberapa contoh adalah sebagai berikut:

- *Sporisorium* terbatas pada rerumputan dan mengakomodasi banyak jamur api yang semula dalam marga lain, termasuk *Sphacelotheca* and *Sorosporium*;
- *Sphacelotheca* terbatas pada inang yang termasuk Polygonaceae dan sekarang digolongkan dalam Urediniomycetes (yang meliputi jamur karat);
- *Sorosporium* terbatas pada bunga tanaman inang dalam Caryophyllaceae; dan
- *Ustilago* terbatas pada rerumputan namun jenis-jenis yang dipertelakan pada inang-inang lain (terutama dikotil) kebanyakan termasuk *Microbotryum* dalam Urediniomycetes.

Bila mengamati materi tanaman yang diperkirakan terinfeksi jamur api amatilah yang berikut ini:

- Bagian inang yang terinfeksi;
- Jaringan hipertrofi;
- Adanya bola-bola spora atau spora-spora yang lepas;
- Bentuk, ukuran dan hiasan permukaan spora;
- Ada tidaknya sel-sel steril di antara spora;
- Ada tidaknya peridium dan kolumela di dalam sorus;

7.2 BAKTERI

Bakteri adalah mikroorganisme bersel tunggal, prokariot, tidak berklorofil, dan dicirikan oleh perkembang biakan yang cepat. Bakteri terdapat di mana-mana dan beragam menurut sifat fisiologinya, sehingga mereka menempati relung ekologi yang luas. Penyakit bakteri pada tanaman terdapat di seluruh dunia. Karena bakteri menyukai kondisi lembab atau hangat, mereka sangat penting di daerah tropik, subtropik dan yang suhunya hangat.

Umumnya bakteri dapat bertahan hidup pada sisa-sisa tanaman pertanian, di dalam tanah, pada biji atau tanaman hidup. Bakteri menginfeksi tanaman melalui luka atau pembukaan alami seperti stomata dan lentisel. Biji yang terinfeksi, bibit tanaman yang terinfeksi, cipratan air, serangga dan mesin semuanya dapat menyebarkan bakteri.

Tidak ada klasifikasi formal untuk bakteri, namun nama-nama yang diberikan untuk bakteri telah diatur. *International Code of Nomenclature of Bacteria (Bacteriological*

Code) berisi peraturan-peraturan yang mengatur pemberian nama bakteri yang akan digunakan. Pada tahun 1975, *Bacteriological Code* (Revisi 1975) memperkenalkan konsep publikasi yang sah (*valid*) untuk nama-nama bakteri. Penerbitan *Approved Lists of Bacterial Names* (*International Journal of Systematic Bacteriology*, 1980, 30, 225-420) merupakan titik awal baru dimulainya tata nama bakteri. *International Code of Nomenclature of Bacteria* (Revisi 1990) merupakan landasan tata nama bakteri. Kode tersebut menyatakan bahwa nama suatu takson terbit dengan sah dan karena itu kedudukan dalam tata nama, jika salah satu kriteria berikut ini terpenuhi:

- Nama tersebut disitir di dalam *Approved Lists of Bacterial Names*;
- Nama tersebut terbit di dalam makalah dalam *International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB)* atau dalam *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)* dan memenuhi persyaratan yang ditetapkan dalam *Bacteriological Code*. Sejak Agustus 2002, ada lagi satu persyaratan dari IJSEM bagi penulis jenis baru, anak jenis baru, dan kombinasi baru untuk memberikan bukti bahwa spesimen tipe telah disimpan sekurang-kurangnya paling tidak di dua koleksi kultur yang dikenal di dua negara yang berbeda; dan
- Nama tersebut telah diterbitkan secara sah dengan cara diumumkan dalam Daftar Validasi. Daftar Validasi adalah daftar yang diterbitkan dalam IJSB atau IJSEM yang memvalidasi nama-nama bakteri yang diterbitkan di tempat lain.

Approved Lists of Bacterial Names memuat 2.212 nama marga, jenis atau anak jenis dan 124 nama takson tingkat yang lebih tinggi. *Approved Lists of Bacterial Names* mengakui nama jenis-jenis bakteri berdasarkan pertelaan modern. Pada tahun 2002 tercatat adanya 5.806 jenis bakteri yang termasuk dalam sekitar 1.094 marga. Telah tercatat adanya 132 jenis bakteri patogen tanaman dalam 29 marga. Marga-marga utama bakteri penyebab penyakit tanaman adalah *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Xanthomonas* dan *Xylella*. Dalam takson-takson di atas ada beberapa ratus patogen, banyak yang dikenal sebagai patovar yang spesifik pada jenis dan marga tanaman inang mereka. Contohnya, *Pseudomonas syringae* mempunyai lebih dari 40 patovar yang berbeda, sedangkan *Xanthomonas campestris* mempunyai lebih dari 123 patovar.

Banyak bakteri patogen tanaman mempunyai daur penyakit yang hidup pada inang sebagai epifit sebelum fase patogen. Banyak bakteri patogen tanaman tidak masuk ke dalam sel secara langsung, tetapi memperbanyak diri dalam ruang antar sel. Bakteri-bakteri ini dapat masuk melalui lubang alami seperti stomata, hidatoda, dan luka. Bakteri-bakteri ini memiliki satu seri faktor virulensi yang dikeluarkan oleh bakteri, termasuk enzim ekstraselular, racun, fitohormon dan polisakarida ekstraselular.

Diagnosa penyakit bakteri tanaman meliputi pemeriksaan yang teliti terhadap semua gejala dan mempertimbangkan faktor-faktor lain yang mungkin penting. Penyakit bakteri dapat ditunjukkan dengan tidak adanya patogen dan hama yang lebih dapat dilihat seperti serangga dan jamur. Adanya lanyau (*ooze*) dan observasi dengan mikroskop pada goresan bakteri dari permukaan yang diiris di bawah air menunjukkan infeksi bakteri.

Metode pengenceran seringkali digunakan untuk mengisolasi bakteri. Tujuannya ialah untuk mendapatkan koloni tunggal dari patogen yang diduga, sehingga menjamin isolasi kultur murni yang hanya berisi satu jenis bakteri. Mediumnya harus sesuai dan permukaan agar-agar harus kering. Pastikan kemurnian kultur sebelum memulai pengujian. Bekerja dengan kultur campuran merupakan usaha yang sia-sia dan memberikan hasil yang tidak ada artinya. Banyak patogen tanaman yang dapat diidentifikasi sementara dengan menggunakan beberapa pengujian.

Sebelum mencoba mengidentifikasi kultur bakteri, kultur tersebut sebaiknya diperiksa kemurniannya. Hal ini dilakukan dengan membuat larutan yang sangat encer dari beberapa sel dalam air steril atau larutan garam steril dan membuat goresan dengan jarum ose pada cawan agar-agar yang kering, seperti untuk goresan isolasi. Goresan diperiksa setiap hari selama beberapa hari untuk mengecek apakah semua koloni identik. Koloni yang tampak identik pada waktu tumbuh terpisah kadang terlihat berbeda jika tumbuh berdekatan. Jika ada keraguan tentang kemurnian kultur pada tahap ini, koloni tunggal sebaiknya dibuat lagi sub-kulturnya sampai kemurniannya terjamin. Tidak ada gunanya bekerja dengan kultur campuran.

Pengujian goresan untuk mengecek kemurnian sebaiknya juga digunakan untuk mengamati morfologi koloni. Bentuk, ukuran, tekstur, tanda-tanda permukaan koloni, elevasi, tipe tepi, konsistensi, warna, sifat tembus atau tidak tembus cahaya dan kecepatan pertumbuhan koloni harus dicatat. Demikian pula adanya pigmen, presipitasi atau kristal sebaiknya dicatat juga.

Kunci dikotom (pembagian dalam dua bagian) merupakan salah satu bentuk kunci paling awal yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Diagnosa mengikuti gerak maju langkah demi langkah sepanjang rute percabangan. Walaupun kunci umumnya tidak dapat dipercaya lagi dalam bidang yang lebih luas dari taksonomi bakteri, namun kunci tersebut masih digunakan dengan baik oleh ahli diagnosa yang tertarik pada patogen tanaman. Haruslah hati-hati selama melaksanakan prosedur identifikasi, terutama pada pengujian awal. Sejumlah teknik lainnya digunakan untuk mempermudah identifikasi bakteri patogen tanaman, seperti analisa asam lemak, uji tipe reaksi terhadap fagotipe, antibodi monoklonal dan pemeriksaan asam nukleat.

Sifat morfologi mempunyai nilai sangat terbatas untuk identifikasi bakteri. Ukuran koloni, kecepatan pertumbuhan, warna, tekstur dan sifat tidak tembus cahaya tidak memberikan cukup banyak informasi untuk mengidentifikasi bakteri. Identifikasi bakteri bergantung kepada satu seri percobaan yang menunjukkan ada atau tidak adanya enzim-enzim tertentu.

7.3 FITOPLASMA

Fitoplasma, sebelumnya dikenal sebagai organisme yang menyerupai Mycoplasma, adalah prokariota dalam kelas Mollicutes. Mereka mirip dengan bakteri namun tidak mempunyai dinding sel yang kaku dan tidak dapat hidup bebas di lingkungan sekitar dan belum dapat ditumbuhkan dalam kultur. Fitoplasma dijumpai dalam sel-sel tabung tapis jaringan floem tanaman dan umumnya disebarkan oleh wereng daun dan wereng batang pemakan floem. Fitoplasma merupakan parasit obligat dan

menyelesaikan daur hidupnya di dalam jaringan inang. Fitoplasma menyebabkan penyakit pada berbagai tanaman inang. Gejala-gejala yang biasanya disebabkan oleh fitoplasma ialah daun menjadi berwarna kuning, pengerdilan, mati pucuk, ukuran daun berkurang ('daun kecil'), sapu setan, berfilodium, menghijau (*virescence*) dan gigantisme ('kuncup besar').

Sampai saat ini, metode-metode utama yang digunakan untuk mengidentifikasi dan membedakan penyakit fitoplasma adalah adanya gejala, kisaran inang, kekhususan vektor, dan pengamatan dengan mikroskop elektron transmisi (TEM) terhadap irisan yang sangat tipis dari jaringan yang sakit. Perkembangan teknik molekuler atas dasar DNA, terutama primer PCR fitoplasma-spesifik yang dirancang berdasarkan rangkaian gen 16S ribosomal RNA (rRNA) yang sangat awet, telah meningkatkan kapasitas untuk mendeteksi dan mengidentifikasi fitoplasma.

7.4 VIRUS DAN VIROID

Virus adalah parasit obligat yang amat sangat kecil dan hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop elektron. Tidak serupa dengan bakteri dan jamur, virus tidak terdiri atas sel-sel, melainkan terdiri atas selubung atau cangkang protein yang disebut '*capsid*', yang mengelilingi genom asam ribonukleat (*Ribonucleic Acid*, RNA) atau asam deoksiribonukleat (*Deoxyribonucleic Acid*, DNA). Virus hanya dapat memperbanyak diri di dalam sel hidup dengan komando yang diberikan oleh proses genetik tanaman yang terinfeksi. Sumber energi tanaman dengan demikian dialihkan untuk mengembang-biakkan virus. Infeksi virus mengganggu fungsi normal tanaman seperti fotosintesis dan pertumbuhan.

Serangga pengisap cairan misalnya kutu daun dan wereng daun seringkali menyebarkan virus. Bibit tanaman vegetatif yang terinfeksi memegang peranan penting dalam penyebaran virus. Virus seringkali bertahan hidup pada inang lainnya yang tumbuh sebagai gulma.

Viroid adalah molekul-molekul asam ribonukleat yang bundar dengan bobot molekul rendah, tidak memiliki selubung protein, dan menginfeksi sel-sel tanaman, menggandakan diri dan menyebabkan penyakit. Viroid ditularkan secara mekanis selama pemangkasan tanaman, melalui penyebaran biji dan perkembang-biakkan vegetatif misalnya okulasi.

7.4.1 Jenis virus dan catatan-catatan

Jenis-jenis virus tidak harus selalu berhubungan dengan spesimen karena virus tidak merupakan organisme berbentuk sel. Jenis-jenis virus tanaman, seperti yang dikenal oleh 'International Committee on Taxonomy of Viruses' (ICTV) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>), dipertelakan dan diidentifikasi, atas dasar kepemilikan kombinasi yang unik dari beberapa sifat termasuk:

- Jenis tanaman yang secara alami terinfeksi virus;

- Gejala-gejala pada tanaman yang secara alami terinfeksi pada beberapa tingkat infeksi;
- Cara penyebaran, misalnya melalui persentuhan, biji, serbuk sari, dan vektor;
- Berbagai jenis yang rentan terhadap infeksi percobaan;
- Bentuk partikel virus;
- Sifat khas biokimia protein dan asam nukleat virus;
- Perbandingan rangkaian dan organisasi gen dengan virus lain yang telah dikenal; dan
- Serologi.

Alasan mengapa catatan-catatan virus tanaman seringkali tidak dikaitkan dengan spesimen-spesimen tanda bukti ialah karena sampai saat ini, belum mungkin untuk menyimpan spesimen-spesimen virus dalam keadaan hidup. Umumnya virus tidak stabil walaupun dikering-bekukan. Sekarang sudah ada metode yang canggih untuk penyimpanan virus jangka panjang, misalnya dengan mengklon genomnya dalam bakteri.

Oleh karena itu catatan-catatan tentang virus jarang berdasarkan spesimen. Malahan catatan-catatan tentang virus sering berdasarkan sifat-sifat yang tercatat, misalnya teks yang deskriptif, foto, data percobaan, sederetan gen, dan serologi. Informasi tentang sebagian besar virus yang menginfeksi tanaman dapat ditemukan pada pangkalan data VIDE (*Virus Identification Data Exchange*) (<http://image.fs.uidaho.edu/vide/refs.htm#descriptions>).

Virus bentuk-batang

Virus bentuk-batang, termasuk virus mosaik tembakau (*Tobacco Mosaic Virus*, TMV) umumnya berdiameter 3–25 nm dan panjangnya 150–2000 nm, bergantung kepada panjang RNA-nya. Partikel virus dapat berbentuk batang lurus, melengkung atau bengkok. Struktur umum virus ini terdiri atas RNA dan subunit protein yang tersusun dalam sebuah uliran.

Virus isometrik

Virus isometrik dapat dijumpai tunggal atau dalam pasangan dengan diameter 20–70 nm. Di bawah mikroskop elektron virus ini tampak mempunyai struktur geometris dengan simetri ikosahedral, yaitu mempunyai 12 puncak dan 20 permukaan bersegi tiga. Contohnya, *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV).

Virus bentuk basil

Virus bentuk basil mempunyai bentuk mirip dengan bakteri dalam marga *Bacillus*. Virus ini kadang diselubungi oleh selubung. Contohnya antara lain, *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV) dan *Sugarcane Bacilliform Virus* (SCBV).

Beberapa cara dapat digunakan untuk mengidentifikasi virus tanaman. Para ahli virologi tanaman seringkali memelihara tanaman herba indikator di dalam rumah kaca bebas serangga, yang dapat digunakan untuk mempelajari daya tular virus dan berbagai tanaman inang. Tanaman-tanaman ini memperlihatkan gejala-gejala yang berbeda bila diinokulasi dengan virus yang berbeda. Gejala-gejala saja biasanya tidak

cukup untuk identifikasi yang meyakinkan. Teknik-teknik laboratorium seperti serologi, mikroskop elektron, dan analisis asam nukleat harus digunakan dalam identifikasi virus.

7.4.2 Gejala virus

Gejala-gejala penyakit yang tampak, yang disebabkan oleh infeksi virus seringkali dapat dilihat oleh seorang pembuat diagnosa yang berpengalaman. Ada dua tipe gejala utama penyakit virus, yaitu yang diakibatkan oleh infeksi primer pada tanaman inang, misalnya bilur, dan yang disebabkan infeksi sekunder atau sistemik, contohnya mosaik. Tidak seperti jamur patogen, virus hanya dapat masuk ke dalam sel tanaman melalui luka, seperti rambut-rambut epidermis yang putus, luka lecet ringan, atau lubang dalam lapisan sel epidermis yang seringkali disebabkan oleh gigitan serangga.

Gejala awal yang berkembang pada tempat masuknya virus ke dalam sel tanaman disebut gejala lokal dan seringkali jelas berbentuk areal sel-sel yang sakit, yang disebut bilur. Bilur bervariasi ukurannya, dari sebesar titik ujung jarum sampai bercak yang lebih besar, yang dapat menjadi klorotik, karena hilangnya klorofil, atau nekrotik (jika sel-sel mati). Bilur seringkali terjadi setelah penularan virus melalui cairan tanaman secara mekanis ke permukaan daun dan kadang-kadang setelah dimakan serangga yang membawa virus, seperti kutu daun, walaupun hal ini jarang terjadi.

Pada beberapa interaksi antara inang dan virus, virus tidak mampu menyebar ke luar lokasi awal infeksi dan bilur lokal mungkin merupakan satu-satunya gejala yang dapat diamati. Tipe reaksi yang sangat terbatas ini disebut reaksi hipersensitif. Jika virus tidak ditahan, virus akan menyebar ke dalam mesofil daun. Segera sesudah virus mencapai sistem jaringan pembuluh, virus akan menyebar sangat cepat ke seluruh tanaman, sehingga mengakibatkan terjadinya infeksi sekunder atau sistemik. Kebanyakan virus berpindah melalui floem.

Gejala sekunder atau gejala sistemik mungkin dapat menghasilkan perubahan-perubahan yang dapat dilihat, contohnya klorosis dan layu, dan perubahan internal seperti terbentuknya struktur sel yang abnormal, yang hanya dapat diamati dengan bantuan mikroskop cahaya atau mikroskop elektron.

Gejala mosaik terjadi jika sel-sel tertentu dalam organ tanaman yang dipengaruhi virus, biasanya daun, terinfeksi dan berubah warna, sementara sel-sel lainnya tampak normal. Sel-sel yang terinfeksi biasanya berwarna hijau pucat, karena produksi klorofil berkurang. Bentuk dan pola gejala-gejala mosaik sangat bervariasi bergantung kepada tanamannya. Pada jenis-jenis monokotil, gejala ini biasanya tampak berbentuk garis atau goresan. Pada jenis-jenis dikotil, bila bagian yang warnanya berubah bentuknya bundar, seringkali diacu sebagai moreng (bilur, *mottle*), kurik klorotik (*chlorotic flecking*), bercak dan blobor.

Pada beberapa interaksi antara virus dan tanaman inang, seluruh daun mungkin menjadi kuning disebabkan oleh berkurangnya produksi klorofil dan hancurnya kloroplas. Hal ini merupakan gejala utama yang ada hubungannya dengan virus-virus

‘menguning’, bit kuning, dan jelai kerdil kuning. Gejala menguning biasanya mula-mula diamati berupa klorosis antar vena, dan kadang-kadang di areal yang berbatasan dengan jaringan-jaringan pembuluh tetap hijau, yang berlainan dengan bagian-bagian daun lainnya. Walaupun demikian, virus-virus tertentu menyebabkan vena menguning (*vein yellowing*) dan vena tembus cahaya (*vein clearing*), misalnya penyakit *lettuce big vein* dan *Turnip Mosaic Virus* (TuMV).

Bercak cincin adalah gejala yang biasanya terjadi ketika areal yang berpenyakit terbatas pada lingkaran sel yang terinfeksi. Sel-sel yang terinfeksi ini dapat menjadi klorotik atau nekrotik. Cincin dapat terjadi dalam lingkaran konsentris (Gambar 15). Bercak cincin dapat pula terjadi pada batang dan buah, walaupun umumnya terjadi pada daun. Contoh virus yang menyebabkan bercak cincin termasuk *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) dan *Papaya Ringspot Virus* (PRSV).

Nekrosis sel dapat terjadi pada bilur yang terlokalisasi sekitar titik infeksi atau secara teratur pada bagian-bagian tanaman lainnya, seperti buah dan biji atau daun yang terlindung. Contohnya, *Turnip Mosaic Virus* menyebabkan nekrosis pada bagian dalam daun tanaman kol.

Pengurangan ukuran tanaman (pengerdilan, pengecilan) adalah gejala umum infeksi virus yang biasanya dijumpai berkombinasi dengan gejala lainnya. Pengerdilan dapat terjadi di seluruh tanaman atau terbatas pada bagian tertentu seperti meristem pucuk. Gejala ini mungkin sulit diamati, kecuali jika tanaman yang terinfeksi virus tumbuh berdampingan dengan tanaman sehat.

Bean Common Mosaic Virus dan *Strawberry Latent Ringspot Virus* merupakan dua di antara virus-virus yang dapat mengakibatkan pertumbuhan abnormal, yaitu distorsi pada daun dan batang tanaman inang yang terinfeksi. Kedua virus ini menyebabkan daun kacang-kacangan dan seledri menjadi seperti sabuk. Pertumbuhan abnormal muncul karena tidak adanya keseimbangan hormon dalam daun. Distorsi dan ketidaknormalan lainnya termasuk proliferasi sel, seperti pada batang coklat yang terinfeksi *Cacao Swollen Shoot Virus*. Pertambahan jumlah sel yang berlebihan disebut hiperplasia, sedangkan pertambahan ukuran sel disebut hipoplasia. Contoh hipoplasia adalah terjadinya lubang-lubang pada batang jeruk disebabkan oleh *Citrus Tristeza Virus*.



Gambar 15 Gejala-gejala virus (dari kiri ke kanan), lingkaran klorotik, bercak cincin, dan mosaik

Beberapa virus menimbulkan pertumbuhan seperti tumor (enasi dan tumor) pada daun dan akar. Pertumbuhan pada daun disebut enasi yang tampak seperti kutil, dan dapat terjadi di permukaan atas dan bawah daun. Gejala enasi dapat dijumpai pada tanaman kapri yang terinfeksi *Pea Enation Mosaic Virus* (PEMV). Seperti pada distorsi batang dan daun, tumor terjadi sebagai akibat dari tidak adanya keseimbangan hormon yang diinduksi virus, yang menyebabkan terjadinya proliferasi sel abnormal.

Perubahan warna pada daun mahkota dan bunga tulip adalah salah satu penyakit virus yang dipertelakan pertama kali dalam abad ke-17. Penyakit yang disebabkan virus mosaik pada tulip ini menghasilkan keanekaragaman warna pada bunga tulip. Umbi yang terinfeksi virus dihargai tinggi oleh para petani di Negeri Belanda dan penyakit ini sampai sekarang masih dimanfaatkan. *Turnip Mosaic Virus* dan *Bean Yellow Mosaic Virus* berturut-turut dapat menyebabkan perubahan warna pada stok dan gladiol.

Infeksi virus dapat mengakibatkan jumlah buah yang sedikit, kecil atau bentuknya tidak baik. Misalnya *Cucumber Mosaic Virus* dapat mengakibatkan buah ketimun yang cacat. Demikian pula, infeksi tanaman selada oleh *Lettuce Mosaic Virus* dapat sangat mengurangi produksi biji. Juga serbuk sari tanaman yang terinfeksi virus seringkali steril atau kelangsungan hidupnya dapat terganggu.

Kerusakan kloroplas sel dan proliferasi sel yang abnormal telah dikemukakan di atas. Walaupun demikian, ada perubahan sitologi dan histologi lainnya yang terjadi, misalnya 'jasad kepungan' (*inclusion bodies*) yang disebabkan oleh virus. Beberapa jenis virus telah diamati dalam inti sel tanaman. Banyak virus menyebabkan perubahan di dalam kloroplas, kebanyakan mengakibatkan penurunan daya biokimia dan struktur, yaitu kehilangan warna dan bentuk. Perubahan histologi lainnya termasuk pengurangan atau penambahan jumlah sel, nekrosis sel internal, terbentuknya lignin pada unsur xilem, dan degenerasi serta kematian sel floem.

Virus dapat tertimbun dalam jumlah besar di dalam sel, membentuk 'jasad kepungan', yang hampir seluruhnya dapat terdiri atas partikel virus. 'Jasad kepungan' dapat terbentuk di dalam inti sel, tetapi biasanya di dalam sitoplasma. Partikel dapat tersusun secara acak, berdampingan, ujung dengan ujung, atau dalam kisi-kisi tiga dimensi.

Tanaman yang tidak memperlihatkan gejala infeksi virus tidak berarti bahwa tanaman bebas virus. Virus dapat menginfeksi inang tertentu dan memperbanyak diri di dalam sel inang tanpa memperlihatkan gejala yang dapat dilihat. Infeksi laten sangat umum dijumpai pada tanaman liar dan gulma. Virus dapat bertahan hidup terus pada inang pengganti yang kemudian dapat ditularkan kembali pada tanaman hortikultura dan tanaman pertanian oleh serangga pengisap cairan.

Perkembangan gejala penyakit virus seringkali beragam bergantung kepada galur virus dan gen mematenkan yang dimilikinya. Tanaman inang itu sendiri mungkin resisten, toleran, atau rentan terhadap infeksi virus. Demikian pula, umur tanaman dan saat infeksi memainkan peranan penting dalam penampakan gejala. Umumnya, tanaman muda lebih rentan terhadap infeksi dan tanaman yang tua lebih toleran. Infeksi yang lebih awal juga cenderung mengakibatkan hilangnya hasil panen yang

lebih besar daripada infeksi yang terjadi kemudian.

Perkembangan gejala virus seringkali lambat pada suhu tinggi, sebab perbanyakan virusnya biasanya terhambat. Walaupun demikian, suhu tinggi juga dapat mengurangi kemampuan tanaman inang melawan infeksi, dan segera setelah suhu turun, infeksi dapat berlangsung dengan cepat. Tanaman yang tumbuh dengan intensitas cahaya yang tinggi, kurang peka terhadap infeksi daripada tanaman yang tumbuh dengan intensitas cahaya rendah. Juga, tanaman yang tumbuh pada tanah yang subur seringkali lebih rentan terhadap infeksi virus. Kadar nitrogen yang tinggi, misalnya, dapat menyebabkan tanaman lebih rentan.

Gejala penyakit yang berasosiasi dengan infeksi virus seringkali sangat mirip dengan gejala kekurangan hara atau keracunan kimia seperti kerusakan oleh herbisida. Ada dua cara untuk menyingkirkan ketidakaturan hara atau ketidakseimbangan kimia, yaitu:

- Perhatikan distribusi tanaman yang terjangkit penyakit. Umumnya dalam hal ketidakaturan hara, tanaman akan dipengaruhi menurut pola yang berasosiasi dengan tipe tanah atau penggunaan zat kimia. Virus yang paling sering disebarkan oleh vektor, biasanya mempunyai distribusi mengelompok atau menunjukkan kecenderungan dekat dari sumber infeksi, misalnya gulma;
- Demostrasikan pemindahan gejala dengan menggunakan okulasi atau pemindahan cairan secara mekanis dari tanaman yang diduga terinfeksi virus ke tanaman yang sehat dalam kondisi percobaan. Hal ini merupakan tahapan pertama dalam penggunaan postulat Koch untuk menentukan penyebab penyakit.

7.5 NEMATODA

Metode yang telah lama digunakan untuk mengidentifikasi nematoda ialah membandingkan ciri-ciri morfologi spesimen dengan pertelaan yang telah diterbitkan, seringkali dengan bantuan kunci identifikasi. Berkaitan dengan hal ini, spesimen harus diawetkan dan direkatkan untuk diamati dan diukur dengan bantuan mikroskop mengharuskan dengan perbesaran tinggi. Untuk identifikasi yang meyakinkan, sebanyak 5–10 nematoda betina dewasa dan atau jantan perlu disediakan, karena beberapa ciri yang membedakan bersifat kuantitatif dan keragaman antar jenis umum dijumpai.

Dalam banyak kasus, identifikasi nematoda parasit tanaman sampai tingkat marga dapat dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi umum, pengetahuan mengenai inang dan fauna nematoda di daerah koleksi. Pada beberapa kasus, identifikasi spesimen hidup sampai tingkat jenis dimungkinkan dengan informasi tersebut.

Walaupun demikian, beberapa jenis nematoda sulit ditentukan, bahkan dengan hasil pengamatan pakar mengenai sifat morfologi dan morfometrik yang tepat. Oleh karena itu, nematologi berdasarkan taksonomi dan diagnosa bergerak semakin cepat menuju metode molekuler dan biokimia. Untuk beberapa marga nematoda, sekarang

diperlukan informasi tentang rangkaian DNA untuk mempertelakan jenis baru. Studi kemotaksonomi menunjukkan adanya jenis kriptik, yaitu jenis yang tidak dapat dibedakan berdasarkan sifat morfologinya. Walaupun demikian, dimungkinkan untuk mencari kembali perbedaan morfologi untuk mendukung data kimia.

7.5.1 Perlunya identifikasi

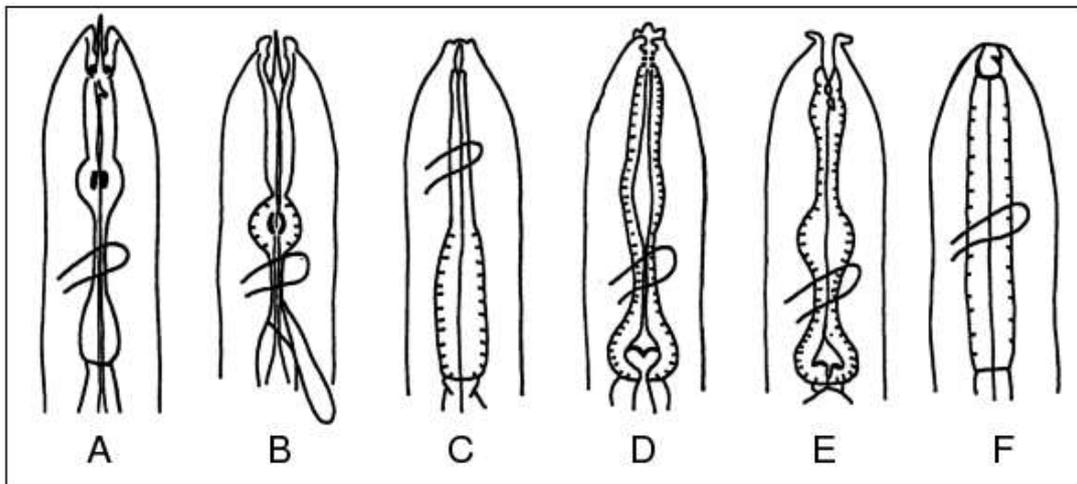
Pendekatan dan keahlian yang diperlukan untuk identifikasi nematoda akan bergantung kepada tujuannya. Spesimen yang disimpan dalam koleksi nasional dan internasional harus dideterminasi, atau paling tidak dikonfirmasi, oleh seorang ahli taksonomi nematoda yang berpengalaman. Meskipun, perlu diketahui bahwa untuk takson yang sulit, ahli taksonomi yang berpengalamanpun mungkin memberikan determinasi yang berbeda atau mungkin tidak dapat memberikan identifikasi yang pasti.

Untuk keperluan survei, identifikasi nematoda mungkin cukup dilakukan oleh ahli diagnosa nematoda, saran ahli taksonomi hanya diperlukan jika terdapat catatan baru atau jenis yang belum dapat diidentifikasi. Apabila ada catatan baru, spesimen harus disimpan dalam koleksi nasional untuk pemeriksaan ulang apabila diperlukan. Jika ada kemungkinan mempunyai implikasi karantina dan perdagangan, maka konfirmasi yang mandiri dapat dianjurkan sebelum dipublikasi.

Untuk studi pengelolaan atau ekologi, determinasi spesimen hidup dengan memperhitungkan fauna lokal dan inang yang sedang diteliti mungkin tepat guna. Namun, untuk memperkuat studi seperti itu disarankan untuk memperoleh penegasan dari ahli taksonom mengenai material yang sedang diteliti. Seringkali dalam pekerjaan seperti ini hanya marga saja yang dideterminasi.

7.5.2 Membedakan nematoda parasit tanaman

Untuk keperluan produksi tanaman dan pengaturannya, pada awalnya penting untuk membedakan nematoda pemakan tanaman dan nematoda pemakan substrat lain. Nematoda pemakan tanaman mempunyai stilet (alat makan berlubang yang dapat dikeluarkan-masukkan) pada lubang mulutnya. Klasifikasi spesimen hidup ke dalam kelompok-kelompok yang diduga, dimungkinkan dengan memeriksanya dibawah mikroskop stereo yang baik kualitasnya. Gambar 16 menunjukkan keragaman dalam morfologi anterior nematoda yang berhubungan dengan perilaku makan.



Gambar 16 Perbandingan morfologi anterior beberapa kelompok nematoda. A, B, C – ‘tylenchid’, ‘aphelenchid’, ‘dorylaimid’ – nematoda berstilet, pemakan tanaman, jamur dan ganggang, beberapa menjadi predator; D, E – ‘rhabditid’, ‘cephalobid’ – pemakan bakteri; dan F – ‘mononchid’ – predator

Dari pada makan tanaman, beberapa jenis nematoda yang berstilet lebih menyukai jamur, ganggang dan lumut kerak, dan beberapa jenis lainnya bertindak sebagai predator mikrofauna tanah. Oleh karena itu, hubungan antara morfologi dan inang perlu dipertimbangkan untuk menempatkan spesimen secara pasti ke dalam marga pemakan tanaman.

7.5.3 Identifikasi jenis

Identifikasi berdasar morfologi

Identifikasi dilakukan berdasarkan bentuk, adanya ciri-ciri anatomi dan jumlahnya termasuk dimorfisme seksual secara morfologi, ukuran-ukuran serta rasio ukuran-ukuran (morfometrik). Kunci-kunci dan pertelaan yang telah diterbitkan menunjukkan ciri-ciri yang mendiagnosa marga dan jenis. Kunci identifikasi yang dapat digunakan dengan bantuan komputer juga telah tersedia. Dua contoh yang menggunakan program-program berbeda adalah marga-marga nematoda tanaman (www.lucidcentral.org) dan nematoda Australia (www.ento.csiro.au).

Identifikasi secara molekuler dan biokimia

Metode-metode DNA berdasarkan urutan pemeriksaan, fragmen yang terbatas dan yang sejenisnya telah dikembangkan untuk memecahkan beberapa tantangan identifikasi dan diagnosa yang teliti. Sebagian orang mengandalkan pada ekstraksi dan amplifikasi (penguatan) DNA dari individu nematoda, sedangkan yang lainnya dapat mendeteksi dan menghitung jenis-jenis tertentu dalam contoh tanah. Suatu kendala yang nyata ialah bahwa identifikasi dapat hanya terbatas pada suatu jenis tunggal atau kelompok jenis yang kecil dan validasi mungkin dapat dilakukan dengan penarikan contoh terbatas dari keragaman antar jenis. Walaupun demikian, penerapan teknologi ini mungkin sekali meningkat dengan pesat.

Metode-metode kemotaksonomi lainnya telah dikembangkan, yang meliputi analisa

isozim, profil protein, pengujian serologi, tetapi hanya beberapa yang telah diterima secara luas. Pemilahan jenis-jenis nematoda buncak akar dengan cara analisa isozim telah terbukti merupakan pendekatan yang praktis karena sifat-sifat morfologi berdasarkan diagnosa kurang tegas. Pendekatan DNA dan kimia membutuhkan fasilitas yang lebih canggih tetapi tidak memerlukan tenaga ahli taksonomi terlatih dalam diagnostik rutin. Walaupun demikian, pengembangan pendekatan ini lebih lanjut harus menggunakan bahan yang telah diidentifikasi secara dapat dipercaya untuk memberikan cara pemecahan yang kuat.

7.6 TEKNIK-TEKNIK DIAGNOSA

7.6.1 Mikroskop elektron payar

Berbeda dengan mikroskop majemuk yang menggunakan cahaya untuk melihat contoh, maka mikroskop elektron payar (*Scanning Electron Microscope*, SEM) menggunakan elektron untuk menghasilkan gambar suatu contoh. SEM mempunyai perbesaran (resolusi) yang jauh lebih besar daripada mikroskop majemuk, karena panjang gelombang elektron sekitar 100.000 kali lebih kecil daripada panjang gelombang cahaya. SEM sangat berguna untuk memeriksa struktur permukaan spora jamur.

Perbesaran terbaik mikroskop cahaya adalah 0,2 μm atau 200 nm. Perbesaran SEM adalah 3–6 nm, hampir 100 kali lebih baik daripada mikroskop cahaya. SEM memungkinkan pengamatan permukaan preparat yang jauh lebih rinci daripada mikroskop cahaya dan memiliki medan pengamatan yang lebih dalam, sehingga lebih banyak contoh yang dapat diamati pada waktu yang sama.

SEM menggunakan cahaya elektron untuk melihat dengan teliti permukaan suatu contoh untuk membentuk gambar tiga dimensi dari spesimen itu. Elektron sangatlah kecil dan mudah dibelokkan oleh molekul gas di udara. Oleh karena itu, untuk memungkinkan elektron mencapai contoh, kolom tempat pancaran elektron lewat dan bilik spesimen dibuat hampa udara.

Untuk menyimpan struktur contoh biologi dalam keadaan hampa udara, contoh harus dikeringkan secara hati-hati dengan menggunakan karbon dioksida cair dalam mesin yang disebut pengering titik kritis (*critical point drier*). Contoh biasanya direkatkan pada tonggak logam (*stub*) dengan menggunakan selotip dua muka (*double-sided tape*), kemudian dilapisi dengan lapisan tipis logam mulia seperti emas, agar bersifat menghantar listrik. Spora jamur karat dan jamur api yang berdinding tebal tidak perlu dikeringkan dengan pengering titik kritis dan dapat langsung diberi lapisan setelah direkatkan pada tonggak logam.

7.6.2 Teknik biokimia dan molekuler

Tidak adanya gejala penyakit yang tampak pada suatu tanaman tidak berarti bahwa tanaman tersebut bebas patogen. Pakar patologi tanaman perlu menggunakan teknik biokimia atau molekuler untuk mendeteksi keberadaan beberapa patogen.

Pengindeksan adalah istilah yang digunakan untuk suatu prosedur pengujian keberadaan patogen yang diketahui, terutama virus, pada tanaman. Pengindeksan memberi peluang untuk menerapkan secara cepat strategi pengendalian dan mengurangi kemungkinan berkembangnya wabah penyakit. Pengindeksan juga penting dalam penerapan strategi karantina untuk menjaga agar suatu negara bebas dari penyakit asing, dan rencana sertifikasi yang menghasilkan bibit tanaman ‘bebas penyakit’.

7.6.3 Serologi (imunologi)

Dalam serologi, antibodi-antibodi khusus yang dibuat untuk antigen-antigen pada patogen digunakan untuk diagnosa penyakit. Antibodi ini dapat bersifat poliklonal (populasi campuran antibodi yang dibuat dengan cara mengebalkan seekor hewan dengan ekstrak patogen dan mengumpulkan darahnya) atau antibodi monoklonal (sel-sel limpa hewan yang dikebalkan yang mengeluarkan antibodi tunggal dipinakkan (*cloned*) dan diperbanyak dalam kultur jaringan).

Salah satu uji serologi diagnostik yang paling umum digunakan ialah *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Antibodi dibiarkan menyerap dalam sumuran cawan mikrotiter. Larutan uji kemudian ditambahkan ke dalam sumuran dan bila terdapat antigen, antigen akan mengikat pada antibodi. Sumuran kemudian dicuci, kemudian ditambahkan antibodi yang dikonyugasikan dengan enzim, sumuran dicuci lagi dan akhirnya ditambahkan substrat enzim. Jika terdapat antigen, maka ikatan konyugasi antibodi-enzim mengkatalisasi perubahan substrat kromogenik menjadi produk yang berwarna.

Diagnosa patogen dengan menggunakan metode serologi memiliki banyak keuntungan. Walaupun untuk memproduksi antibodi diperlukan waktu beberapa minggu, namun antibodi itu stabil untuk jangka waktu lama, jika disimpan secara benar dan memberikan hasil yang cepat. Metode serologi dapat disesuaikan untuk kondisi laboratorium dan lapangan.

7.6.4 Metode berdasar asam nukleat

Banyak gen dimiliki secara bersama oleh organisme hidup, tetapi umumnya gen dengan fungsi yang sama akan berbeda urutannya dari satu takson ke takson lain. Keragaman ini dapat digunakan untuk diagnosa dengan menggunakan beberapa teknik seperti hibridisasi asam nukleat dan reaksi rantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Teknik molekuler moderen untuk menganalisa asam nukleat sangatlah peka, sehingga pada kondisi ideal jumlah DNA dalam pikogram dapat dideteksi.

Suatu PCR tertentu meliputi pemanasan campuran DNA, polimerase DNA yang tahan panas, primer DNA dan dNTP dalam larutan penyangga yang sesuai hingga suhu lebih dari 90°C untuk mengubah sifat DNA, diikuti pendinginan hingga suhu sekitar 50–60°C untuk menguatkan primer pada untaian DNA yang terpisah, kemudian suhu dinaikkan menjadi 72°C, yang merupakan suhu optimal untuk polimerisasi DNA, agar terbentuk untaian DNA komplementer sebagai perpanjangan

dari primer DNA. Setelah setiap siklus perubahan sifat, penguatan dan perpanjangan, jumlah DNA menjadi berlipat dua, menuju peningkatan jumlah DNA secara eksponensial, yang setelah 30 siklus, dapat digambarkan dengan mudah dalam gel agarosa melalui pewarnaan dengan etidium bromid.

Metode diagnosa berdasarkan asam nukleat memiliki keunggulan kecepatan dan kepekaan pendeteksian, beberapa kali lebih baik daripada teknik imunologi. Kelemahan teknik berdasarkan asam nukleat meliputi peralatan, reagen dan sarana yang mahal, kurang praktis jika dibandingkan dengan teknik serologi, dan peningkatan kepekaan dapat berarti bahwa kontaminasi contoh lebih menjadi masalah.

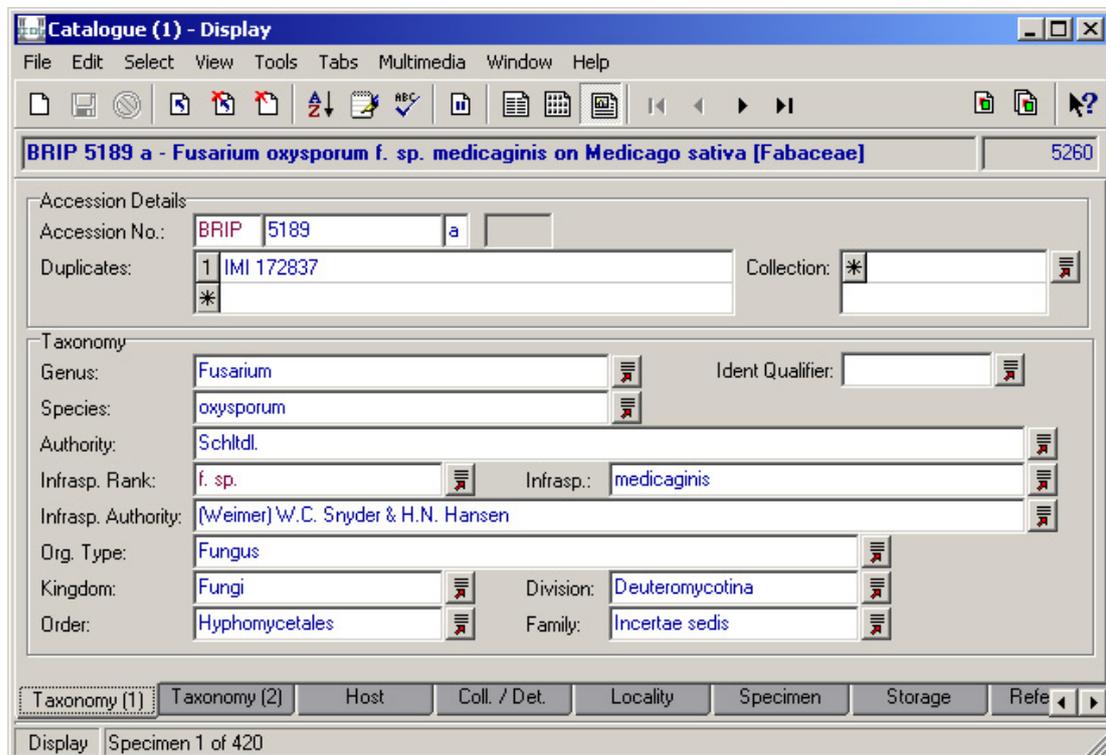
8 PEMELIHARAAN CATATAN SPESIMEN

8.1 PANGKALAN DATA

Memasukkan catatan penyakit tanaman ke dalam pangkalan data adalah penting, karena memudahkan staf herbarium dalam pencarian informasi secara cepat tanpa perlu menyortir banyak sekali contoh secara fisik. Data disimpan secara teratur, sehingga mudah dicari, diperoleh kembali, dianalisa, dan diperbaharui bila perlu.

Informasi yang disimpan dalam pangkalan data dapat digunakan untuk memetakan penyebaran patogen tanaman dan penting untuk karantina dan analisa resiko hama penyakit. Suatu pangkalan data dapat sesederhana sebuah tabel yang dibuat dalam program lembar bentangan (*spreadsheet*) seperti Microsoft Excel atau dapat melibatkan program pangkalan data yang lebih canggih, seperti Microsoft Access, Oracle, BioLink atau KE EMu. Program-program ini dapat memungkinkan pengelolaan multimedia, seperti gambar digital dan alat pelaporan dengan gambar yang terpasang tetap sehingga mempercepat pertukaran informasi.

Pangkalan data seperti KE EMu (Gambar 17) sangat berguna, karena pengguna dapat menelusuri perubahan. Hal ini penting bilamana sampai pada variabel yang berubah secara konstan seperti tata nama patogen dan tanaman inang.

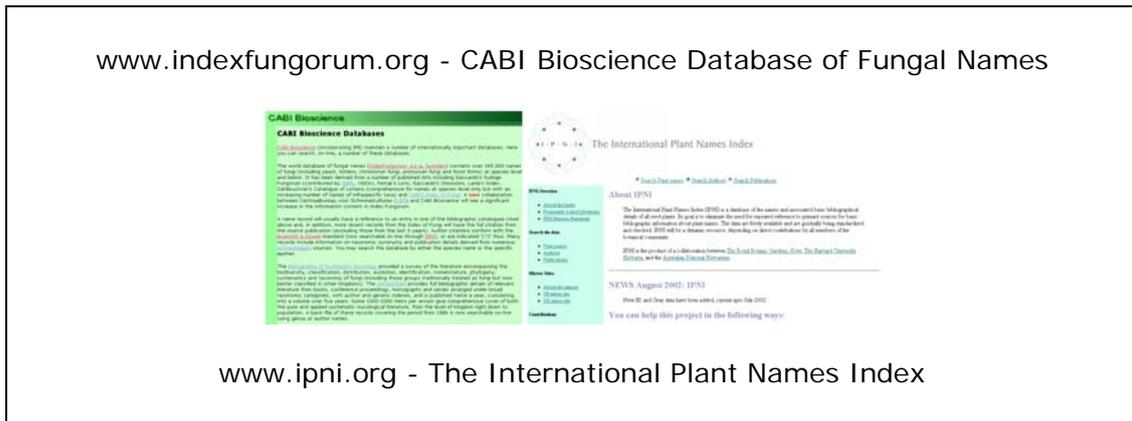


Gambar 17 Modul katalog pangkalan data KE EMu

Pangkalan data tidak hanya menyimpan gambar digital, namun juga berbagai tipe multimedia seperti 'text files', 'word documents', 'PDFs', 'html', dan video.

Informasi yang rinci tentang kolektor, determinator dan petani dapat disimpan, seperti alamat, nomor telepon, fax, email, biografi, dan pustaka. 'Task templates' juga dapat dibuat untuk membantu staf herbarium memeriksa peminjaman yang sudah habis masanya, pembuatan kultur, dan kejadian penting lainnya.

Sangatlah penting untuk menyimpan data yang akurat di dalam pangkalan data, walaupun pangkalan data yang digunakan untuk menyimpan informasi tentang spesimen herbarium cukup kompleks. Hal ini sekarang menjadi lebih mudah, karena banyak pangkalan data taksonomi sekarang dapat ditemukan di Internet (Gambar 18).



Gambar 18 Alamat internet dan homepage dua pangkalan data taksonomi yang penting

Pada skala nasional, pangkalan data koleksi yang tersebar yang dikelola oleh berbagai badan dapat disambungkan dengan sistem 'Web-based' untuk menciptakan herbarium yang sebenarnya (*virtual herbarium*). Contohnya, Australian Plant Pest Database (APPD, <http://appd.cmis.csiro.au/>), yang memberikan kerangka kerja untuk sebuah pangkalan data hama penyakit tanaman nasional yang sesungguhnya. APPD menyatukan catatan semua spesimen yang berada di lebih dari 9 simpul yang tersebar di Australia, sehingga memungkinkan pencarian dengan cepat lokasi spesimen bukti dan pencarian kembali data dari komputer secara efisien dari rincian data.

Pada skala internasional, Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <http://www.gbif.org>) mempunyai pangkalan data yang dapat ditelusuri dengan maksud agar data primer tentang keanekaragaman hayati di dunia dapat diperoleh tanpa biaya dan secara universal dapat diperoleh melalui Internet. GBIF menggunakan portal sendiri agar memungkinkan pertanyaan tentang pangkalan data keanekaragaman hayati di seluruh dunia. Portal GBIF mempunyai akses pada beberapa pangkalan data patogen tanaman.

9 PEMELIHARAAN KOLEKSI

9.1 FASILITAS HERBARIUM

Suatu herbarium sebaiknya memberikan tempat yang aman dan permanen untuk menyimpan spesimen. Herbarium sebaiknya bebas serangga, serta tahan api dan air. Koleksi herbarium patogen tanaman yang cukup besar, sampai dengan 50.000 spesimen, dapat disimpan di ruangan berukuran 9 m², terutama jika penyimpanan yang tersusun rapat digunakan untuk menyimpan spesimen. Rak dan lemari penyimpanan berbahan logam lebih tahan terhadap serangga daripada yang terbuat dari kayu.

Herbarium sebaiknya ditempatkan di dalam ruangan yang suhu dan kelembabannya terkontrol, yaitu pada suhu 20–23°C dan kelembaban 40–60%. Kondisi ini sangat efektif untuk mengendalikan hama serangga perusak, terutama jika dikombinasikan dengan pembekuan spesimen baru. AC sebaiknya digunakan untuk mengatur suhu, sedangkan penyedot kelembaban (*dehumidifier*) untuk mengurangi kelembaban. Jendela dan pintu sebaiknya selalu tertutup untuk mencegah masuknya serangga. Pada daun jendela dapat dipasang pewarna cahaya (*solar tinting*) dan film untuk memantulkan cahaya.

9.2 PENGENDALIAN KUMBANG HERBARIUM

Kondisi di daerah tropik dengan suhu dan kelembaban yang tinggi cocok untuk perkembangan secara cepat serangga hama yang merusak. Beberapa serangga, terutama kumbang herbarium, memakan material tanaman kering dan dapat merusak koleksi herbarium dengan cepat di daerah tropik. Pembekuan spesimen herbarium pada suhu -20°C atau lebih rendah selama sekitar 7 hari merupakan teknik yang paling tepat untuk menghadapi serangga yang berpotensi merusak. Semua spesimen baru perlu dibekukan selama satu minggu sebelum disimpan di herbarium. Spesimen-spesimen herbarium yang sudah ada hendaknya dibekukan secara bergiliran dalam jangka waktu tertentu.

Spesimen-spesimen harus dibungkus dalam kantong plastik atau dalam kotak styrofoam (*Styrofoam*) yang bertutup rapat untuk mencegah kondensasi uap lembab pada spesimen selama pembekuan. Setelah pembekuan, spesimen hendaknya dihangatkan secara bertahap dengan cara dibiarkan dalam herbarium ber-AC sampai suhu spesimen mencapai suhu ruangan.

Spesimen tanaman segar seringkali dikirim ke herbarium untuk diagnosa penyakit. Material ini hendaknya tidak disimpan dekat herbarium dan idealnya, seharusnya diperiksa jauh dari koleksi herbarium. Spesimen herbarium yang diambil (untuk pemeriksaan atau peminjaman) dari lingkungan herbarium yang suhu dan kelembabannya terkontrol, hendaknya dikembalikan pada posisi semula jika telah dibekukan selama 7 hari.

Banyak herbarium memiliki tenaga operator profesional yang dapat melakukan

fumigasi koleksi setahun sekali dengan fumigan yang diakui, seperti metil bromida, karbon bisulfida, karbon tetraklorida, etilen diklorida, gas hidrosianida, linden, kepingan diklorvos atau paradiklorobenzen. Fumigan harus diperlakukan dengan hati-hati, karena berbahaya bagi manusia dan mudah terbakar. Fumigasi bukanlah satu-satunya cara untuk mengendalikan serangga di herbarium, karena telur serangga dan pupa seringkali tidak mati.

9.3 PENGENDALIAN TUNGAU KULTUR

Tungau dapat merupakan masalah kronis dalam koleksi kultur jamur. Tungau pemakan jamur ini dapat terbawa ke laboratorium bersama material tanaman segar, sepatu dan pakaian, tubuh serangga, serta kultur yang berasal dari laboratorium lain. Tungau berkembangbiak dengan pesat pada kondisi tropik. Selain memakan kultur, tungau juga membawa spora jamur dan bakteri pada tubuh dan di dalam ususnya, sehingga dapat mengkontaminasi kultur.

Jika tidak terdeteksi, tungau dapat menyebabkan masalah besar di laboratorium dalam hitungan hari, karena tungau bergerak dengan cepat dari cawan yang satu ke cawan yang lain di dalam inkubator atau di atas meja dan makan kultur jamur. Tungau dapat dilihat dengan mata telanjang pada kultur jamur berupa bintik putih yang sangat kecil. Seringkali, mula-mula tungau diketahui dengan adanya jejak jamur dan bakteri kontaminan yang ditinggalkan pada cawan atau oleh adanya jejak yang ditinggalkan pada tetes-tetes kecil kondensasi pada tutup cawan Petri (Gambar 19). Seringkali, pendeteksian tungau yang pertama kali sudah merupakan pertanda perjangkitan yang besar.

Pencegahan dengan cara menjaga kebersihan yang sehat lebih baik daripada harus mengendalikan perjangkitan tungau.

Cara menjaga kebersihan yang sehat termasuk:

- Pemeriksaan dengan segera ada tidaknya tungau pada semua kultur yang masuk ke laboratorium. Jika kultur harus dipertahankan, maka hendaknya subkultur segera dibuat dan cawan asli hendaknya segera dimusnahkan dengan menggunakan autoklaf;
- Menggunakan inkubator terpisah untuk kultur yang bersih dan cawan-cawan isolasi yang utama;
- Memusnahkan secepat-cepatnya semua kultur yang sudah tua dan material tanaman yang berlebih dengan menggunakan autoklaf;
- Membersihkan secara teratur semua permukaan dengan alkohol 70% dan seminggu sekali mengelap bangku-bangku kerja dengan kain pel, dan bagian dalam inkubator dengan akarisida yang bukan fungisida.

- Menjaga agar supaya cawan-cawan kultur selalu tertutup dengan film plastik atau terbungkus rapat, walaupun pada akhirnya tungau dapat masuk ke dalam kultur yang disimpan dengan cara ini; dan
- Menghancurkan kultur yang terserang dan terkontaminasi dengan menggunakan autoklaf. Jika kultur sangat berharga dan tidak dapat diganti, kultur tersebut dapat ditaruh di dalam freezer selama 24 jam untuk membunuh tungau dewasa dan telur-telurnya. Selanjutnya kultur ini dapat dibuat subkulturnya pada medium yang baru dan cawan aslinya dimusnahkan. Beberapa jamur tidak dapat hidup lagi setelah dibekukan dalam freezer.



Gambar 19 Jejak-jejak tungau yang tertinggal dalam tetes-tetes kecil kondensasi pada tutup cawan Petri

9.4 PEMINJAMAN

Spesimen herbarium pada umumnya dapat dipinjamkan dalam jangka pendek untuk keperluan penelitian ilmiah. Protokol (satu perangkat peraturan yang mengatur komunikasi dan transfer spesimen) perlu dibuat guna menjamin keselamatan dan keamanan spesimen. Sangat dianjurkan untuk meminjamkan material hanya kepada herbarium lain di tempat yang transportasinya aman dan terjamin serta susunan penyimpanannya baik. Permohonan peminjaman hendaknya ditolak, secara keseluruhan atau sebagian, jika kurator herbarium berpendapat bahwa permohonan tersebut melampaui batas, mengganggu, atau tidak sesuai dengan program penelitian herbarium yang sedang berlangsung atau yang sedang diusulkan, atau merasa bahwa spesimen itu mungkin dapat menjadi sasaran penyalahgunaan, rusak, atau memburuk keadaannya.

Spesimen yang dikirim ke luar negeri kadang kala harus melalui perlakuan karantina pada waktu tiba. Perlakuan-perlakuan ini dapat mencakup perlakuan pemanasan, fumigasi, dan penyinaran gamma. Perlakuan-perlakuan tersebut dapat merusak spesimen atau mempengaruhi DNA-nya. Kurator koleksi bertanggung jawab untuk mengambil setiap langkah yang perlu untuk menjamin agar spesimen yang

dipinjamkan dan yang dipinjam dipelihara dengan baik. Jika ada keraguan tentang cara suatu spesimen akan diperlakukan atau apabila perlakuan karantina tertentu akan merusak, maka spesimen hendaknya tidak dipinjamkan.

Jangka waktu peminjaman biasanya antara 6–12 bulan, namun perpanjangan peminjaman mungkin dapat diberikan bila ada permintaan. Herbarium yang meminjamkan spesimen hendaknya meminta agar spesimen yang dipinjam dikembalikan secepat-cepatnya setelah penelitian selesai. Pengembalian pinjaman sebagian-sebagian umumnya dapat diterima, tetapi harus dirundingkan dengan kurator herbarium.

Peminjaman harus dengan syarat bahwa material disimpan pada keadaan yang aman. Paket herbarium hendaknya tidak ditekuk, dilipat, atau ditangani yang menyebabkan spesimen dalam keadaan memburuk. Kecuali pada saat pemeriksaan yang sesungguhnya, spesimen hendaknya tetap berada di dalam paket aslinya. Paket asli harus dikembalikan bersama spesimennya. Semua spesimen hendaknya dibungkus dengan hati-hati untuk mencegah kerusakan selama dalam perjalanan.

Peminjaman hanya dilakukan untuk keperluan pemeriksaan yang tidak merusak spesimen herbarium dan pengamatan morfologi patogen dengan mikroskop untuk keperluan penelitian taksonomi. Material atau ekstrak tidak boleh diambil dari spesimen yang dipinjam untuk kepemilikan tetap (*retention*) atau untuk diberikan ke pihak ketiga tanpa izin tertulis dari kurator herbarium yang meminjamkan. Pengambilan atau pemotongan sebagian dari spesimen yang dipinjam dan ekstraksi DNA untuk keperluan penelitian biasanya diperbolehkan. Pengambilan material dari spesimen harus dilakukan secara hati-hati dan hanya boleh dilakukan jika organ tanaman inang yang diperlukan tersedia cukup banyak, sehingga meninggalkan material serupa yang lengkap. Kesabaran khusus diperlukan pada waktu memotong spesimen tipe.

Lembar anotasi hendaknya digunakan untuk mencatat informasi yang relevan, termasuk informasi tata nama dan taksonomi. Semua lembar anotasi hendaknya menggunakan kertas berkualitas arsip.

Berikut ini adalah daftar semua informasi yang diperlukan untuk catatan peminjaman yang berlaku. Salinan catatan peminjaman ini hendaknya dikirim bersama material herbarium yang dipinjamkan dan kurator herbarium hendaknya menyimpan duplikatnya.

1. Nomor peminjaman (nomor khusus untuk identitas pinjaman).
2. Nama dan alamat lengkap ilmuwan peminjam
3. Tujuan peminjaman (tata nama dan jangkauan taksonomi dari penelitian yang berangkutan).
4. Tanggal pengiriman dan pengembalian pinjaman.
5. Barang-barang yang dipinjamkan (daftar semua individu spesimen herbarium yang dipinjam).

Semua peminjaman harus disahkan oleh kurator herbarium; catatan peminjaman

hendaknya ditandatangani dan diberi tanggal oleh kurator herbarium sebelum material dikirim.

9.5 KEAMANAN

Ada dua aspek yang diperlukan untuk keamanan koleksi. Yang pertama adalah jaminan keamanan fisik, dan yang kedua berkaitan dengan tanggung jawab etis dan menurut hukum dari penjaga/pemelihara koleksi.

Keamanan fisik

Agar keamanan fisik koleksi herbarium terjamin, maka dianjurkan agar koleksi tersebut tidak terbuka untuk umum. Koleksi hendaknya disimpan di dalam gedung yang aman dan tahan cuaca buruk, sebaiknya dikelilingi pagar yang dapat dikunci dan diawasi penjaga keamanan pada malam hari.

Spesimen herbarium sebaiknya disimpan pada rak besi yang kuat atau di dalam lemari besi. Herbarium hendaknya dilengkapi dengan sistem pemadam kebakaran yang otomatis, sebaiknya gas, karena air dapat menyebabkan banyak kerusakan seperti halnya api pada spesimen herbarium kering. Alat pemadam kebakaran kecil hendaknya juga ditempatkan di seluruh gedung, dan petugas perlu dilatih untuk menggunakan alat tersebut.

Keamanan data juga penting. Data yang disimpan dalam format elektronik, seperti *spreadsheets* dan pangkalan data, perlu dibuat duplikatnya secara teratur (setiap hari). Program pangkalan data yang canggih seperti KE EMu (dibahas lebih lengkap dalam Bab 8) dapat mengontrol kemampuan pengguna tertentu untuk melihat data dan menyunting catatan.

Tanggung jawab etis dan menurut hukum

Setiap lembaga yang memelihara koleksi yang berharga bagi komunitas ilmiah mempunyai tanggung jawab etis dan menurut hukum guna menjamin bahwa koleksi yang berada dalam perawatannya dilindungi, aman, dirawat, dan diawetkan. Oleh karena itu, sangatlah penting bagi institusi tersebut untuk memperkecil penggunaan teknik yang tidak ilmiah, kondisi lingkungan yang jelek, dan penanganan yang buruk, guna melindungi spesimen untuk keperluan saat ini dan yang akan datang.

Lembaga yang bertanggungjawab terhadap koleksi hendaknya mengembangkan kebijaksanaan dan prosedur yang memberikan kerangka kerja tertulis untuk pengelolaan koleksi, perawatan, dan penggunaannya. Sangatlah penting bagi lembaga tersebut untuk menyediakan sumberdaya, termasuk staf teknisi dan staf profesional yang handal, dana, serta ruangan dan peralatan yang memadai, untuk keperluan penyimpanan jangka panjang dan dokumentasi koleksi yang berada dalam rawatannya. Dalam beberapa kasus, nilai koleksi penyakit tanaman telah diakui oleh pemerintah yang telah membuat undang-undang khusus untuk melindungi koleksi. Contohnya, herbarium DAR di New South Wales, Australia, dilindungi dengan Agricultural Scientific Collections Trust Act 1983.

10 DAFTAR PUSTAKA PILIHAN

Umum

- Crop Protection Compendium*. 2004. CAB International, Wallingford, UK.
- Disease Compendium Series*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Greuter, W., McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Filgueiras, T.S., Nicolson, D.H., Silva, P.C., Skog, J.E., Trehane, P., Turland, N.J. & Hawksworth, D.L. 2000. *International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code)*. *Regnum Vegetabile*, **138**. Koeltz Scientific Books, Germany.
- Holiday, P. 2001. *A Dictionary of Plant Pathology*. Edisi 2. Cambridge University Press, UK.
- Holmgren, P.K., Holmgren, N.H. & Barnett, L.C. (editor) 1990. *Index Herbariorum. Part 1: The Herbaria of the World*. Edisi 8. *Regnum Vegetabile*, **120**. New York Botanical Garden, USA.
- Ploetz, R.C. 2003. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Walker, J. 1975. Mutual Responsibilities of Taxonomic Mycology and Plant Pathology. *Annual Review of Phytopathology*, **13**: 335 – 355.
- Waller, J.M., Lenné, J.M. & Waller, S.J. (editor) 2002. *Plant Pathologist's Pocketbook*. Edisi 3. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Waller, J.M., Ritchie, B.J. & Holderness, M. 1998. *Plant Clinic Handbook*. IMI Technical Handbook No. 3. CAB International, Wallingford, UK.

Bakteri

- Bradbury, J.F. & Sadler, G.S. 1997. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. Edisi 2. CAB International Mycological Institute, Surrey, UK.
- Fahy, P.C. & Persley, G.J. 1983. *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Academic Press, Sydney, Australia.
- Goto, M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, USA.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Edisi 3. APS Press, St Paul, Minnesota, USA.
- Swings, J.G. & Civerolo, E.L. 1993. *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, UK.

Jamur

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Edisi 5. Elsevier Academic Press, USA.
- Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. & Sussman, A.S. 1973. *The Fungi. An Advanced Treatise*. Vols. IVA, IVB. Academic Press, New York, USA.
- Arx, J.A. von. 1981. *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. Edisi 3. J. Cramer, Lehre, Germany.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Edisi 4. APS Press, St Paul, Minnesota, USA.
- Barron, G.L. 1968. *The Genera of Hyphomycetes from Soil*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA.
- Boerema, G.H., de Gruyter, J., Noordeloos, M.E. & Hamers, M.E.C. 2004. *Phoma Identification Manual*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Braun, U. 1987. A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Nova Hedwigia* **89**.
- Braun, U. 1995. *A Monograph of Cercospora, Ramularia and Allied Genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. Vol. 1. IHW-Verlag, München, Germany.
- Braun, U. 1998. *A Monograph of Cercospora, Ramularia and Allied Genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. Vol. 2. IHW-Verlag, München, Germany.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. & Backhouse, D. 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. Edisi 3. Fusarium Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney, Australia.
- Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Connors, I.L. & Sigler, L. 1980. *Genera of Hyphomycetes*. University of Alberta Press, Edmonton, Canada.
- Crous, P.W. & Braun, U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. *CBS Biodiversity Series 1*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Cummins, G.B. & Hiratsuka, Y. 2003. *Illustrated Genera of Rust Fungi*. Edisi 3. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.-H. 1993. *Compendium of Soil Fungi*. Vol. I, II. Academic Press, New York, USA.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, UK.
- Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, UK.
- Ellis, M.B. & Ellis, J.P. 1997. *Microfungi on Land Plants*. Richmond, London, UK.
- Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

- Hansford, C.G. 1961. The Meliolineae. *Sydowia*, Beih. **2**:1-806.
- Hansford, C.G. 1963. Iconographia meliolarum. *Sydowia*, Beih. **5**: pls. I-CCLXXXV.
- Hawksworth, D.L. 1974. *Mycologist's Handbook*. Commonwealth Agricultural Bureaux, UK.
- Hughes, S.J. 1976. Sooty moulds. *Mycologia* **68**:693-820.
- Index of Fungi*. CAB International, Mycological Institute, Surrey, UK.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A. (editor) 2001. *Dictionary of the Fungi*. Edisi 9. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G. & Lemke, P.A. 2001. *The Mycota*. Vol. VII. Systematics and Evolution. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Mueller, G.M., Bills, G.F. & Foster, M.S. (editor) 2004. *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier, Academic Press, USA.
- Nag Raj, T.R. 1993. *Coelomycetous Anamorphs with Appendage-Bearing Conidia*. Mycologue Publications, Waterloo, Canada.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. 1999. *Fungi and Food Spoilage*. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Rossmann, A.Y., Palm, M.E. & Spielman, L.J. 1987. *A Literature Guide for the Identification of Plant Pathogenic Fungi*. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.
- Sivanesan, A. 1984. *The Bitunicate Ascomycetes and their Anamorphs*. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein.
- Spencer, D.M. 1981. *The Downy Mildews*. Academic Press, London, UK.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes*. CMI, Kew, UK.
- Smith, D. & Onions, A.H.S. 1994. *The Preservation and Maintenance of Living Fungi*. Edisi 2. IMI Technical Handbook No. 1. CAB International, Wallingford, UK.
- Vánky, K. 2002. *Illustrated Genera of Smut Fungi*. Edisi 2. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- White, J.F., Bacon, C.W., Hywel-Jones, N.L. & Spatafora, J.W. 2003. Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts. *Mycology Series 19*. Marcel Dekker, New York, USA.
- Wingfield, M.J., Seifert, K.A. & Webber, J.F. 1999. *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Nematoda

- Anon. 2005. *Interactive Diagnostic Key to Plant Parasitic, Freelifing and Predaceous Nematodes*. University of Nebraska - Lincoln Nematology Laboratory, <http://nematode.unl.edu/key/nemakey.htm>
- Bell, M. 2004. *Plant Parasitic Nematodes: Lucid key to 30 Genera of Plant Parasitic Nematodes*. <http://www.lucidcentral.com/keys/nematodes/>
- Eisenback, J.D. 2002. *Identification Guides for the Most Common Genera of Plant-Parasitic Nematodes*. Mactode Publications, Blacksburg, USA.
- Hodda, M. 2005. *Key to the Nematodes of Australia*. <http://www.ento.csiro.au/science/nematode.html>
- Hunt, D.J. 1993. *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae : Their Systematics and Bionomics*. CAB International, Wallingford, UK.
- Nickle, W.R. 1991. *Manual of Agricultural Nematology*. M. Dekker, New York, USA.
- Nobbs, J.M. 2004. *Plant Parasitic Nematodes of Australia* [CD]. South Australian Research and Development Institute, Adelaide. (available from nobbs.jackie@saugov.sa.gov.au)
- Shurtleff, M.C & Averre, C.W. 2000. *Diagnosing plant diseases caused by nematodes*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Siddiqi, M.R. 2000. *Tylenchida: Parasites of Plants and Insects*. CABI Publications, Wallingford, UK.
- Stirling, G.R., Nicol, J. & Reay, F. 1999. *Advisory Services for Nematode Pests: Operational Guidelines*. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, ACT, Australia. viii, 111 p. (<http://www.rirdc.gov.au/reports/Ras/99-41.pdf>)

Fitoplasma

- Whitcomb, R.F. & Tully, J.G. (editor). 1989. *The Mycoplasmas*. Vol. 5. Academic Press, New York.

Virus

- Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A. & Watson, L. 1996. *Viruses of Plants: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. Academic Press, London, UK.