

Isolasi, karakterisasi, dan uji stabilitas pH bakteriofag *Xanthomonas oryzae* dari area persawahan

Isolation, Characterization, and pH stability test of bacteriophages *Xanthomonas oryzae* from paddy fields

Desy Mar'atul Fadlilah, Andre Wijaya Setiawan, Yoga Aji Handoko*

Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture and Business, Satya Wacana Christian University, Salatiga, Indonesia

ARTICLE INFO

Article History

Received: February 16, 2022

Accepted: April 10, 2022

Available Online: April 25, 2022

Keywords:

bacteriophage,
bacterial leaf blight,
Xanthomonas oryzae,
pH stability

Cite this:

J. Ilm. Pertan., 2022, 19 (2) 118-125

DOI:

<https://doi.org/10.31849/jip.v19i2.9417>

ABSTRACT

The efforts to increase paddy yields are integrated with disease control. Bacterial Leaf Blight (BLB) is a disease that attacks paddy plants caused by *Xanthomonas oryzae* bacteria. So far, the control carried out by farmers is by spraying bactericides, planting disease-resistant varieties, and rotating plants that are not pathogenic hosts. However, this method of controlling has not obtained satisfactory results. Therefore, we need an alternative option in overcoming BLB disease, namely using bacteriophages as biocontrol agents in infecting *Xanthomonas oryzae* bacteria. This study explored the potential of bacteriophages isolated from soil samples near paddy plants' root areas and tested their particle's stability. The stages of experiments were soil sampling, isolation, purification, propagation, and pH stability examination. The results showed that the bacteriophage *Xanthomonas oryzae* had been isolated, purified, and propagated with the coding Kalibening 1 (XB1), Kalibening (XB2), and Kalibening 3 (XB3). The results of the pH stability test on the three samples also showed that the bacteriophage *Xanthomonas oryzae* experienced particle instability and the titer tended to drop in the pH range of 3-5, while the bacteriophage *Xanthomonas oryzae* tended to be stable at neutral and alkaline pH 7-11, particularly XB1 and XB2 phages.

ABSTRAK

Salah satu upaya dalam peningkatan hasil panen padi adalah mengendalikan penyakit secara terpadu. Hawar Daun Bakteri (HDB) merupakan salah satu penyakit yang menyerang tanaman padi yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae*. Selama ini pengendalian yang dilakukan petani dengan menyemprotkan bakterisida, menanam varietas yang tahan penyakit, pergiliran tanaman yang bukan inang patogen. Namun, cara pengendalian tersebut belum mendapatkan hasil yang memuaskan. Oleh karena itu, diperlukan suatu pilihan alternatif dalam mengatasi penyakit HDB yaitu memanfaatkan bakteriofag sebagai agen biokontrol dalam menginfeksi bakteri *Xanthomonas oryzae*. Penelitian ini mengeksplorasi potensi bakteriofag *Xanthomonas oryzae* yang diisolasi dari sampel tanah dekat area perakaran tanaman padi dan menguji stabilitas partikelnya. Tahapan eksperimen meliputi: pengambilan sampel tanah, isolasi, purifikasi, propagasi dan uji stabilitas pH. Hasil penelitian menunjukkan bahwa telah berhasil diisolasi, dimurnikan, dan dipropagasi bakteriofag *Xanthomonas oryzae* yang diberi koding Kalibening 1 (XB1), Kalibening (XB2) dan Kalibening 3 (XB3). Hasil penelitian uji stabilitas pH pada ketiga sampel juga menunjukkan bahwa bakteriofag *Xanthomonas oryzae* mengalami ketidakstabilan partikelnya dan titernya cenderung turun dalam kisaran pH 3-5, sedangkan bakteriofag *Xanthomonas oryzae* cenderung stabil partikelnya pada pH netral dan basa 7-11, khususnya bakteriofag XB1 dan XB2

*Corresponding author

E-mail: yoga.handoko@uksw.edu

PENDAHULUAN

Xanthomonas oryzae merupakan bakteri gram negatif yang menyebabkan penyakit stadium pertumbuhan tanaman padi. Penyakit hawar daun bakteri (HDB) dapat menyerang tanaman padi pada fase benih, bibit, tanaman muda, serta menjelang panen. Penyebaran penyakit ini dapat berlangsung secara cepat melalui gesekan antar daun, terbawa angin, dan air, seperti genangan lahan, percikan air hujan, dan saluran irigasi (Ovy, 2016). *Xanthomonas oryzae* juga dapat ditularkan melalui benih (Swing et al., 1990).

Berbagai cara telah dilakukan untuk mengendalikan penyakit HDB, seperti mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae*, di antaranya dengan aplikasi bakterisida sintetis atau dengan penanaman padi varietas tahan HDB dalam rangka meningkatkan bobot hasil, namun upaya ini belum sepenuhnya berhasil (Ji et al., 2018). Penelitian yang juga sudah dilakukan dalam mengendalikan HDB adalah dengan bakteriofag *Xanthomonas oryzae* di antaranya yaitu pengendalian penyakit HDB pada tanaman padi dengan menggunakan fungi mikoriza. Pemberian fungi mikoriza arbuskular (FMA) sebanyak 20 g per tanaman mampu memperpanjang masa inkubasi *Xanthomonas oryzae*, menekan perkembangan lesio, dan intensitas penyakit hawar daun padi (Yanti et al., 2018). Namun, cara tersebut belum memberikan hasil yang memuaskan karena terdapat keragaman strain *Xanthomonas oryzae*. Dari proses pengendalian yang belum tuntas tersebut, maka diperlukan suatu solusi alternatif dalam mengatasi penyakit HDB yaitu memanfaatkan bakteriofag *Xanthomonas oryzae* sebagai predator alami.

Bakteriofag merupakan virus secara spesifik yang menginfeksi atau dapat mematikan spesies bakteri tertentu dalam waktu yang singkat dan rentang infeksi hanya terhadap beberapa spesies. Menurut Chae et al. (2014) melaporkan bahwa 3 spesies bakteriofag *Xanthomonas oryzae* diketahui mempunyai gen lisis yang kuat terhadap HDB. Weng et al. (2018) juga melaporkan kemampuan bakteriofag *Xanthomonas oryzae* dalam mengendalikan bakteri secara efektif, serta Ranjani et al. (2018) berhasil mengungkapkan sifat sensitivitas dan kemampuan propagasi eksponensial bakteriofag *Xanthomonas oryzae*. Pengujian efektivitas bakteriofag ini menunjukkan hasil yang optimum setelah dilakukan pengujian stabilitas partikelnya. Berdasarkan hasil-hasil riset tersebut perlu adanya alternatif solusi atau terobosan untuk mengendalikan patogen penyakit HDB, dengan mencari musuh alami dari *Xanthomonas oryzae* yaitu virus bakteri. Bakteriofag *Xanthomonas oryzae* telah dipertimbangkan sebagai biokontrol untuk menginfeksi *Xanthomonas oryzae* di lapangan (Lee et al., 2007). Penelitian ini memiliki batasan dan tujuan melakukan isolasi, purifikasi, propagasi bakteriofag dari lahan sawah Kelurahan Kalibening, Kecamatan Tingkir, Kota Salatiga dan menguji stabilitas partikelnya terhadap pH, sedangkan inovasi pengaplikasian agen biokontrol *Xanthomonas oryzae* dapat dilakukan pada tahap penelitian berikutnya.

METODE PENELITIAN

Lokasi penelitian

Penelitian dilaksanakan di lahan persawahan yang terletak pada koordinat 7°20.8430'S 110°31.1030'E di Kelurahan Kalibening, Kecamatan Tingkir, Kota Salatiga serta Laboratorium Mikrobiologi Pertanian, Universitas Kristen Satya Wacana.

Bahan

Bahan utama penelitian yang digunakan meliputi: medium NA (Nutrient Agar), NB (Nutrient Broth), Nutrient Soft Agar 0.55%, isolat bakteri *Xanthomonas oryzae* diperoleh dari Indonesian Culture Collection (InaCC, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia) dengan kode InaCC B16, *SM buffer*, HCl 0.1M, serta NaOH 0.1M.

Pengambilan sampel tanah

Sampel yang diprediksi terdapat bakteriofag diambil dalam kondisi tanah berlumpur, namun tidak tergenang air, kondisi cuaca memasuki musim hujan. Sampel tanah diambil dari lahan sawah tanaman padi di Kelurahan Kalibening Kecamatan Tingkir, Kota Salatiga. Pengambilan sampel tanah dilakukan pada pagi hari pukul 05:00-08:00. Tanah diambil empat titik

pada pola transek sepanjang 100 meter pada satu petak sawah, kemudian dicampur dari beberapa bagian menjadi satu bagian. Sampel tanah kemudian dibawa di laboratorium, di-*shaker* selama 2 jam, kemudian disentrifugasi selama 15 menit, sampel disaring hingga jernih dengan menggunakan membran filter ukuran 0.22 µm untuk memisahkan bakteri dan bakteriofag. Supernatan sebagai lysat kemudian dipindahkan dalam tabung falcon steril dan disimpan dalam referigator pada suhu 4°C.

Isolasi bakteriofag Xanthomonas oryzae

Isolasi bakteriofag *Xanthomonas oryzae* menggunakan metode *spot test* (Ranjani et al., 2018). Prosedur isolasinya diawali dengan menuang medium NA pada cawan petri hingga memadat. Selanjutnya, sebanyak 5000 µl medium NB *soft agar* dicampur dengan 100 µl bakteri *Xanthomonas oryzae* dengan densitas selnya antara 0.30-0.39 pada gelombang 600 nm. Kemudian campuran *soft agar* dan bakteri *Xanthomonas oryzae* tersebut dituang dalam medium NA yang sudah memadat (*double-layer agar*). Sebanyak 100 µl sampel lysat diteteskan secara terpisah pada permukaan *double layer agar* tersebut dan diinkubasi dalam enkas selama 24 jam. *Plaque* yang tampak sebagai zona bening menjadi indikator bakteriofag berhasil diisolasi.

Purifikasi bakteriofag Xanthomonas oryzae

Purifikasi atau tahap pemurnian dilakukan untuk mendapatkan *single plaque* yang seragam (Ranjani et al., 2018). Prosedurnya yaitu dengan mengambil *plaque* hasil isolasi dengan cara mencuplik *plaque* menggunakan mikropipet. *Plaque* kemudian dimasukkan dalam larutan *SM buffer* 200 µl pada *microtube* steril. *Plaque* tersuspensi tersebut ditambahkan kultur bakteri *Xanthomonas oryzae* sebanyak 100 µl dan diinkubasi selama 45 menit. Pengujian purifikasi menggunakan metode *plaque assay* dengan menuangkan medium NA sebanyak 5 mL pada cawan petri hingga memadat. Masing-masing sampel (*plaque* tersuspensi) kemudian ditambahkan NB *soft agar* sebanyak 5,000 µl dan dituangkan pada medium NA (*double-layer agar*). Sampel selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Hasil purifikasi ditentukan dengan diperolehnya *plaque* yang berukuran seragam.

Propagasi bakteriofag Xanthomonas oryzae

Propagasi atau perbanyakan *plaque* adalah kemampuan bakteriofag untuk melipatgandakan jumlah partikelnya dan indikator efektivitas virus yang menyerang bakteriofag. Propagasi dalam penelitian ini diadaptasi dari penelitian yang dilakukan Sambrook et al. (1989) dengan menyiapkan medium cair NB, kultur *Xanthomonas oryzae* dengan densitas sel antara 0.30-0.39 pada panjang gelombang 600 nm, dan *plaque* bakteriofag yang telah disuspensi dalam 1,000 µl *SM buffer* dari hasil purifikasi. Suspensi dari masing-masing sampel dicampur dengan 2.000 µl kultur *Xanthomonas oryzae* secara terpisah. Sampel kemudian diinkubasi selama 48 jam, kemudian masing-masing sampel disentrifugasi untuk memperoleh lysat sebagai hasil propagasi. Prosedur pengujian keberhasilan propagasi diawali dengan menyiapkan seri pengenceran medium NB mulai 10¹ hingga 10¹⁰ dalam *microtube* yang masing-masing diisi 900 µl medium NB. Sebanyak 100 µl masing-masing lysat dimasukkan dalam medium NB seri pengenceran 10¹ dan dihomogenisasi. Sebanyak 100 µl seri pengenceran 10¹ kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam medium NB seri pengenceran 10² dan dihomogenkan kembali. Prosedur ini dilakukan hingga seri pengenceran 10¹⁰. Masing-masing sampel dari seri pengenceran kemudian diambil 50 µl dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah berisi 500 µl kultur *Xanthomonas oryzae*, serta didiamkan selama 45 menit. Masing-masing sampel kemudian dicampur dengan medium NB *soft agar* sebanyak 5 ml dan dituang dalam cawan petri yang telah berisi medium NA padat. Titer bakteriofag sebagai hasil propagasi dilakukan dengan menghitung *plaque* yang terbentuk di permukaan yang dinyatakan dalam *Plaque Form Units* (PFU/mL). Rumus titer bakteriofag adalah sesuai Phage hunting protocols (2013).

$$\text{Titer bakteriofag} = \frac{\text{jumlah plaque}}{50 \mu\text{L}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \times \text{faktor pengenceran} \quad (1)$$

*Uji stabilitas pH bakteriofag *Xanthomonas oryzae**

Pengujian stabilitas bakteriofag *Xanthomonas oryzae* terhadap pH ditentukan pada pH 3, 5, 7, 9 dan 11 dengan modifikasi metode yang dikembangkan Czajkowski et al. (2014). Prosedur uji stabilitas dilakukan dengan menyiapkan 250 µl lysat bertiter tinggi dalam *microtube* secara terpisah dari masing-masing sampel yang dikondisikan pada pH 7, 3, dan 5 dengan penambahan HCl 0.1 M untuk perlakuan asam, serta pH 9 dan 11 dengan penambahan NaOH 0.1 M untuk perlakuan basa. Masing-masing sampel yang telah diberi perlakuan pH kemudian diinkubasi selama 60 menit kemudian di-*plating*, serta diamati respon pembentukan *plaque*-nya dengan metode *double-layer agar* setelah 24 jam masa inkubasi, seperti prosedur purifikasi atau propagasi di atas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

*Isolasi bakteriofag *Xanthomonas oryzae**

Prinsip keberhasilan isolasi adalah bakteriofag mampu melakukan infeksi sel bakteri sebagai inang. Hasil isolasi bakteriofag *Xanthomonas oryzae* yang dilakukan dengan metode *spot test* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Isolasi bakteriofag *Xanthomonas oryzae* (XB1 Kalibening 1; XB2 Kalibening 2; dan XB3 Kalibening 3)

Keterangan :

- = *plaque sebagai bakteriofag yang melisis *Xanthomonas oryzae**
- ➔ = *Zona pertumbuhan *Xanthomonas oryzae**

Sampel XB1, XB2 dan XB3 yang dapat dilihat pada Gambar 1 menunjukkan *plaque* yang dinyatakan sebagai zona bening, yang mengindikasikan bahwa sel bakteri lisis oleh agen virus-bakteri (bakteriofag *Xanthomonas oryzae*). Isolasi bakteriofag dengan menggunakan metode *plaque assay* (Adam, 1959) dan *double-layer agar* telah berhasil diterapkan untuk mengisolasi bakteriofag *Xanthomonas oryzae* dari sampel tanah sawah di Desa Kalibening. Menurut Gallet et al. (2011), salah satu faktor yang mempengaruhi karakteristik *plaque* adalah laju adsorpsi materi genetik virus ke dalam sel inang. Selain itu, ukuran dan jumlah *plaque* dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yang berbeda. Jumlah *plaque* yang dihasilkan oleh partikel bakteriofag tergantung pada spesies bakteriofag, dimana masing-masing spesies menghasilkan progeni dalam jumlah yang berbeda-beda.

*Purifikasi bakteriofag *Xanthomonas oryzae**

Tahap purifikasi berfungsi untuk mendapatkan *single plaque* yang murni dari bakteriofag. Menurut Haq et al. (2012), tujuan purifikasi yaitu meminimalisasi terjadinya kontaminasi. Modifikasi metode purifikasi yang dilakukan yaitu dengan mengambil satu *plaque* dari bentuk spesies yang sejenis, kemudian di-*plating* untuk memastikan bakteriofag yang murni. Menurut Adam (1959), *plaque* yang terbentuk kemudian dimurnikan dengan teknik *single plaque* dari hasil isolasi dan ditentukan konsentrasi bakteriofag atau titernya melalui propagasi. Hasil purifikasi ke-tiga sampel XB1, XB2 dan XB3 yang diambil dari *plaque* isolasi bakteri menampakkan indikasi adanya *plaque* menunjukkan *single plaque* yang murni. Tabel 1 dan Gambar 2 merupakan hasil pengujian purifikasi *Xanthomonas oryzae*.

Tabel 1. Karakteristik *plaque* hasil purifikasi

Sampel	Karakteristik <i>Plaque</i>	
	Type	Jumlah <i>Plaque</i>
XB1	<i>Single plaque</i>	126
XB2	<i>Single plaque</i>	63
XB3	<i>Single plaque</i>	141

**Gambar 2.** Hasil Purifikasi Bakteriofag XB1, XB2, dan XB3

Propagasi bakteriofag Xanthomonas oryzae

Perbanyakan bakteriofag *Xanthomonas oryzae* merupakan tahap perbanyakan *plaque* serta membuktikan efektivitas kemampuan virus untuk tumbuh dan menyerang bakteri. Fungsi dari propagasi adalah dapat digunakan untuk mengamati morfologi bakteriofag, menguji sifat fungsional, serta menentukan struktur dan kemampuan molekuler materi genetiknya. Seri pengenceran dilakukan bertujuan memprediksi jumlah *plaque* dalam satu larutan tertentu. Pengujian hasil propagasi dibuat seri pengenceran (*df= dilution factor*) pada 10^8 dari hasil propagasi disajikan pada Tabel 2.

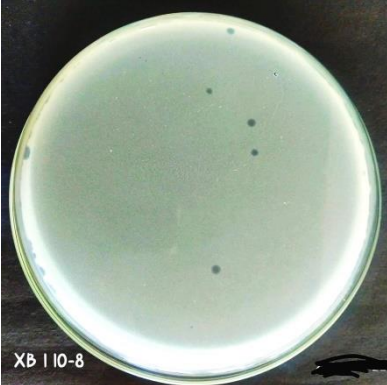
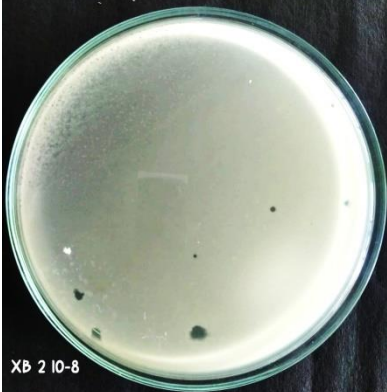
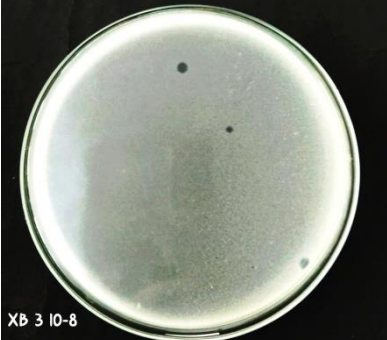
Ketiga sampel XB1, XB2, dan XB3 yang ditunjukkan pada Tabel 2, menunjukkan bahwa ketiga sampel tersebut dapat dipropagasi melalui seri pengenceran 10^1 hingga 10^8 . Gambar yang ditampilkan pada Tabel 2 adalah hasil propagasi dari *plating* seri pengenceran pada 10^8 . Berdasarkan hasil uji propagasi tersebut, ketiga sampel yang dikoding XB1, XB2 dan XB3 menunjukkan jumlah titer bakteriofag pada seri pengenceran 10^8 masih menunjukkan adanya kemampuan infeksi terhadap sel bakteri. Hasil ini berarti bahwa bakteriofag pada ketiga sampel sangat kuat. Menurut Madigan et al., (2012), variasi titer bakteriofag disebabkan oleh sistem pertahanan bakteri terhadap infeksi bakteriofag dan sifat yang dimiliki bakteriofag. Perlakuan pengenceran juga berkaitan respon partikel bakteriofag terhadap sel bakteri. Semakin tinggi titer bakteriofag dalam suatu deret seri pengenceran, maka semakin rendah infeksi bakteriofag. Ketidakmampuan bakteriofag dalam melisis sel inangnya juga dapat terjadi karena adanya perbedaan kondisi lingkungan, pertumbuhan inang yang lebih cepat, sistem pertahanan terhadap infeksi bakteriofag secara alami. Jumlah *plaque* juga dipengaruhi oleh spesifitas bakteri itu sendiri. Rahaju (2014) menyatakan bahwa semakin banyak jumlah *plaque*, maka semakin tinggi konsentrasi bakteriofag dalam sampel. Hasil propagasi ini dapat digunakan tahapan karakterisasi fungsional bakteriofag *Xanthomonas oryzae* melalui uji stabilitas pH.

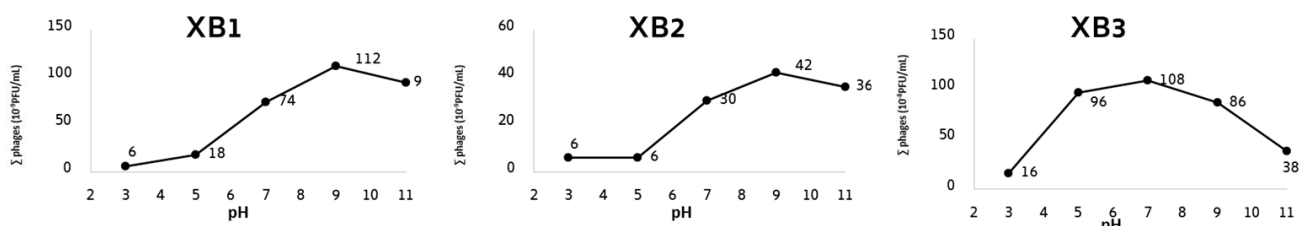
Uji stabilitas pH bakteriofag Xanthomonas oryzae

Stabilitas bakteriofag yang dilakukan yaitu menguji ketahanan partikelnya terhadap pH, yang diharapkan sampel lysis yang diperoleh mampu menjadi biokontrol yang baik terhadap *Xanthomonas oryzae* pada lahan sawah tanaman padi yang dinamika pH asam maupun basa yang dapat berubah di setiap waktu. Pengujian pengaruh pH yang berbeda, dalam kelangsungan hidup bakteriofag yang diisolasi diperlukan sebelum penerapan bakteriofag di lapangan. Pengaruh pH

terhadap penurunan aktivitas bakteriofag adalah penghambatan proses penempelan, pembentukan agregat partikel, dan penempelan partikel *plaque* pada media (Taj et al. 2014), selain itu perbedaan pH ditentukan oleh komposisi kimia dalam buffer.

Tabel 2. Propagasi bakteriofag XB1, XB2, dan XB3

Kode Sampel Bakteriofag	Tampilan <i>Plaque</i>	Jumlah <i>Plaque</i>	<i>Plaque Titer</i> (PFU/mL)
XB1		6	14.10^9
XB2		8	12.10^9
XB3		4	6.10^9



Gambar 3. Uji stabilitas pH bakteriofag XB1, XB2, dan XB3

Berdasarkan penelitian, Gambar 3 memperlihatkan pengujian stabilitas pH 3 hingga pH 11 pada sampel XB1, XB2 dan XB3. Stabilitas pH 3 ditunjukkan titer *Xanthomonas oryzae* rendah pada ketiga sampel. Sampel XB1 dan XB2 titer menunjukkan *Xanthomonas oryzae* optimum pada pH 7 dan pH 9, pada pH 11 titer *Xanthomonas oryzae* menurun. Sedangkan pada sampel XB3 titer menunjukkan bahwa *Xanthomonas oryzae* optimum pada pH 5, 7 dan 9, sedangkan pada pH 11 rendah. Penelitian Jurczak- Kurek (2016), menyatakan bahwa 80 dari 83 sampel lysat optimum pada pH 10, sementara banyaknya titer *Xanthomonas oryzae* cukup tinggi pada pH 12 berjumlah 48 sampel dari 83 sampel lysat yang diinfeksi optimum pada pH 7 dan pertumbuhan maksimal pada pH 9. Hal tersebut berarti bahwa bakteriofag tidak tahan kondisi asam pada rentang pH 3-5, sedangkan ketiga sampel memiliki kestabilan partikelnya pada pH netral (7). Dari ketiga lysat sampel XB1 dan XB2 dapat diaplikasikan sebagai biokontrol pada kondisi di atas pH 7.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa telah berhasil diisolasi bakteriofag *Xanthomonas oryzae* dari lahan persawahan Kelurahan Kalibening Kecamatan Tingkir Kota Salatiga yang secara konsisten dapat menginfeksi dan melisis sel bakteri *Xanthomonas oryzae* dengan koding sampel XB1, XB2, dan XB3. Pengujian stabilitas partikel bakteriofag terhadap pH menunjukkan bahwa bakteriofag *Xanthomonas oryzae* XB1, XB2, XB3 mengalami ketidakstabilan dan titernya cenderung turun dalam kisaran pH 3-5, sedangkan bakteriofag *Xanthomonas oryzae* cenderung stabil partikelnya pada pH netral dan basa 7-11.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M. H. (1959). *Bacteriophage*. Interscience in Publishers. Inc. New York.
- Czajkowski, R., Ozymko, Z., & Lojkowska. (2014). Isolation and characterization of novel soilborne lytic bacteriophages infecting *Dickeya* spp. biovar 3 ('D. solani'). *Journal Plant Pathology*, 63, 758–772. <https://doi.org/10.1111/ppa.12157>
- Chae, Jong-Chan, Hung, B. Y., Yu, Sang-Mi, Ha, Kyung-Lee, & Lee, Y. H. (2014). Diversity of bacteriophages infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in paddy fields and its potential to control bacterial leaf blight of rice. *Journal of Microbiology And Biotechnology*, 24(6), 740–747. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1402.02013>
- Erfandari, O. (2016). *Pengendalian penyakit hawar daun bakteri patotipe IV dengan bakteri Paenibacillus polymyxa dan Pseudomonas fluorescens pada tanaman padi* [Unpublished Master's Thesis]. Program Pascasarjana Magister Agronomi. Universitas Lampung.
- Gallet, R., Kannoly, S., & Wang, I. N. (2011). Effect of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC Microbiology*, 11, 181. doi: 10.1186/1471-2180-11-181
- Haq, I. U., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophage and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal*, 9(9), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>
- Ji, Z., Wang, C., & Zhao, K. (2018). Rice routes of countering *Xanthomonas oryzae*. *Int. J. Mol. Sci*, 19, 3008, <https://doi.org/10.3390/ijms19103008>
- Jurczak-Kurek, A., Gasior, T., Nejman-Falencyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Necel, A., Jakubowska-Deredas, M., Richert, M., Mieszkowska, A., Wrobel, Borys, Wegrzyn, G, & Wegrzyn, A. (2016). Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phage isolated from urban sewage. *Sci. Rep*, 6, 1-17.
- Lee, C. N., Hu, R. M., Chow, T. Y., Lin, J. W., Chen, H. Y., Tseng, Y. H., & Weng, S. F. (2007). Comparison of genomes of three *Xanthomonas oryzae* bacteriophages. *BMC Genomics*, 8, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-442>
- Madigan, M., Matinko, J., Dunlap P., & Clark, D. (2012). *Brock biology of microorganisms. Thirteenth Edition*. Pearson Benjamin Cummings. San Fransisco.
- Phage hunting protocols. (2013). Phage Titering. The University of Pittsburgh. Pittsburgh. <https://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PDF-Tbox-4titering.pdf>

- Rahaju, S. H. (2014). Metoda pengkayaan, filtrasi, dan pertumbuhan untuk isolasi bakteriofag spesifik *Salmonella typhimurium* pada sampel air. *Jurnal Sains, Teknologi, dan Kesehatan*, 4(1), 315-322.
- Ranjani, P. K., Gowthami, Y., Samuel., Gnanamanickam, S., & Palani, P. (2018). Bacteriophage: a new weapon for the control of bacterial blight disease in rice caused by *Xanthomonas oryzae*. *Journal Microbiology Biotechnology*, 46(4), 346-359. <https://doi.org/10.4014/mbl.1807.07009>
- Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Swing, J., M. Van Den Mooter, L. Vayterin, B. Hoste, M. Gillis, T.W. Mew, & K. Kersters. (1990). Reclassifications of the Causal Agents of Bacterial Blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) of Rice as Pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. *Rev. Int. J. Syst. Bacterial*, 40, 309-311.
- Swing, J., Mooter, V.D., Vauterin, L., Hoste, B., Gillis, M., Mew, T.W., Kerters, K. (1990). Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzaicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp.nov., nom.rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3), 301-311.
- Taj, M.K., Ling, J.X., Bing, L.L., Qi, Z., Taj, I., Hassani, T.M., Samreen, Z., Yunlin, W. (2014). Pengaruh pengenceran suhu dan pH terhadap aktivitas lisis bakteriofag T4 terhadap *E. coli* BL21. *Jurnal Animal Plant Sci*, 24(4), 1252-1255.
- Weng S, -F., Fu Y, -C., Lin J, -W., & Tseng T, -T. (2018). Identification of a broad-spectrum peptidoglycan hydrolase associated with the particle of *Xanthomonas oryzae* phage Xop411. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*, 28(2), 78-86. doi: 10.1159/000488678
- Yanti, S., Marlina., & Fikrinda. (2018). Pengendalian penyakit hawar daun bakteri pada padi sawah menggunakan fungi Mikoriza. *Jurnal Agroeconia*, 1(2), 2621-2846. <https://doi.org/10.22437/agroecotania.v1i2.6337>