

KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS *Bacillus* spp. SEBAGAI AGENSIA PENGENDALIAN HAYATI PENYAKIT LINCAT PADA TEMBAKAU TEMANGGUNG

Triwidodo Arwiyanto, YMS Maryudani, dan Agus Eko Prasetyo

Fakultas Pertanian UGM, Bulasumur-Yogyakarta-55281

ABSTRACT

*Lincat disease of tobacco causing severe losses of the product. Control of the disease with any available measure unlikely giving enough control. A number of *Bacillus* spp. isolates could suppressed the growth of pathogen in vitro and suppressed the development of lincat disease in the field. This article report the characteristics of six isolates of *Bacillus* spp. (Ba-4, Ba-22, Ba-24, Ba-30, Ba-33, dan Ba-41). These isolates proven could suppressed lincat disease in the field. Characterization of the isolates include the morphological, physiological characteristics, and pathogenicity against tobacco plant. The results indicated that the bacterial isolates were belong to the genus *Bacillus* with the following characteristics. The bacteria were rod shapes, forming endospore, Gram positive, fermentative, positive reaction in katalase, oksidase, and Voges Proskauer tests. Negative results were obtained for Methyl Red test, hydrolysis of starch, gelatine, and casein. The present isolates could use citrate and several carbohydrates as carbon sources. Reduce nitrate to nitrite. The isolates could grow in the medium with high osmotic pressure, i.e. could grow in the medium with 7% NaCl. The present isolates grew well in the medium with pH of 4.5–10 and could grow in the temperature range of 10–50 °C. According to pathogenicity test, the present isolates were not belong to the plant pathogenic bacteria. The present isolates could suppressed the growth of *Ralstonia solanacearum* in vitro, and could reduce the egg number of *Meloidogyne incognita*. According to the physiological characteristics tested, it seem that isolates of Ba-4, Ba-24, Ba-30, dan Ba-33, and Ba-41 having similar characteristics with *Bacillus cereus*. The Ba-22 isolate, however, having similar characteristics with *B. licheniformis*.*

Key words: tobacco, *Bacillus*, lincat disease

PENGANTAR

Penyakit lincat pada tembakau temanggung menyebabkan kerugian yang tidak sedikit. Kematian tanaman yang disebabkan oleh penyakit ini mencapai 50% (Dalmadiyo *et al.*, 2000). Berbagai usaha pengendalian telah dilakukan namun belum memberikan hasil yang memuaskan.

Penyakit lincat ini disebabkan oleh interaksi antara bakteri *Ralstonia solanacearum* dan nematoda *Meloidogyne incognita* (Dalmadiyo, 2004). Pengendalian yang dilakukan haruslah ditujukan terhadap kedua patogen tersebut sehingga diperoleh hasil yang memuaskan. Pada tahun 2004, *Bacillus* spp. dari risosfer beberapa tanaman di daerah pertanian tembakau diisolasi kemudian dilakukan seleksi langsung kemampuannya menghambat penyakit lincat di lapangan terhadap isolat yang diperoleh (Arwiyanto *et al.*, 2007). Hasilnya menunjukkan bahwa enam isolat di antaranya mampu menekan patogen *in vitro* dan mampu menekan perkembangan penyakit di lapangan. Karakterisasi fisiologis dan beberapa sifat lainnya perlu dilakukan dalam usaha perbaikan kemampuan isolat yang akan digunakan dalam program pengendalian secara biologis.

Tulisan ini melaporkan sifat-sifat fisiologis dari enam isolat *Bacillus* spp. yang nantinya dapat digunakan sebagai dasar pengembangannya sebagai agensia pengendalian hayati penyakit lincat tembakau temanggung.

BAHAN DAN CARA KERJA

Isolat Bakteri

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi dari Laboratorium Bakteriologi Tumbuhan, Fakultas Pertanian UGM, yang pada penelitian sebelumnya dilaporkan bakteri tersebut mampu menekan penyakit lincat di lapangan, sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Beberapa isolat bakteri untuk menekan penyakit lincat

No	Kode Isolat	Asal Isolat	Tahun Isolasi
1	Ba-4	Cabai	2004
2	Ba-22	Cabai	2004
3	Ba-24	Cabai	2004
4	Ba-30	Cabai	2004
5	Ba-33	Cabai	2004
6	Ba-41	Cabai	2004

Bakteri ditumbuhkan dengan digoreskan pada permukaan medium YPA miring pada suhu kamar (28 °C) selama dua hari sebelum digunakan dalam penelitian.

Isolat *R. solanacearum*

Isolat Rs-13, Rs-16, dan Rs-22 merupakan isolat *R. solanacearum* yang diisolasi dari lahan tembakau di daerah Temanggung pada tahun 2004.

Isolat Bakteri Antagonis Lainnya

Dikarenakan tujuan akhir dari penelitian pengendalian hayati penyakit lincat adalah mendapatkan agen-agen hayati yang kompatibel sehingga dilakukan pula pengujian kompatibilitas antaragen hayati yang diteliti. Isolat agen hayati tersebut adalah *Streptomyces* spp. (Stre-4, Stre-7, Stre-48, Stre-61, Stre-66, dan Stre-67) dan *Pseudomonas fluoresen* (pf22 pf23, pf30, pf42, pf51, dan pf83).

Tanaman

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tembakau varietas klemoko.

CARA KERJA

Pengamatan Sifat Morfologis

Semua isolat *Bacillus* ditumbuhkan secara terpisah pada medium YPA (*Yeast Pepton Agar*) selama 2 hari. Bentuk dan warna koloni diamati secara visual. Pengecatan negatif dilakukan berdasarkan metode Jutono *et al.* (1973) untuk melihat morfologi individu sel. Pewarnaan endospora dan flagela mengikuti metode Schaad (2001).

Pengamatan Sifat Fisiologis, Biokimia, dan Patogenisitas terhadap Tanaman

Pengujian berbagai sifat-sifat fisiologis dan biokimia dilakukan sebagai berikut: pengujian sifat Gram, katalase, uji VP, dan MR (Sands, 1990); oksidatif fermentatif, oksidase, (Hayward, 1994); hidrolisis pati, penggunaan sitrat, pertumbuhan pada berbagai suhu, pH medium, pertumbuhan pada medium yang mengandung berbagai konsentrasi NaCl (Chun dan Vidaver, 2001); hidrolisis kasein, reduksi nitrat (Jutono *et al.*, 1973); hidrolisis gelatin dan penggunaan sumber karbon (Nishiyama dan Ezuka, 1991); uji reaksi hipersensitif, uji patogenisitas (Klement, 1990); pertumbuhan pada berbagai pH media, produksi hidrogen sulfida, hidrolisis eskulin, pertumbuhan pada berbagai suhu inkubasi, pertumbuhan pada 0,1% fenol, toleransi terhadap NaCl, penggunaan sumber nitrogen, hidrolisis gelatin, dan penggunaan sumber karbon

(Nishiyama dan Ezuka, 1991); aktivitas enzim lecithinase (Gordon *et al.*, 1973).

Pengujian Antibiosis terhadap Patogen Lincat dan Pengujian Antagonisme Antaragensia Pengendali Hayati

Pengujian antarisolat bakteri dilakukan seperti yang dilaporkan oleh Arwiyanto *et al.* (2006) sedangkan pengujian penekanan terhadap nematoda oleh *Bacillus* spp. dilakukan seperti yang dilakukan oleh Dropkin (1996) dan Dalmadiyo (2004).

HASIL

Morfologi Bakteri

Koloni *Bacillus* spp. yang diamati berbentuk bulat, berlendir, tepi rata, dan tidak tembus cahaya. Sel bakteri berbentuk batang dengan ukuran sel yang bervariasi (Tabel 2).

Tabel 2. Dimensi sel *Bacillus* spp.

No	Kode Isolat	Panjang (μm)	Lebar (μm)
1	Ba-4	2-5	0,7-1,2
2	Ba-22	2-3	0,6-1,0
3	Ba-24	3-5	0,8-1,2
4	Ba-30	2-4	0,7-1,1
5	Ba-33	3-5	0,8-1,2
6	Ba-41	2,5-4	0,7-1,1

Semua isolat membentuk endospora. Pewarnaan dengan *malachite green* memperlihatkan endospora berwarna hijau dengan sel vegetatif berwarna merah. Endospora berbentuk elips dengan posisi berada di tengah sel atau di dekat ujung sel.

Sifat Fisiologi dan Biokimia

Semua isolat yang diuji menunjukkan sifat Gram positif, mampu tumbuh pada kondisi oksigen berkecukupan maupun dalam kondisi oksigen terbatas, bentuk batang, dan membentuk endospora. Enzim katalase dibentuk oleh semua isolat, uji VP positif sedangkan uji MR negatif yang berarti semua isolat mampu membentuk asam dari glukosa namun pH yang terbentuk tidak mencapai 4,2. Sitokrom oksidase dibentuk oleh semua isolat, hidrolisis pati dan kasein positif, sebagian besar menghidrolisis gelatin (kecuali isolat Ba-41), sitrat digunakan oleh semua isolat sebagai sumber karbon, nitrat dapat direduksi menjadi nitrit. Beberapa senyawa karbohidrat dapat digunakan sebagai sumber karbon yaitu glukosa, maltosa, laktosa,

Tabel 3. Karakteristik isolat *Bacillus* spp. yang diuji

Karakteristik	Ba-4	Ba-22	Ba-24	Ba-30	Ba-33	Ba-41	B. cereus*	B. licheniformis*
<i>Ukuran sel:</i>								
Panjang	2-5	2-3	3-5	2-4	3-5	2,5-4	3-5	1,5-3
Lebar	0,7-1,2	0,6-1,0	0,8-1,2	0,7-1,1	0,8-1,2	0,7-1,1	1,0-1,2	0,6-0,8
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilitas	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Letak spora</i>								
Terminal	-	-	-	-	-	-	-	-
Sub terminal	-	-	-	-	-	-	-	-
Sentral	+	+	+	+	+	+	+	+
Penggunaan sitrat	+	+	+	+	+	+	+	+
Uji VP	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrolisis pati	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Asam dan gas dari glukosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Reduksi nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+
Dekomposisi kasein	+	+	+	+	+	+	+	+
Asam dari glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Suhu pertumbuhan:</i>								
Maksimum	40-50	50-60	40-50	40-50	40-50	40-50	35-45	50-55
Minimum	10-20	10-20	10-20	10-20	10-20	10-20	10-20	15
<i>Pertumbuhan pada:</i>								
Media pH < 6	+	+	+	+	+	+	+	+
Media + NaCl 7%	+	+	+	+	+	+	+	+
Kondisi anaerob	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan:

* data diambil dari Slepecky and Hemphill (1991) dan Chun and Vidaver (2001)

sukrosa, amilum, manitol, sorbitol, dan myoinositol. Suhu minimum untuk pertumbuhan berkisar dari 10 °C sampai 20 °C sedangkan suhu optimum antara 30-40 °C. Suhu maksimum berbeda-beda tiap isolatnya. Ba-22 dan Ba-33 mampu tumbuh pada suhu 80 °C. Semua isolat mampu tumbuh pada medium yang mengandung 7% NaCl. pH optimum untuk pertumbuhan adalah 6,5-7,5 sedangkan pH minimum 4,5 dan pH maksimum untuk pertumbuhan adalah 10 (Tabel 3).

Sifat Patogenisitas terhadap Tanaman

Hasil pengujian reaksi hipersensitifitas menunjukkan bahwa semua isolat yang diuji tidak mampu menimbulkan bercak nekrosis pada daun tembakau. Ini berarti bahwa isolat-isolat tersebut bukan merupakan patogen tumbuhan. Pengujian lebih lanjut menguatkan hasil tersebut ketika keenam isolat diinokulasikan ke tanaman tembakau lewat akar. Tanaman tembakau var. klemoko yang diinokulasi

dengan enam isolat *Bacillus* spp. tidak menunjukkan gejala apa pun, tidak dijumpai malaformasi atau perubahan morfologis, seperti halnya pada kontrol negatif yang diinokulasi dengan air. Pada kontrol positif yang diinokulasi dengan *R. solanacearum*, tanaman menunjukkan gejala kelayuan setelah satu minggu.

Aktivitas Antibiosis terhadap Patogen

Antagonisme terhadap *Ralstonia solanacearum*

Tiga isolat *Bacillus* spp. yaitu Ba-4, Ba-22, dan Ba-24 mampu menghambat ketiga isolat *R. solanacearum* yang diujikan sedangkan dua isolat lainnya yaitu Ba-30 dan Ba-33 hanya mampu menghambat satu isolat saja. Dari enam isolat yang diuji ternyata hanya satu isolat yaitu Ba-41 yang tidak mampu menghambat pertumbuhan *R. solanacearum* secara *in vitro* (Tabel 4). Sebaliknya isolat *Bacillus* Ba-41 ini dihambat pertumbuhannya oleh dua isolat *R. solanacearum* (Tabel 5).

Tabel 4. Penghambatan pertumbuhan *R. solanacearum* oleh *Bacillus* spp.

Isolat <i>Bacillus</i>	Rerata zona hambatan (mm) terhadap isolat-isolat <i>R. solanacearum</i>			Sifat Penghambatan
	Rs-13	Rs-16	Rs-22	
Ba-4	9,2	14,6	4,7	Bakteriostatik
Ba-22	2,9	2,6	2,5	Bakteriostatik
Ba-24	1,0	1,2	2,3	Bakteriostatik
Ba-30	3,9	0	0,6	Bakteriostatik
Ba-33	3,8	0	0	Bakteriostatik
Ba-41	0	0	0	-

Tabel 5. Penghambatan pertumbuhan *Bacillus* spp. oleh *R. solanacearum*

Isolat <i>R. solanacearum</i>	Rerata zona hambatan (mm) terhadap isolat-isolat <i>Bacillus</i> spp.						Sifat Penghambatan
	Ba-4	Ba-22	Ba-24	Ba-30	Ba-33	Ba-41	
Rs-13	0	4,2	0	1,2	0,6	0,8	Bakteriostatik
Rs-16	0	0,8	0	1,2	0,3	2,5	Bakteriostatik
Rs-22	0	12,1	0	0	0	0	Bakteriostatik

Tabel 6. Penghambatan pertumbuhan bakteri antagonis oleh *Bacillus* spp.

Isolat <i>Bacillus</i> spp.	Rerata zona hambatan (mm) terhadap isolat:											
	Pf22	Pf23	Pf30	Pf42	Pf51	Pf83	Stre4	Stre7	Stre48	Stre61	Stre66	Stre67
Ba-4	8,2	7,5	8,7	0	0,2	4,7	6,7	4,2	9,5	5,9	4,7	8,1
Ba-22	2,6	4,4	2,1	0	0	2,6	2,6	2,1	4,3	2,0	3,4	2,2
Ba-24	4,3	0	1,7	0	0	0	0,8	1,3	0	0	2,1	0
Ba-30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ba-33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ba-41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: Pf = pseudomonad fluoresen, Stre = *Streptomyces*, Ba = *Bacillus*

Antagonisme terhadap *Meloidogyne incognita*

Semua isolat *Bacillus* spp. mampu mendegradasi telur nematoda *M. incognita* dan mengurangi persentase telur yang menetas menjadi larva (Tabel 6). Dua isolat, yaitu Ba-4 dan Ba-22 hanya mampu mendegradasi telur dalam jumlah yang sangat sedikit namun sisa telur yang tidak terdegradasi ternyata tidak mampu menetas menjadi telur.

Antagonisme antar bakteri antagonis

Hasil pengujian menunjukkan bahwa terdapat variasi penghambatan antibakteri antagonis yang akan digunakan dalam program pengendalian hayati penyakit lincat. Hampir separuh isolat *Bacillus* spp. yang diuji mampu menekan pertumbuhan agensia hayati lainnya (Tabel 6). Isolat Ba-41 yang memberikan penekanan terbaik terhadap penyakit lincat di lapangan ternyata tidak menghambat pertumbuhan bakteri antagonis lainnya. Meskipun demikian ternyata isolat Ba-41 peka terhadap antagonisme isolat bakteri antagonis yang lain (Tabel 7).

PEMBAHASAN

Beberapa sifat yang berhasil diidentifikasi menunjukkan bahwa isolat bakteri yang diteliti masuk ke dalam genus *Bacillus*. Sifat ini bersama dengan bentuknya yang batang dan mampu membentuk endospora, membedakan *Bacillus* sp. dengan genus *Clostridium* dan *Sporosarcina* (Claus dan Berkeley, 1984). Dari Tabel 2 terlihat bahwa isolat-isolat *Bacillus* spp. yang diuji mempunyai sifat yang beragam. Isolat Ba-4, Ba-24, Ba-30, Ba-33, dan Ba-41 mempunyai kemiripan sebagian sifat dengan *B. cereus* sedangkan Ba-22 dengan *B. licheniformis*. Karakterisasi lebih lanjut dengan metode modern seperti secara molekuler perlu dilakukan untuk memastikan spesies dari isolat-isolat bakteri tersebut.

Isolat *Bacillus* spp. yang diteliti bukan merupakan patogen tumbuhan yang ditunjukkan dengan ketidakmampuannya menyebabkan gejala nekrosis pada daun tembakau (reaksi hipersensitifitas negatif) dan tidak ditemukannya malaformasi pada tanaman yang diinokulasi

Tabel 7. Penghambatan pertumbuhan *Bacillus* spp. oleh bakteri antagonis lain

Isolat bakteri antagonis	Rerata zona hambatan (mm) terhadap isolat:					
	Ba-4	Ba-22	Ba-24	Ba-30	Ba-33	Ba-41
Ba-4	0	0	0	1,2	0,7	1,0
Ba-22	0	0	0	1,4	0,9	1,0
Ba-24	0	0	0	0	0	0,4
Ba-30	1,3	2,1	0	0	1,3	0
Ba-33	0	7,2	0	7,2	0	6,5
Ba-41	0	0	0	0	0	0
Pf22	0	0	0	0	0	0
Pf23	2,2	0	0	0	0,5	2,0
Pf30	0	0	0	0	0	2,0
Pf42	0	0	0	0	0	0
Pf51	0	0	0	0	0	0
Pf83	0	0	0	0	0	0
Stre4	14,0	15,5	12,5	13,7	15,5	10,7
Stre7	11,0	14,5	10,5	11,0	11,5	9,0
Stre48	0	0	0	0	0	0
Stre61	0	0	0	0	0	0
Stre66	0	0	0	0	0	5,7
Stre67	0	0	0	0	0	9,5

melalui akar. Sampai saat ini telah dilaporkan ada tiga spesies dari genus *Bacillus* yang merupakan patogen pada tumbuhan yaitu *B. megaterium*, *B. megaterium* pv *cerealis*, dan *B. pumilus* (Anonim, 2007). Isolat Ba-41 tidak mampu menekan pertumbuhan *R. solanacearum* secara *in vitro* namun dapat mendegradasi masa telur nematoda. Bakteri dari genus ini dilaporkan memproduksi enzim gelatinase yang dapat menguraikan senyawa gelatin yang menjadi komponen utama selubung masa telur nematoda (Gordon *et al.*, 1973). Isolat *Bacillus* spp. yang diteliti mampu menghidrolisis gelatin secara *in vitro*, kemampuan ini mungkin yang menyebabkan terdegradasinya telur nematoda yang dilapisi dengan bahan gelatin (Dropkin, 1996; Luc *et al.*, 1995).

Berdasarkan hasil uji antagonisme antarcalon bakteri agensia hayati diketahui bahwa ternyata *Bacillus* spp. ada yang dihambat dan ada yang tidak dihambat pertumbuhannya oleh bakteri lain. Sebaliknya tidak semua isolat *Bacillus* spp. yang diteliti dapat menghambat pertumbuhan bakteri lainnya pula. Dengan demikian dalam penggabungan dengan isolat lain harus dipilih isolat-isolat yang tidak saling menghambat. Isolat *Streptomyces* mampu menghambat isolat lain dengan zona hambatan yang paling besar, hal ini mungkin karena sebagian besar anggota *Streptomyces* merupakan penghasil antibiotik yang potensial (Turner, 1973).

Dari hasil penelitian tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa semua isolat *Bacillus* spp. yang diuji bukan merupakan patogen tumbuhan sehingga bisa digunakan sebagai calon agensia pengendalian hayati patogen tumbuhan. Meskipun masih diperlukan penelitian lebih lanjut secara molekuler untuk memastikannya. Ada kemiripan sifat antara isolat Ba-4, Ba-24, Ba-30, Ba-33, dan Ba-41 dengan *B. cereus*. Sedangkan isolat Ba-22 memiliki kemiripan sifat dengan *B. licheniformis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tulisan ini merupakan sebagian dari hasil penelitian Riset Unggulan Terpadu XI penulis pertama yang didanai oleh Menristek dengan surat perjanjian Nomor 03/Perc/Dep. III/RUT/PPKI/II/2005 tanggal 1 Februari 2005. Penulis mengucapkan banyak terima kasih.

KEPUSTAKAAN

- Anonim, 2007. Names of Plant Pathogenic Bacteria, 1864-2004. Acetobacter-Curtobacterium. http://www.isppweb.org/names_bacterial_rath2005.asp. Diakses tgl 15 Maret 2007.
- Arwiyanto T, Asfanudin R, Wibowo A, Martoredjo T, dan Dalmadiyo G, 2007. Penggunaan *Bacillus* Isolat Lokal Untuk Menekan Penyakit Lincat Tembakau Temanggung. Berkala Penelitian Hayati (dalam proses).

- Chun W dan Vidaver AK, 2001. Gram Positive Bacteria: Bacillus. Dalam: Schaad NW, Jones JB, dan Chun W (eds.). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd Edition. APS Press, St Paul Minnesota, 250–260.
- Claus dan Berkeley, 1984. Endospore-Forming Rods and Cocci. Dalam: Krieg NR dan Jolt JG (eds). *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, 529–551.
- Dalmadiyo G, 2004. Kajian Interaksi Infeksi Nematoda Puru Akar (*Meloidogyne incognita*) dengan Bakteri *Ralstonia solanacearum* pada Tembakau Temanggung. Fakultas Pertanian UGM. Disertasi.
- Dalmadiyo G, Rahayuningsih S, dan Supriyono, 2000. Penyakit Tembakau Temanggung dan Pengendaliannya. Monograf Balittas No. 5. Balai Penelitian Tembakau dan Tanaman Serat, Malang, 108.
- Dropkin VH, 1996. Introduction to Plant Nematology (Pengantar Nematologi Tumbuhan, alih bahasa Supratoyo). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 366.
- Gordon RE, Haynes WC, dan Pang CH, 1973. The Genus Bacillus. Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture, Washington.
- Jutono JS, Hartadi S, Kabirun S, Soehadi, Susanto, 1973. Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum untuk Perguruan Tinggi. Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta, 227.
- Hayward AC, 1994. Systematic and Phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and Related Bacteria. Dalam: Hayward AC dan Hartman GL (eds.) *Bacterial Wilt, The Disease and The Causative Agents Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, 123–136.
- Klement Z, 1990. Introduction and General Instruction. Dalam: Klement Z, Rudolph K dan Sands DO. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kado, Budapest, 96–102.
- Luc MR, Sikora A, dan Bridge J, 1995. Plant Parasitic Nematodes in Subtropic and Tropic Agriculture (Nematoda Parasitik Tumbuhan di Pertanian Subtropik dan Tropik, alih bahasa Supratoyo). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 838.
- Nishiyama K dan Ezuka A, 1991. Manual of Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Japan Plant Protection Association, Tokyo.
- Sands DS, 1990. Physiological Criteria-Determinative test. Dalam: Klement Z, Rudolph K, dan Sands DC. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kado, Budapest, 133–143.
- Schaad NW, 2001. Initial Identification of Common Genera. Dalam: Schaad NW, Jones JB, dan Chun W (eds). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd Edition. APS Press, St Paul, Minnesota, 1–6.
- Slepecky RA dan Hempill HE, 1991. The Genus Bacillus-Non Medical. Dalam: Ballows, A, Truper HG, Dworkin M, Horder W dan Schleifer KH (Eds.) *The Prokaryotes, A Handbook on The Biology of Bacteria. Ecophysiology, Isolation, Identification, Application*. 2nd edition. Springer-Verlag, New York, 1663–1696.
- Turner WB, 1973. Secondary Metabolism with Special Reference to Actinomycetales. Dalam: Sykes G dan Skinner FA (Eds.) *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*. Academic Press, London, pp. 209–217.

Reviewer: **Dr. Ni'matuzahroh**