

# Evaluasi Lapangan Perangkat ELISA dengan Antibodi Poliklonal untuk Deteksi dan Identifikasi RRSV dan *Ralstonia solanacearum*

Ifa Manzila, M. Machmud, Jumanto, dan Yadi Suryadi

*Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian*

## ABSTRAK

Percobaan dilakukan di laboratorium dengan tujuan untuk mengevaluasi keefektifan perangkat ELISA dengan PAb untuk deteksi dan identifikasi RRSV dan RS. Perangkat ELISA untuk masing-masing patogen dikemas dalam suatu paket secara terpisah, masing-masing terdiri atas antigen, antibodi, konjugat, bufer, substrat, dan cawan ELISA. Tiap kemasan dapat digunakan untuk menguji 250 contoh tanaman. Teknik DAS-ELISA digunakan untuk menguji keefektifan perangkat ELISA untuk mendeteksi RRSV pada contoh tanaman padi terinfeksi RRSV yang dikoleksi dari Inlitbio Muara dan Balitpa Sukamandi. Sebagai kontrol positif digunakan ekstrak daun padi terinfeksi RRSV yang dipelihara di rumah kaca. Teknik ELISA tidak langsung digunakan untuk menguji perangkat ELISA untuk mendeteksi RS dari umbi kentang terinfeksi RS dari Lembang dan Pangalengan. Sebagai kontrol digunakan sediaan biakan murni isolat RS 9001 asal kacang tanah dari Inlitbio Cikeumeuh. Hasil pengujian menunjukkan bahwa perangkat ELISA yang diuji cukup efektif untuk mendeteksi RRSV dan RS dari contoh tanaman yang terinfeksi patogen dari lapang. Perangkat ELISA yang di-rakit dapat digunakan untuk mendeteksi patogen baik dari suspensi biakan murni maupun dari ekstrak tanaman dengan limit deteksi 0,5 µg/ml untuk RRSV dan 10<sup>4</sup> sel/ml untuk bakteri RS. Perangkat ini siap untuk diperbanyak secara massal melalui kerja sama kemitraan.

**Kata kunci:** Perangkat ELISA, antibodi poliklonal, deteksi dan identifikasi, patogen tanaman

## ABSTRACT

A laboratory trial was conducted with objectives to evaluate effectiveness of ELISA kits for detection and identification of RRSV and RS. ELISA kits for each of the pathogen was prepared in a separate package. Each package contained antigen, antibody, conjugate, buffers, substrate, and ELISA microplates and applicable for detection of 250 plant samples. DAS-ELISA technique was used for the detection of RRSV, while Indirect ELISA technique was used for the detection of RS. Rice plant showing ragged stunt symptoms were collected from Muara and Sukamandi Experimental Fields and used as plant samples for the detection of RRSV. Potato tubers infected with RS that were collected from farmers' fields in Pangalengan and Lembang were used as plant samples for the detection of RS. Leaves of rice plants infected with RRSV that were maintained in a glasshouse were used as positive control for RRSV. Bacterial culture of RS isolate number RS 9001 were used as control positive for RS. Results of the trial showed that the ELISA kits were effective for the detection of both RRSV and RS. The kits had sensitivity detections or detection limits of up to 0.5µg RRSV/ml and 10<sup>4</sup> RS sel/ml. The kits are ready for mass production.

**Key words:** ELISA kits using polyclonal antibody, detection and identification, RRSV and RS

## PENDAHULUAN

Penyakit layu yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (RS) merupakan penyakit tanaman pertanian yang sangat penting, karena sangat merugikan petani dan sulit dikendalikan. Bakteri patogennya di samping menyebabkan tanaman layu dan mati secara dini juga merusak kualitas dan kuantitas hasil tanaman. RS paling tidak mempunyai lima ras atau strain yang berbeda virulensi dan kisaran inangnya. Kisaran inang RS sangat luas, beberapa contoh inang utamanya adalah tanaman kacang tanah, tembakau, tomat, kentang, cabai, pisang, cengkih, dan jahe, yang mempunyai nilai ekonomi penting. RS dapat bertahan lama hidup pada stek, bibit tanaman, umbi bibit, biji benih, dan bahkan di dalam tanah, sehingga memungkinkan penularan penyakit jarak dekat dan jarak jauh. Varietas tanaman yang tahan terhadap penyakit layu sulit diperoleh (Machmud, 1986).

Penyakit tungro dan kerdil hampa merupakan penyakit utama tanaman padi di Indonesia yang disebabkan oleh virus (Jumanto dan Tantera, 1987; Koesnang *et al.*, 1993). Penyakit kerdil hampa padi (*rice ragged stunt*, RRS) disebabkan oleh virus kerdil hampa padi (*Rice Ragged Stunt Virus*, RRSV). Penyakit ini mula-mula dilaporkan di Indonesia tahun 1977 (Hibino *et al.*, 1977) dan dengan cepat meluas di Jawa (Palmer *et al.*, 1978). Pada periode 1980-an epifitotik RRS terjadi dan mengakibatkan kerugian cukup besar pada produksi padi (Jumanto dan Tantera, 1987). Akhir-akhir ini, RRS cenderung muncul kembali di lapang dan dikhawatirkan terjadi epifitotik baru. Penyakit ini juga sulit dikendalikan, karena RRSV ditularkan melalui wereng coklat (*Nilaparvata lugens*) yang selalu terdapat di lapang (Ou, 1985).

Monitoring lapang melalui pengkajian epifitologi penyakit dan bioekologi patogennya merupakan komponen dasar yang sangat penting guna menunjang keberhasilan pengendalian penyakit secara terpadu. Deteksi patogen secara dini, cepat, dan akurat sangat menunjang upaya tersebut. Ketersediaan teknik deteksi dan identifikasi patogen yang efektif dan efisien akan sangat membantu peneliti, petugas sertifikasi benih, petugas karantina pertanian, peneliti, dan pengguna lain-nya. Dalam era perdagangan global, ketersediaan teknologi deteksi dini patogen juga sangat diperlukan untuk sertifikasi produk ekspor dan impor (Robinson-Smith *et al.*, 1995; Seal dan Elphinstone, 1994).

ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) merupakan salah satu yang menjanjikan untuk deteksi dini patogen tumbuhan. Teknik yang berbasis serologi ini telah diadopsi untuk deteksi dan identifikasi virus dan bakteri patogen sejak tahun 1970-an (Converse dan Martin, 1990; Van Regenmortel 1982; Robinson-Smith *et al.*, 1995; Seal dan Elphinstone, 1994). Adopsi teknik ELISA untuk deteksi bakteri dan prokariota patogen tumbuhan dimulai sejak awal 1980-an (McLaughlin dan Chen, 1990; Schaad *et al.*, 1990; Seal dan Elphinstone, 1994). Sejak 1996, di Balitbio telah dikaji kembali teknik ELISA untuk deteksi dan identifikasi beberapa patogen utama tanaman pertanian

termasuk RRSV dan RS menggunakan antibodi poliklonal (PAb) (Machmud *et al.*, 1999; 2000). Teknik produksi PAb telah dikembangkan, dan model komponen perangkat ELISA-nya juga telah dirakit. Sebelum teknologi ini diterapkan di lapang dan perangkat ELISA diperbanyak secara massal, maka keefektifan perangkatnya perlu diuji di lapang. Apabila perangkat ini terbukti efektif untuk mendeteksi RRSV dan RS dari contoh tanaman sakit, maka produksi perangkat ELISA secara massal dapat dilakukan untuk komersialisasinya.

Makalah ini merupakan hasil penelitian yang bertujuan untuk menguji ke-efektifan perangkat ELISA dengan PAb untuk mendeteksi dan mengidentifikasi RRSV dan RS di lapang.

## **BAHAN DAN METODE**

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Kelti Rekayasa Protein dan Imunologi, Balitbio, Bogor. Tahapan kegiatan penelitian meliputi (1) penyediaan perangkat ELISA untuk deteksi dan identifikasi RRSV dan RS; (2) uji keefektifan perangkat ELISA untuk deteksi RRSV, dan (2) uji keefektifan perangkat ELISA untuk deteksi dan identifikasi RS.

### **Penyediaan Perangkat ELISA untuk Deteksi RRSV dan RS**

Perakitan perangkat ELISA untuk RRSV dan RS dan pengujian keefektifannya dilakukan secara terpisah. Pada tahap ini perangkat ELISA untuk masing-masing patogen dibuat 15 paket. Komponen yang disediakan untuk perangkat ELISA adalah antibodi, antigen, konjugat enzim, substrat, bufer, dan cawan mikrotiter. Komponen tersebut dirakit dalam suatu paket yang masing-masing dapat digunakan untuk menguji 250 contoh tanaman. Antibodi dipekatkan dan dikemas dalam tabung eppendorf steril dengan volume 1,0 ml, sehingga pada waktu penggunaannya perlu diencerkan (800 kali untuk RS; 400 kali untuk RRSV). Antigen juga disiapkan dalam tabung eppendorf steril dengan volume 1,0 ml. Antigen RS disediakan dengan kepekatan  $10^9$  sel/ml. Sumber antigen RRSV disediakan dari tanaman padi yang terinfeksi RRSV di rumah kaca, karena pembuatan sediaan murni RRSV menemui kendala kerusakan ultrasentrifus. Konjugat enzim disediakan dalam tabung eppendorf steril dengan volume 1,0 ml dan dalam penggunaannya perlu diencerkan 500 kali. Bahan kimia yang berbentuk cair seperti Tween 20 dan dietil-nolamine dikemas dalam botol kecil ukuran 5-10 ml. Bahan kimia padat bahan untuk membuat bufer dan substrat dikemas dalam kantong plastik kecil. Selanjutnya setiap paket komponen ELISA ditempatkan dalam satu kotak. Resep dan bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk perakitan perangkat ELISA disajikan pada Lampiran 1, 2, dan 3.

### **Evaluasi Keefektifan Perangkat ELISA untuk Deteksi RRSV**

Pengujian perangkat ELISA untuk mendeteksi RRSV dilakukan menggunakan teknik DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwiched-ELISA*) menurut Van Regenmortel (1982). Sebagai bahan tanaman uji digunakan contoh tanaman padi bergejala kerdil hampa yang diambil dari dua lokasi di lapangan, yaitu dari Kebun Percobaan Instalasi Penelitian Padi (inlitpa) Muara dan Kebun Percobaan Balai Penelitian Padi (Balitpa). Kontrol positif digunakan strain RRSV yang telah dipelihara secara rutin pada tanaman padi di rumah kaca Balitbio, Bogor. Pada pengujian ini, mula-mula contoh daun padi yang terinfeksi RRSV digerus menggunakan pestle dan mortar steril dengan menambahkan larutan bufer fosfat salin (PBS, pH 7,2). Ekstrak daun disentrifusi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit dan supernatannya diambil untuk digunakan sebagai bahan uji (antigen).

Enceran Ag dibuat 10 x lipat,  $10^1$ - $10^9$  dengan menggunakan PBS. Cawan mikrotiter baru dilapisi dengan enceran Ab-RRSV, 100  $\mu$ l/lubang, dan diinkubasikan pada 37°C selama 2-3 jam, kemudian dicuci 3 x 3 menit dengan larutan PBS-T. Selanjutnya tiap enceran Ag dimasukkan ke lubang cawan, 100  $\mu$ l/lubang, dan cawan diinkubasikan kembali dan dicuci seperti pada tahap sebelumnya. Setelah itu, tiap lubang diberi konjugat, 100  $\mu$ l/lubang, dan cawan diinkubasi serta dicuci seperti pada tahapan sebelumnya. Pada tiap lubang cawan ditambahkan larutan substrat 100  $\mu$ l/lubang, dan cawan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit untuk melihat reaksi perubahan warna (bening berubah menjadi kuning). Reaksi substrat dihentikan dengan menambahkan 100  $\mu$ l 3 M NaOH pada tiap lubang cawan.

Parameter keefektifan perangkat ELISA diukur berdasarkan ketepatan dan kepekaan deteksinya. Ketepatan deteksi diukur berdasarkan spesifisitas reaksi deteksi. Kepekaan deteksi diukur berdasarkan batas terendah kandungan patogen pada contoh yang masih dapat dideteksi. Pengamatan secara kualitatif dilakukan secara visual dengan melihat perubahan warna substrat dalam setiap lubang cawan mikrotiter. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna substrat menjadi kuning, sementara pada reaksi negatif tidak terjadi perubahan warna.

### **Evaluasi Keefektifan Perangkat ELISA untuk Deteksi RS**

Teknik yang digunakan untuk pengujian keefektifan perangkat ELISA untuk mendeteksi ketiga bakteri patogen ialah teknik ELISA Tidak Langsung (*Indirect ELISA*) menurut Robinson-Smith *et al.* (1995). Sebagai bahan uji digunakan umbi kentang terinfeksi RS yang diperoleh dari kebun petani di dua lokasi, dari desa Margahayu (Lembang) dan dari Pangalengan. Sebagai kontrol positif digunakan suspensi biakan murni RS dalam larutan bufer karbonat dengan kepekatan  $10^8$ - $10^9$  sel/ml yang dibuat dari biakan RS umur 48 jam pada medium Sukrose Pepton Agar/SPA (Lelliot dan Stead, 1987). Lima perangkat ELISA diuji untuk mendeteksi setiap contoh tanaman dan setiap pengujian dilakukan dua kali sebagai ulangan. Pada bagian stolon umbi kentang dibuat lubang konus (limas) dengan diameter 10 mm dan kedalaman

5 mm menggunakan skalpel atau *cutter* steril dan kedalamnya ditambahkan larutan bufer ekstraksi (bufer karbonat, pH 7,2). Umbi kentang dibiarkan selama 15-30 menit pada suhu ruang agar eksudat bakteri RS keluar ke dalam bufer ekstraksi. Selanjutnya suspensi umbi kentang digunakan sebagai bahan untuk diuji dengan teknik ELISA. Protokol teknik ELISA Tidak Langsung yang digunakan adalah menurut Robinson-Smith *et al.*, 1995).

Parameter keefektifan perangkat ELISA diukur berdasarkan ketepatan dan kepekaan deteksinya. Ketepatan deteksi diukur berdasarkan spesifisitas reaksi deteksi. Kepekaan deteksi diukur berdasarkan batas terendah kandungan patogen pada contoh yang masih dapat dideteksi. Pengamatan secara kualitatif dilakukan secara visual dengan melihat perubahan warna substrat dalam setiap lubang cawan mikrotiter. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna substrat menjadi kuning, sementara pada reaksi negatif tidak terjadi perubahan warna.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Perakitan Perangkat ELISA**

Pada tahap ini komponen perangkat ELISA yang dibuat belum siap dikemas secara komersial, walaupun ukuran dari tiap komponen perangkat telah ditetapkan dan diperkirakan cukup untuk menguji sekitar 250-300 contoh tanaman. Antigen RRSV dan RS dikemas dengan tabung eppendorf 1.5 ml dengan volume 1,0 ml/tabung. Sediaan murni RRSV disediakan dengan kepekatan 100 ug/ml. Antigen RS juga dikemas dalam tabung eppendorf dengan volume 1,0 ml. Kepekatan Antigen RS adalah  $10^9$  sel/ml. Konjugat untuk setiap perangkat juga dikemas dalam tabung eppendorf 1,5 ml dengan volume 1,0 ml. Dalam penggunaannya, konjugat perlu diencerkan 100 kali dengan PBS-T. Bufer dan substrat dikemas terpisah, masing-masing dalam bentuk campuran bahan kimia yang siap pakai. Larutan bufer dibuat dengan menambahkan akuades sebelum penggunaannya. Setiap kemasan diberi label agar para pengguna mudah membedakan masing-masing komponen perangkat ELISA. Protokol teknik ELISA untuk masing-masing patogen juga disediakan, sehingga para pengguna dapat melakukan pengujian secara langsung berdasarkan petunjuk dalam protokol tersebut.

### **Uji Keefektifan Perangkat ELISA untuk Deteksi RRSV**

Hasil pengujian menunjukkan bahwa perangkat ELISA yang telah dirakit cukup efektif untuk deteksi RRSV. Perangkat ini dengan enceran PAb RRSV 1 : 10 dapat mendeteksi hingga enceran ekstrak daun  $10^{-4}$ , suatu kepekatan RRSV yang cukup rendah (Tabel 1). Pada tahap ini kepekatan RRSV dalam ekstrak contoh daun padi belum dapat diketahui, karena masih harus dilakukan pemurnian terlebih dahulu. Pada akhir penelitian, pemurnian RRSV belum selesai dilakukan, karena mengalami kendala

kerusakan ultrasenstrifus. Keefektifan PAb RRSV yang digunakan masih cukup baik hingga enceran 400 kali (1 : 400), sehingga penggunaan anti-bodi dapat dihemat. Namun demikian, keefektifan PAb ini masih dapat ditingkatkan paling tidak hingga enceran 1000 kali atau lebih dengan cara meningkatkan titer antiserum RRSV pada waktu produksinya melalui imunisasi kelinci atau men-cit, diikuti dengan proses yang optimum pada waktu pemurnian antiserum menjadi PAb (Tabel 1).

Deteksi RRSV dari contoh tanaman padi bergejala penyakit kerdil hampa yang diambil dari beberapa lokasi di Jawa Barat, menunjukkan bahwa perangkat ELISA yang telah dirakit dapat digunakan secara langsung untuk mendeteksi RRSV dari ekstrak daun, dengan menggunakan enceran PAb 1 :

**Tabel 1.** Hasil uji perangkat ELISA untuk deteksi virus tungro (RRSV) dengan teknik DAS-ELISA berdasarkan pengamatan secara visual (kualitatif). Bogor, 2002

| Enceran PAb RRSV | Enceran ekstrak daun padi terinfeksi RRSV dari rumah kaca |                  |                  |                  |                  | Kontrol negatif |       |
|------------------|-----------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-------|
|                  | 10 <sup>0</sup>                                           | 10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> | Sehat           | PBS-T |
| 1 : 10           | +++                                                       | +++              | ++               | ++               | +                | -               | -     |
| 1 : 100          | ++                                                        | ++               | ++               | +                | -                | -               | -     |
| 1 : 200          | ++                                                        | ++               | ++               | +                | -                | -               | -     |
| 1 : 400          | ++                                                        | ++               | +                | +                | -                | -               | -     |
| 1 : 800          | +                                                         | +                | -                | -                | -                | -               | -     |
| 1 : 1600         | -                                                         | -                | -                | -                | -                | -               | -     |

Pengenceran ekstrak daun 10 kali lipat secara seri; 10<sup>0</sup> = suspensi awal; reaksi positif (+) ditunjukkan perubahan warna substrat AP dalam lubang cawan ELISA menjadi kuning; reaksi negatif (-) substrat tetap jernih; +++ = warna kuning sangat nyata, ++ = warna kuning nyata; + = warna kuning kurang nyata; Ekstrak daun sehat dan PBS-T = kontrol negatif

**Tabel 2.** Hasil uji perangkat ELISA untuk deteksi RRSV dari contoh daun padi bergejala penyakit kerdil hampa yang dikoleksi dari beberapa daerah di Jawa Barat. Bogor, 2002

| Contoh uji            | Enceran antibodi |    |     |         |    |     |
|-----------------------|------------------|----|-----|---------|----|-----|
|                       | 1 : 200          |    |     | 1 : 400 |    |     |
| Asal                  | I                | II | III | I       | II | III |
| Muara, Bogor          | ++               | ++ | ++  | +       | +  | +   |
| Muara, Bogor          | ++               | ++ | +   | +       | +  | +   |
| Muara, Bogor          | ++               | +  | ++  | +       | +  | +   |
| KP Sukamandi, Subang  | +                | +  | +   | +       | +  | +   |
| KP Sukamandi, Subang  | ++               | ++ | ++  | ++      | ++ | ++  |
| KP Pusanegara, Subang | ++               | ++ | ++  | ++      | ++ | ++  |
| KP Pusanegara, Subang | +                | +  | +   | +       | +  | +   |
| Cianjur               | -                | -  | -   | -       | -  | -   |
| Pamanukan, Subang     | ++               | ++ | +   | +       | +  | +   |
| Kalijati, Subang      | ++               | ++ | ++  | ++      | ++ | +   |
| Kontrol positif       | ++               | ++ | ++  | ++      | ++ | ++  |
| Kontrol negatif       | -                | -  | -   | -       | -  | -   |

Reaksi positif (+) ditunjukkan perubahan warna substrat AP dalam lubang cawan ELISA menjadi kuning; reaksi negatif (-) substrat tetap jernih; +++ = warna kuning sangat nyata, ++ = nyata; + = warna kuning kurang nyata. Kontrol positif = ekstrak daun terinfeksi RRSV dari rumah kaca; kontrol negatif = PBS-T. I, II, dan III = ulangan pengujian

200 dan 1 : 400 (Tabel 2). Pada umumnya, hasil pengujian lebih baik apabila PAb yang digunakan mempunyai kepekatannya lebih tinggi (enceran 1 : 200). Perbedaan warna reaksi pada lubang cawan ELISA menunjukkan bahwa titer atau kandungan partikel RRSV dalam ekstrak contoh daun padi yang diuji juga berbeda-beda. Pada saat ini pengujian masih dilakukan secara kualitatif, hanya berdasarkan pengamatan visual. Pengamatan dengan spektrofotometer atau ELISA reader dapat mengetahui secara kuantitatif kandungan RRSV dalam ekstrak daun yang diuji apabila kontrol positif yang digunakan adalah sediaan murni RRSV yang telah diketahui kepekatannya ( $OD_{415}$ ). Sediaan murni RRSV yang telah diketahui kepekatannya tersebut digunakan sebagai pembandingan dalam pengukuran kepekaan deteksi secara kuantitatif. Pada penelitian ini kontrol positif adalah ekstrak daun padi terinfeksi RRSV yang kepekatannya tidak diketahui, sehingga pengukuran hasil secara kuantitatif belum dapat dilakukan. Dalam pengujian ini, satu contoh dari Sukamandi menunjukkan reaksi yang agak rendah. Satu contoh dari Cianjur bahkan bereaksi negatif, kemungkinan karena kandungan RRSV-nya rendah atau memang tidak terinfeksi RRSV. Pada pengujian ini kontrol positif yang berupa ekstrak tanaman padi terinfeksi RRSV dari rumah kaca selalu menunjukkan reaksi positif baik pada penggunaan enceran PAb 1 : 200 maupun 1 : 400. Pada lubang kontrol negatif yang hanya berisi bufer PBS-T selalu menunjukkan reaksi negatif.

### Pengujian Keefektifan Perangkat untuk Deteksi RS

Hasil uji keefektifan perangkat ELISA untuk RS disajikan pada Tabel 3 dan 4. Perangkat ELISA yang dirakit dapat digunakan untuk mendeteksi RS baik dari suspensi biakan murni RS maupun dari ekstrak umbi kentang yang terinfeksi RS. Batas terendah atau limit deteksi perangkat adalah  $10^4$  sel/ml (Tabel 3). Hal ini berarti apabila kerapatan sel di dalam contoh lebih rendah daripada  $10^4$  sel/ml, maka RS tidak akan terdeteksi. Nilai ini setara dengan yang diperoleh Robinson-Smith *et al.* (1995) dengan perangkatnya untuk mendeteksi *P. solanacearum* dari tanaman dan tanah. Enceran PAb RS hingga

**Tabel 3.** Hasil uji perangkat ELISA untuk deteksi bakteri *Ralstonia solanacearum* (RS) dengan teknik ELISA Tidak Langsung berdasarkan pengamatan secara visual (kualitatif). Bogor, 2002

| Enceran PAb RS | Kepekatan bakteri |        |        |        |        |        | UK  | KN |
|----------------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|----|
|                | $10^8$            | $10^7$ | $10^6$ | $10^5$ | $10^4$ | $10^3$ |     |    |
| 1 : 10         | +++               | +++    | +++    | ++     | +      | -      | +++ | -  |
| 1 : 100        | +++               | +++    | ++     | ++     | +      | -      | ++  | -  |
| 1 : 200        | +++               | ++     | ++     | +      | +      | -      | ++  | -  |
| 1 : 400        | ++                | ++     | ++     | +      | +      | -      | ++  | -  |
| 1 : 800        | ++                | ++     | ++     | +      | -      | -      | +   | -  |
| 1 : 1.600      | +                 | +      | +      | -      | -      | -      | +   | -  |
| 1 : 3.200      | -                 | -      | -      | -      | -      | -      | -   | -  |

Reaksi positif (+) ditunjukkan perubahan warna substrat AP dalam lubang cawan ELISA menjadi kuning; reaksi negatif (-) substrat tetap jernih; +++ = warna kuning sangat nyata, ++ = warna kuning nyata; + = warna kuning kurang nyata; UK = ekstrak umbi kentang terinfeksi RS; KN = kontrol negatif, larutan PBS-T

**Tabel 4.** Hasil uji perangkat ELISA dengan teknik ELISA Tidak Langsung untuk deteksi bakteri *Ralstonia solanacearum* (RS) asal umbi kentang yang diperoleh dari lapang, berdasarkan pengamatan secara visual (kualitatif). Bogor 2004

| Contoh umbi kentang       | Enceran antibodi |    |     |         |    |     |
|---------------------------|------------------|----|-----|---------|----|-----|
|                           | 1 : 400          |    |     | 1 : 800 |    |     |
| Asal                      | I                | II | III | I       | II | III |
| Pangalengan-1             | ++               | ++ | ++  | +       | +  | +   |
| Pangalengan-2             | ++               | ++ | ++  | ++      | +  | +   |
| Pangalengan-3             | ++               | +  | ++  | +       | ++ | +   |
| Pangalengan-4             | +                | ++ | ++  | +       | ++ | +   |
| Pangalengan-5             | ++               | ++ | ++  | ++      | ++ | ++  |
| Lembang-1                 | ++               | ++ | ++  | ++      | ++ | ++  |
| Lembang-2                 | +                | +  | +   | +       | +  | +   |
| Lembang-3                 | -                | -  | -   | -       | -  | -   |
| Lembang-4                 | ++               | ++ | +   | +       | +  | ++  |
| Lembang-5                 | ++               | ++ | ++  | ++      | ++ | +   |
| Kontrol positif (PS 9001) | ++               | ++ | ++  | ++      | ++ | ++  |
| Kontrol negatif           | -                | -  | -   | -       | -  | -   |

Reaksi positif (+) ditunjukkan perubahan warna substrat AP dalam lubang cawan ELISA menjadi kuning; reaksi negatif (-) substrat tetap jernih; +++ = warna kuning sangat nyata, ++ = nyata; + = warna kuning kurang nyata; kontrol positif = biakan murni isolat RS 9001 asal kacang tanah (Cikeumeuh, Bogor), kepekatan  $10^7$  sel/ml; kontrol negatif = PBS-T. I, II, dan III = ulangan pengujian

1600 kali 1 : 800) masih dapat digunakan untuk mendeteksi RS, tetapi enceran PAb yang efisien adalah 800 kali, karena dengan menggunakan enceran tersebut berarti. penggunaan PAb sangat sedikit, tetapi reaksinya cukup baik, sehingga menghemat biaya.

Hasil pengujian perangkat ELISA untuk mendeteksi RS dari umbi kentang menunjukkan bahwa deteksi RS dengan menggunakan enceran PAb hingga 800 kali juga masih efektif (Tabel 4). Hal ini ditunjukkan pada No. 5, 6, 10, dan 11, yaitu deteksi dari contoh umbi kentang asal Pangalengan-5, Lembang 1, dan Lembang-5 serta kontrol positif (isolat PS 9001). Pengujian yang dilakukan terhadap 10 contoh umbi kentang asal Lembang dan Pangalengan yang diulang 3 kali menunjukkan bahwa 9 contoh bereaksi positif baik yang diuji dengan menggunakan PAb yang di-encerkan 400 kali maupun 800 kali. Contoh umbi kentang Lembang-3 yang diuji bereaksi negatif berarti tidak terinfeksi RS atau kandungan RS dalam umbi lebih rendah dari  $10^4$  sel/ml. Dalam pengujian ini lubang kontrol negatif juga bereaksi negatif.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Perangkat ELISA dengan PAb yang telah dirakit dapat digunakan untuk deteksi RRSV dan RS baik dari sediaan murni patogen maupun dari ekstrak tanam-an dengan kepekaan tinggi. Uji ELISA untuk RRSV dan RS

memerlukan waktu paling cepat 5 jam. Kepekaan deteksi perangkat untuk RRSV adalah, sedangkan untuk RS adalah  $10^4$  CFU/ml.

### Saran

Komponen dan rakitan perangkat ELISA untuk deteksi dan identifikasi RRSV dan RS tersebut siap diproduksi massal melalui kemitraaan untuk tahapan ko-mersialisasinya.

### DAFTAR PUSTAKA

- Converse, R.H. and R.R. Martin. 1990.** ELISA methods for plant viruses. *In* Hampton, R. and S.H. De Boer (*Eds.*). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A laboratory Manual. The APS Press, St Paul, Minnesota. p. 179-196.
- Hibino, M. Roechan, S. Sudarisman, and D.M. Tantera. 1977.** A virus disease of rice (kerdil hampa) transmitted by brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* Stahl, in Indonesia. Contributions of CRIA 35:1-15.
- Jumanto and D.M. Tantera. 1987.** Tungro and tungro-like disease in West Java, Indonesia. Proc. Workshop on Rice Tungro Virus. Maros, Indonesia.
- Koesnang, A. Muis, M. Slamet, dan A. Hasanuddin. 1993.** Intensitas serangan penyakit tungro dan fluktuasi populasi WH, *N. virescens* Distant pada berbagai waktu tanam di Sulawesi Selatan. Agricam 8(3):79-83.
- Lelliot, R.A. and D.E. Stead. 1987.** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Sci. Publ., London. 216 p.
- Machmud, M. 1996.** Bacterial wilt in Indonesia. ACIAR Proceedings. Canberra, Australia. 30:60-64.
- Machmud, M., Y. Suryadi, M.A. Suhendar, Jumanto, dan M. Roechan. 1999.** Perakitan perangkat ELISA untuk deteksi dan identifikasi Rs, SMV, *Psg*, dan *Xcg* dengan antibodi poliklonal. Laporan ROPP Tahun Anggaran 1998-1999, Balitbio, Bogor. 15 hlm.
- Machmud, M., M. Roechan, Jumanto, dan M.A. Suhendar. 2000.** Perakitan dan uji efektifitas perangkat ELISA untuk deteksi virus RTV dan SMV serta bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* dan *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. Laporan ROPP Tahun Anggaran 1999-2000. Balitbio, Bogor. 16 hlm.
- McLaughlin, R.J. and T.A. Chen. 1990.** ELISA methods for plant pathogenic procaryotes. *In* Hampton, R. and S.H. De Boer (*Eds.*). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. The APS Press, St Paul, Minnesota. p. 197-201.

- Ou, S.H. 1985.** Rice diseases. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, England. 378 p.
- Palmer, L.T., J. Soepriaman, and O. Mochida. 1978.** The distribution of ragged stunt disease and resulting yield reduction in Indonesia. The International Rice Research Newsletter (IRRN) 3(3):15.
- Robinson-Smith, A.P. Jones, J.G. Elphinstone, and S.M.D. Forde. 1995.** Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agric. Immunol. 7:67-79.
- Schaad, N.W., S. Sule, J.W.L. van Vuurde, H. Vrugink, A.M. Alvarez, A.A. Benedict, L. de Wael, and O van Laere. 1990.** Serology. In Klement, Z., K. Rudolph, and D.C. Sands (Eds.). Methods in Phytopathology Vol. I. Akademiai Kiado, Budapest. p. 153-198.
- Seal, S.E. and J.G. Elphinstone. 1994.** Advanced techniques for the detection of *Pseudomonas solanacearum*. In Hayward, A.C. and G.L. Hartman (Eds.). Bacterial Wilt: Its Causative Agent. CABI, Wallingford, UK. p. 25-34.
- Van Regenmortel, M.H.V. 1982.** Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press, New York. p. 73-173.

**Lampiran 1. Resep bufer dan substrat untuk teknik ELISA**

|                                                                      |          |
|----------------------------------------------------------------------|----------|
| Bufer karbonat 0,05 M ( <i>Coating buffer</i> , pH 9,6), 1000 ml     |          |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                                      | 6,36 g   |
| NaHCO <sub>3</sub>                                                   | 11,72 g  |
| Akuades menjadi                                                      | 1.000 ml |
| Bufer fosfat salin ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> , PBS), pH 7,4 |          |
| NaCl                                                                 | 8,5 g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                     | 7,16 g   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O               | 3,12 g   |
| Akuades                                                              | 985 ml   |
| Bufer pencuci (PBS + tween 20, PBS-T)                                |          |
| PBS, 10 x                                                            | 100 ml   |
| 10% Tween 20                                                         | 5 ml     |
| Bufer penghambat ( <i>Blocking buffer</i> )                          |          |
| PBS 10 x                                                             | 10 ml    |
| Polyvinyl pyrrolidone (MW 44 000)                                    | 2,0 g    |
| 10% Tween 20                                                         | 0,5 ml   |
| Susu bubuk berlemak ( <i>full cream milk</i> )                       | 0,5 g    |
| Akuades menjadi                                                      | 100 ml   |
| Substrat peroksidase (10 ml):                                        |          |
| 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB, Sigma), 10 mg/ml               | 100 ul   |
| dalam dimethylsulfoxide (DMSO)                                       |          |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%                                    | 2 ul     |
| 1,0 M Na-asetat pH 5,8                                               | 1,0 ml   |
| Ditambah akuades menjadi                                             | 10 ml    |
| Bufer substrat AP, pH 9,8 (1000 ml):                                 |          |
| Dietanolamin                                                         | 97 ml    |
| Ditambah akuades menjadi                                             | 1.000 ml |
| Substrat AP                                                          |          |
| Tablet substrat alkaline phosphatase no. 104 (Sigma)                 | 3 tablet |
| Bufer substrat alkaline phosphatase                                  | 20 ml    |

PBS-Tween dapat disimpan pada suhu 4°C untuk beberapa bulan. Untuk menguji 500 contoh tanaman diperlukan 5.000 ml PBS-Tween. Bufer penghambat dibuat segera apabila akan digunakan

**Lampiran 2. Bahan-bahan dan alat yang disediakan dalam setiap paket perangkat ELISA**

1. Antibodi poliklonal untuk RRSV atau RS 1,0 ml dalam tabung eppendorf.
2. Antigen (kontrol positif): suspensi sediaan murni RRSV dalam PBS-T 1,0 ml dalam eppendorf dengan kepekatan 100 ug/ml; suspensi RS dalam PBS-T dengan kepekatan 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> sel/ml.
3. Konjugat enzim AP (dalam kantong plastik tertutup).
4. Substrat (dalam kantong plastik tertutup).
5. Bufer (dalam kantong plastik tertutup).
6. Cawan mikrotiter atau cawan ELISA 3 buah.

**Lampiran 3.** Bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk uji ELISA

---

1. Akuades.
  2. Ammonium sulphate.
  3. Tween 20.
  4. Polyvinyl pyrrolidone (PVP 40) MW 10.000-40.000 untuk mengikat senyawa polyphenol yang dapat menghambat reaksi ELISA.
  5. Reagen untuk pemblokir (*blocking reagent*): susu bubuk bebas lemak.
  6. Enzim untuk konjugat: alkaline phosphatase (Sigma) dan Goat Anti Rabbit (GAR) antibody (Sigma).
  7. Glutaraldehyde 25%, electron microscopic grade (Sigma).
  8. Bahan substrat: p-nitrophenyl phosphate (PNPP), diethanolamine, tetramethyl benzidine (TMB), dimethylsulfoxide (DMSO).
  9.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaOH}$ , dan  $\text{HCl}$ .
-