

## TINJAUAN

# Potensi Pemanfaatan Perangkat Diagnostik ELISA serta Variannya untuk Deteksi Patogen Tanaman

Yadi Suryadi, Ifa Manzila, dan M. Machmud

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

## ABSTRACT

**Prospect of the Use of Serological Diagnostic Kits ELISA and Its Variants for Detection of Plant Pathogens. Y. Suryadi, Ifa Manzila, and M. Machmud.** Diseases are major constraints to agricultural crop productions in Indonesia. In the current free world trade system, the chances of introduction of plant quarantine agents are higher, and are difficult to control, due to importation of seeds and other planting materials. Principles of the plant disease control include exclusion and eradication. Early and accurate disease diagnosis is an early and important step for a successful disease control. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) is a promising technique for an aneffective and efficient disease diagnosis. Some advantages of technique over the conventional and molecular diagnostic techniques are economical use of reagents, high sensitivity, relatively simple and quick, suitable for large numbers of samples, and adaptable for automation. In the past decade, several variants and kits of ELISA had been introduced, such as Indirect ELISA, F(ab')<sub>2</sub> ELISA, Dot Blot ELISA, and Immuno Fluorescence Assay (ELFA). Based on the solid membrane used, the Dot Blot ELISA some variants were developed, such as the NCM-ELISA, Tissue Blotting ELISA, dan Paper ELISA. The ELISA variants had different limit of detection levels. The limit detection of the variants for bacteria is ranging from 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> cells/ml, while those for viruses were from 1-10 ng/ml. The times required for the ELISA tests ranging from 5-48 hours. Models and components of ELISA kits for some viral and bacterial plant pathogens had been developed, but more are still needed since generally for each pathogen needs a different kit. The commercially available ELISA kits are limited in numbers, some of them are for pathogens that are not present in Indonesia. Production of ELISA kits for domestic uses will be more effective and efficient, particularly for pathogens that are present in the country. The ELISA kits are applicable not only for detection and identification of pathogens, but also for ecological study of the pathogens in conjunction with epidemiological study of the disease. This paper is a brief review on the ELISA technique and its variants and potential uses for detection of plant pathogens.

**Key words:** ELISA variants, diagnostic kit, plant disease diagnosis.

## PENDAHULUAN

Penyakit merupakan salah satu kendala utama produksi berbagai tanaman pertanian di Indonesia, termasuk tanaman pangan dan hortikultura. Sebagai contoh, penyakit layu yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum* (RS) tersebar luas dan menimbulkan kerugian hingga 60% pada kacang tanah dan tanaman Solanaceae, terutama kentang (Mehan *et al.* 1994). Penyakit layu bakteri juga telah meluas ke berbagai sentra produksi pisang di Indonesia, seperti Lampung dan Sumatera Barat, dan menimbulkan kerugian yang besar (Subandiyah 2002). Penyakit hawar bakteri (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, PSG) dan bisul bakteri (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) pada tanaman kedelai dapat menurunkan hasil 11-20% (Suryadi 1989). Akhir-akhir ini, epidemi beberapa penyakit padi, seperti hawar daun bakteri (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, XOO), kerdil hampa (*Rice Ragged Stunt Virus*, RRSV), dan tungro (*Rice Tungro Spherical Virus*, RTSV, dan *Rice Tungro Bacilliform Virus*, RTBV) juga meningkat di berbagai daerah di Indonesia (Widiarta 2006, Triny *et al.* 2007, Praptana dan Yasin 2008).

Benih merupakan sumber penular penyakit yang sangat penting, karena sebagian besar patogen tanaman bersifat 'tular benih' (*seed borne*). Benih terinfeksi atau terkontaminasi patogen dapat menjadi sumber epidemi penyakit di lapang. Benih terinfeksi dapat menunjukkan gejala penyakit atau tidak bergejala (*latent infection*). Sejalan dengan program peningkatan produksi pangan nasional, pemerintah mengimpor benih dan bahan tanaman lain, seperti jagung, padi, dan kentang. Hal ini memberi peluang masuknya Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina (OPTK), termasuk patogen tanaman belum terdapat di Indonesia (OPTK A1) yang berbahaya (Badan Karantina Pertanian 2004a).

Keberhasilan pengendalian penyakit tanaman sangat ditentukan oleh keberhasilan mendiagnosis penyakit secara cepat dan akurat. Tahapan kegiatan diagnosis meliputi deteksi dan identifikasi patogen secara lengkap mencakup faktor-faktor biologis dan non

biologis. Di masa lalu, diagnosis penyakit dan identifikasi penyakit tanaman berdasarkan gejala, pengamatan morfologi, serta reaksi fisiologi dan biokimia. Teknik konvensional memerlukan waktu lama (2-4 minggu), banyak bahan kimia, mahal, dan kepekaannya rendah (Thomas *et al.* 1989). Teknik molekuler seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) cepat, akurat, dan peka, tetapi bahan kimianya harus diimpor dengan harga mahal, dan tidak dapat diadopsi oleh semua laboratorium atau digunakan langsung di lapang, sehingga tidak efisien. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan teknik serologi canggih yang menjanjikan untuk deteksi dan identifikasi patogen tumbuhan (Seal dan Elpninstone 1994, Converse dan Martin 1990). Teknik ini dapat diterima secara luas oleh penggunaannya, karena: (1) efisien menggunakan bahan kimia, 1,0 ml antiserum dapat digunakan untuk menguji 10-20 ribu sampel; (2) bahan kimia yang digunakan tidak berbahaya dan memiliki daya simpan lama; (3) bahan yang diuji dapat langsung berupa ekstrak tanaman sakit tanpa harus mengisolasi patogennya terlebih dahulu; (4) mempunyai kepekaan deteksi tinggi (1-10 ng virus/ml dan  $10^3$ - $10^4$  sel bakteri/ml); (5) prosedurnya relatif sederhana dan cepat, antara 5-24 jam; (6) hasilnya dapat kuantifikasi; (7) dapat digunakan untuk menguji sampel dalam jumlah besar sekaligus; dan (8) dapat digunakan langsung di lapang (Thomas *et al.* 1989, Converse dan Martin 1990). Seiring dengan perkembangannya, teknik ELISA mengalami berbagai modifikasi baik dari segi praktis maupun kehandalannya (*robustness*), sehingga muncul berbagai variannya (Randles *et al.* 1996, Seal 1997).

Makalah ini merupakan bahasan pustaka tentang teknik ELISA dan beberapa variannya serta peluang pemanfaatan teknik dan perangkat diagnostik ELISA untuk deteksi dan identifikasi patogen tanaman.

## DASAR TEKNIK ELISA DAN PERKEMBANGAN VARIANNYA

### Dasar Teknik ELISA

Sebagai teknik serologi, prinsip dasar ELISA adalah reaksi antara antigen (Ag) dengan antibodi (Ab) menjadi molekul Ag-Ab yang lebih besar dan mudah mengendap. Perbedaannya, pengamatan hasil reaksi pada serologi biasa berdasarkan endapan molekul Ag-Ab, sedangkan pada ELISA berdasarkan perubahan warna yang terjadi pada substrat pereaksi sesuai dengan label atau imunoprob (*immuno probe*) konjugat Ab-enzim. Perubahan warna terjadi akibat hidrolisa enzimatis pada reaksi antara konjugat Ab-enzim dengan substratnya, sehingga hasil ELISA lebih

peka dan dapat dikuantifikasi (Converse dan Martin 1990).

Tahapan umum ELISA meliputi penempelan (*trapping*) Ag atau Ab pada media reaksi (*solid phase*), seperti cawan ELISA, diikuti penambahan konjugat Ab-enzim, dan diakhiri dengan penambahan substrat serta bufer penghenti reaksi (*blocking buffer*). Uraian rinci tentang berbagai teknik serologi termasuk ELISA dijumpai di pustaka acuan (Thomas *et al.* 1989, Converse dan Martin 1990, Randles *et al.* 1996)

### Komponen Perangkat ELISA

Komponen utama perangkat ELISA terdiri atas Ab, Ag, imunoprob, substrat, reagen penghenti reaksi (*blocking reagent*), bufer, dan cawan ELISA. Perangkat ELISA dapat dirakit sendiri oleh peneliti atau diperoleh secara komersial dari berbagai perusahaan di luar negeri, seperti Agdia Inc. (Folkhart, Indiana), dan Neogen Inc. (Scotland).

**Antibodi.** Ab adalah immunoglobulin (Ig) dari hewan yang diimunisasi Ag patogen sasaran (AgP). Berdasarkan teknik produksi dan spesifisitas reaksinya, Ab dibedakan menjadi Ab poliklonal (PAb) dan Ab monoklonal (MAb), sedangkan menurut bentuk molekulnya dibedakan menjadi Ab dan  $F(ab')_2$ . Ab juga dibedakan menjadi Ab primer (AbP) dan Ab sekunder (AbS). AbP adalah Ab yang homolog atau bereaksi dengan AgP, diproduksi dengan mengimmunisasi hewan, seperti mencit dan kelinci, dengan AgP. AbS atau anti-AbP adalah Ab yang diproduksi dengan mengimmunisasi hewan lain seperti kambing (*goat*) dengan AbP. Teknik produksi Ab dan modifikasinya diuraikan secara rinci oleh Ball *et al.* dan Jordan (Hampton *et al.* 1990).

**Antigen.** Ag yang digunakan sebagai AgP pada teknik ELISA adalah partikel virus, sel bakteri, propagul jamur, atau senyawa protein dan polisakarida patogen yang antigenik, dapat merangsang timbulnya Ab pada hewan yang diimmunisasi. AgP digunakan sebagai kontrol positif pada uji ELISA. Cara pembuatan Ag virus dan Ag bakteri dibahas masing-masing secara rinci oleh Brakke serta deBoer dan Schaad (Hampton *et al.* 1990).

**Imunoprob (*Immunoprobe*).** Imunoprob untuk ELISA dibuat dengan mengkonjugasikan Ab dengan suatu enzim menjadi 'konjugat Ab-enzim'. Konjugat ini dapat dibuat dengan mengkonjugasikan AbP atau AbS dengan enzim tertentu. Enzim yang digunakan untuk membuat konjugat beragam, yang paling umum adalah *Alkaline Phosphatase* (AP) dan *Horse-radish Peroxidase* (HRP) (Converse dan Martin 1990). Cara pembuatan imunoprob diuraikan secara rinci oleh MacKenzie (1990).

**Substrat dan bahan kimia lain.** Senyawa kimia yang digunakan sebagai media (*substrate*) untuk reaksi enzimatis berbeda-beda, bergantung pada enzim yang digunakan. Enzim AP memerlukan *p-nitrophenyl phosphate* (PNPP) yang dilarutkan dalam *diethanolamine* 10%. Substrat ini dihidrolisis oleh enzim menjadi *p-nitrophenyl* (PNP) yang berwarna kuning. Enzim HRP menggunakan substrat *tetramethyl benzidine* (TMB) yang dilarutkan dalam *dimethylsulfoxide* (DMSO), substrat ini dihidrolisis menjadi enzim menjadi produk berwarna biru (Priou 2001).

Reagen lain yang diperlukan dalam ELISA adalah bufer, *blocking reagent*, dan pelarut substrat. Bufer dasar yang paling sering digunakan dalam ELISA adalah bufer fosfat (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) dan bufer karbonat. Bufer lain, seperti bufer ekstraksi, bufer pencuci, bufer Ab, bufer konjugat, dan bufer substrat dibuat dengan menambahkan senyawa kimia tertentu seperti Tween-20, *polyvinylpyrrolidone* (PVP), dan *2-mercaptoethanol* pada bufer dasar. Senyawa yang sering digunakan untuk *blocking reagents* adalah *bovine serum albumin* (BSA), ovalbumin (OA), gelatin, susu skim, NaOH, dan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) (Lazarovits 1990).

**Cawan ELISA.** Tempat reaksi ELISA yang mula-mula digunakan adalah cawan *polystyrene* berlubang 96 buah yang disebut cawan ELISA (*ELISA plate*) atau cawan mikrotiter (*microtiter plate*). Cawan lain yang terbuat dari *polyvinyl* dan bahan plastik lain juga telah digunakan. Cawan ELISA yang diproduksi oleh berbagai perusahaan dengan bahan dan merek berbeda memiliki kualitas pengikatan Ab (*Ab binding capacity*) yang bervariasi, sehingga pengguna perlu melakukan uji coba untuk memperoleh hasil optimal (Converse dan Martin 1990).

Seiring dengan perkembangan ELISA, berbagai bahan lain telah digunakan untuk tempat reaksi, seperti manik-manik plastik (*plastic beads*), membran nitroselulosa (*nitrocellulose membrane*, NCM), formvar, dan berbagai jenis kertas juga digunakan sebagai tempat reaksi (Thomas *et al.* 1989, Makkouk dan Kumari 2002).

### Perkembangan Varian ELISA

Teknik ELISA yang mula-mula diadopsi untuk deteksi patogen tumbuhan adalah *Double Antibody Sandwich* ELISA (DAS-ELISA). Teknik ini disebut DAS-ELISA, karena dalam reaksi, AgP diapit (*sandwiched*) oleh dua lapis Ab, yaitu AbP dan Ab pada konjugat (imunoprob). Tahapan reaksi diawali dengan melekatkan AbP ke lubang cawan ELISA, diikuti berturut-turut dengan menambahkan AgP, konjugat AbP-enzim, dan

substrat, dan diakhiri dengan penambahan *blocking reagent* (Converse dan Martin 1990).

Varian ELISA adalah modifikasi atau pengembangan DAS-ELISA untuk meningkatkan efektifitas dan efisiensinya, terutama sensitivitas (akurasi dan kepekaan) dan kecepatan (waktu) reaksi serta efisiensi biaya. Varian-varian ELISA yang potensial digunakan untuk deteksi dan identifikasi patogen tumbuhan adalah DAS-ELISA Langsung, DAS-ELISA Tidak Langsung (*Indirect* DAS-ELISA, IDAS-ELISA),  $F(ab')_2$  ELISA, *Dot Blot* ELISA, dan *Enzyme-linked Fluorescence Assay* (ELFA) (Hampton *et al.* 1990).

**DAS-ELISA Langsung.** Teknik ini disebut DAS-ELISA Langsung, karena pengujian dilakukan dengan DAS-ELISA menggunakan imunoprob AbP-enzim. Tahapan reaksinya diawali dengan melekatkan AbP ke lubang cawan ELISA diikuti secara berturut-turut dengan menambahkan AgP, konjugat AbP-enzim, substrat, dan diakhiri dengan *blocking reagent*. Jika reagen yang pertama kali dimasukkan adalah AgP dan diikuti langsung dengan konjugat AbP-enzim, maka varian ini disebut ELISA Langsung, karena AgP tidak diapit AbP.

**DAS-ELISA Tidak Langsung.** Teknik ini dinamakan tidak langsung karena imunoprob yang digunakan bukan AbP-enzim, tetapi AbS-enzim. Tahapan reaksinya sama dengan DAS-ELISA Langsung, bedanya hanya pada imunoprob yang digunakan. Menurut Randles *et al.* (1996) dan Smith dan Elphinstone (1994), DAS-ELISA Tidak Langsung lebih sensitif dibandingkan DAS-ELISA Langsung untuk deteksi bakteri patogen tanaman. Teknik DAS-ELISA Langsung biasanya digunakan untuk deteksi virus tanaman (Converse dan Martin 1990).

**$F(ab')_2$ -ELISA.** Tahapan teknik  $F(ab')_2$ -ELISA pada dasarnya juga sama dengan DAS-ELISA, dapat dilakukan  $F(ab')_2$ -ELISA Langsung dan  $F(ab')_2$ -ELISA Tidak langsung. Pada teknik ini Ab yang digunakan adalah  $F(ab')_2$ , yaitu Ab yang merupakan modifikasi dari Ab. Imunoprob yang digunakan adalah AbP-enzim pada  $F(ab')_2$ -ELISA Langsung, sedangkan pada  $F(ab')_2$ -ELISA Tidak langsung menggunakan AbS-enzim. Protein A *Staphylococcus aureus* telah digunakan sebagai komponen imunoprob untuk meningkatkan kualitas hasil, baik dikonjugasikan dengan AbP-enzim maupun AbS-enzim.  $F(ab')_2$ -ELISA setahap lebih pendek daripada DAS-ELISA, tetapi memerlukan dua tahapan persiapan lain, yaitu mengubah Ab menjadi  $F(ab')_2$  dan pembuatan konjugat Ab-Enzim-Protein A *Staphylococcus aureus*. Beberapa pengguna di luar negeri menyukai varian ini, karena lebih peka dan efisien waktu, sedangkan imunoprob  $F(ab')_2$ -enzim-Protein A dapat dibeli. IDAS-ELISA dan  $F(ab')_2$ -ELISA sesuai untuk ber-

bagai tujuan, termasuk deteksi virus yang berkerabat jauh (Converse dan Martin 1990).

Diagram beberapa varian teknik ELISA untuk deteksi patogen tanaman berdasarkan susunan urutan reaktan (pereaksi) yang dimasukkan ke dalam cawan ELISA disajikan pada Gambar 1.

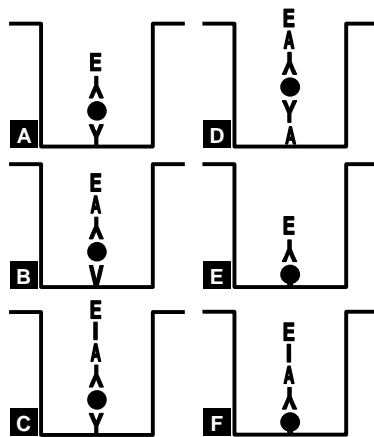
**Dot Blot ELISA.** Tempat reaksi pada teknik ELISA terdahulu adalah cawan ELISA, sedangkan pada *Dot Blot* ELISA menggunakan membran plastik atau kertas. Tahapan umum *Dot Blot* ELISA diawali dengan penetesan (*dot blotting*) Ag atau ekstrak tanaman uji (virus, bakteri, jamur) pada membran kemudian ditambahkan secara berturut-turut AbP, imunoprob, substrat, dan *blocking reagent*. Imunoprob yang digunakan biasanya *Goat Anti-Rabbit* (GAR) yang dikongjugasikan dengan enzim AP atau HRP, sedangkan substratnya adalah *nitroblue tetrazolium/bromochloro indoleacetyl phosphate* (NBT/BCIP) yang berwarna ungu pada reaksi positif. Uraian secara rinci tentang *Dot Blot* ELISA untuk virus tanaman dibahas oleh Hammond dan Jordan (1990), sedangkan untuk bakteri dan fitoplasma oleh Lazarovits (1990).

Teknik *Dot Blot* ELISA yang menggunakan membran nitroselulose (NCM) disebut NCM-ELISA (Nakano *et al.* 1994, Priou 2001), sedangkan yang menggunakan kertas juga disebut *tissue blotting* (Heide dan Lange 1988, Lin *et al.* 1990). Teknik ini mempunyai kepekaan

setara dengan DAS-ELISA, tetapi lebih cepat dan praktis. Di samping itu, membran yang telah tetesi sampel Ag dapat disimpan beberapa minggu sebelum pengujian (Nakano *et al.* 1994, Priou 2001).

Di samping NCM, membran plastik lain telah digunakan pada *Dot Blot* ELISA di antaranya nylon, *polyvinylidene difluoride* (PVDF), *diazobenzyloxymethyl* (DBM), dan *diazophenyl-thioether* (DPT), masing-masing jenis membran memiliki kelebihan dan kekurangannya (Hammond dan Jordan 1990). Selain membran plastik, berbagai jenis kertas seperti kertas saring, kertas tulis, kertas fotokopi, kertas tisu dan kertas merang juga telah digunakan (Heide dan Lange 1988, Lin *et al.* 1990, Mariano *et al.* 1995, Makkouk dan Kumari 2002).

**Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA).** Sesuai dengan namanya, maka teknik ELFA menggunakan senyawa kimia yang dapat berfloresensi, seperti *methylumbelliferyl phosphate* (MUP) atau *4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-galactopyranoside* (MUG), sebagai pengganti PNPP atau TMB untuk substrat imunoprob yang menggunakan enzim AP atau HRP. Reaksi ELFA dapat dilakukan pada cawan ELISA atau membran dan hasil reaksi Ab-Ag sangat spesifik. MUG lebih disukai daripada MUP, karena MUP memiliki kelemahan, yaitu dapat mengalami degradasi secara spontan, sehingga menimbulkan latar belakang (*background*) yang mempengaruhi kualitas hasil. Teknik ini memiliki kepekaan setara dengan teknik Biotin-Avidin ELISA dan 10-25 kali lebih peka daripada DAS-ELISA (Hill 1990).



**Gambar 1.** Diagram enam varian teknik ELISA yang menunjukkan susunan reaktan (pereaksi) untuk deteksi virus patogen tanaman. [A] = DAS-ELISA Langsung, [B] =  $F(ab')_2$  ELISA Tidak Langsung, [C] = DAS-ELISA Tidak Langsung, [D] = DAS-ELISA dengan konjugat Protein A yang dilekatkan pada lubang cawan ELISA, [E] = ELISA Langsung dengan Ag virus dilekatkan pada lubang cawan, [F] = ELISA Tidak Langsung dengan Ag dilekatkan pada lubang cawan. Y = Ab virus, V =  $F(ab')_2$  virus, YE = konjugat Ab virus-enzim, • = Ag (virus), A = protein A, AE = konjugat Protein A-enzim, A-E = konjugat Ig hewan pertama-enzim.

**Sumber:** Converse dan Martin (1990).

## APLIKASI TEKNIK DAN PERANGKAT ELISA

Sejak diadopsi pertama kali untuk deteksi virus tanaman pada awal 1970-an (Clark dan Adams 1977), teknik ELISA telah digunakan di luar negeri untuk deteksi dan identifikasi berbagai patogen tanaman termasuk virus, fitoplasma, bakteri, nematoda, dan jamur. Lebih dari 100 jenis patogen utama tanaman pertanian telah dideteksi dengan ELISA Teknik ini juga telah digunakan untuk kajian epidemiologi dan menelusuri proses infeksi pada tanaman (Converse dan Martin 1990). Perangkat ELISA dan komponen ELISA untuk berbagai patogen tanaman juga telah diproduksi dan dikomersialisasikan oleh berbagai perusahaan, seperti Sigma-Aldrich ([sigma-aldrich-sea.com](http://sigma-aldrich-sea.com)), Agdia (<http://www.agdia.com>), dan Neurogen Inc. (<http://www.neogeneurope.com>).

Aplikasi teknik dan perangkat ELISA di Indonesia umumnya masih terbatas pada taraf penelitian. Penggunaan praktis perangkat ELISA telah dilakukan oleh petugas Badan Karantina Pertanian, terutama untuk intesepsi OPTK.

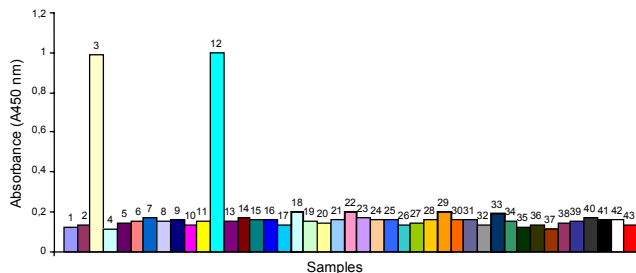
**Aplikasi DAS-ELISA.** Teknik DAS-ELISA Langsung dan Tidak Langsung paling sering digunakan untuk deteksi virus dan bakteri *in planta*. Lebih dari 15 bakteri patogen dan risosfir telah dideteksi menggunakan DAS-ELISA Teknik ELISA Tidak Langsung lebih banyak digunakan untuk deteksi bakteri dan fitoplasma, uji spesifisitas Ab, dan identifikasi bakteri tanah dan risosfir. Lamka *et al.* (1991) mengembangkan teknik ELISA Langsung untuk *Pantoea stewartii*, penyebab penyakit layu Stewart (*Stewart's wilt*) yang belum ada di Indonesia. Randles *et al.* (1996) menggunakan DAS-ELISA untuk deteksi bakteri *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XCC) dan *Curtobacterium michiganense* pv. *sepedonicus* (CMS). Varian DAS-ELISA dengan perangkat dan Ab spesifik juga telah dibuat untuk deteksi jamur *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ras 4 (foc-4) penyebab penyakit 'Panama' pada pisang, bakteri *X. campestris* pv. *phaseoli* penyebab hawar pada buncis, dan jamur *Ascochyta* spp. (Thomas *et al.* 1989).

Di Indonesia, DAS-ELISA telah digunakan untuk deteksi dan identifikasi beberapa virus dan bakteri patogen. Jumanto *et al.* (2001) menggunakan DAS-ELISA Langsung untuk deteksi RTV pada padi dan serangga vektornya, bahkan untuk seleksi ketahanan varietas padi terhadap penyakit tungro. Suryadi *et al.* (2007) menggunakan DAS-ELISA Tidak Langsung dengan PAB-RS9819 untuk deteksi bakteri RS dari biji dan tanaman kacang tanah dengan kepekaan deteksi 10<sup>4</sup> sel/ml, serupa yang dilaporkan Smith (1994) dan setara dengan deteksi menggunakan PAB yang dilakukan di CIP, Peru (Priou 2001).

Perangkat ELISA Tidak Langsung produksi Agdia Inc., Lockhart, Indiana, telah digunakan Badan Karantina Pertanian untuk mengintersepsi bakteri layu Stewart (*Pantoea stewartii* syn: *Erwinia stewartii*) dan virus MMV (*Maize Mosaic Virus*) pada benih jagung yang diimpor dari Thailand dan India 1999 dan 2000 sebagian contoh jagung asal Thailand terinfestasi *P. stewartii* dan dimusnahkan (Machmud *et al.* tidak dipublikasi). Teknik dan perangkat ini juga telah digunakan oleh Tim Pemeriksaan Pra-pengapalan, Badan Karantina Pertanian, untuk intersepsi OPTK A1 pada benih jagung manis yang akan diimpor dari Thailand dan India (Badan Karantina Pertanian 2004b). Tim ini melaporkan bahwa salah satu sampel yang diambil dari 40 lot jagung NK22, yaitu Lot No. 12 positif mengandung virus MMV (Gambar 2).

Beberapa contoh aplikasi teknik ELISA Langsung dan Tidak Langsung untuk deteksi patogen tanaman disajikan pada Tabel 1.

**Aplikasi Dot Blot ELISA.** *Dot Blot* ELISA sangat ideal untuk deteksi bakteri dan prokariota lain baik dari biakan murni maupun ekstrak tanaman karena



**Gambar 2.** Contoh kasus hasil deteksi Maize Mosaic Virus (MMV), OPTK A1, dari 40 sampel benih jagung manis hibrida asal dengan teknik DAS-ELISA. 1 = bufer (kontrol negatif), 2 = kontrol negatif (Agdia, Agdia Inc.), 3 = kontrol positif MMV (Agdia Inc.), 4-43 = sampel dari lot benih yang diuji. 12 = sampel lot benih NK22 bereaksi positif.

Sumber: Tim PSI Thailand (2004, tidak dipublikasi).

**Tabel 1.** Aplikasi teknik dan perangkat DAS-ELISA serta variannya untuk deteksi virus dan bakteri patogen tanaman.

Tanaman	Patogen sasaran	Sumber referensi
Padi	RRSV, XOO	Suryadi <i>et al.</i> (2006), Suryadi <i>et al.</i> (2007)
Kedelai	PSG, XAG, SMV, dan virus lain	Suryadi dan Machmud (2006), Hill (1990)
Kacang tanah	RS, PMV, PmoV, PSTV	Hobbs <i>et al.</i> (1987), Machmud dan Suryadi (2006)
Ubi jalar	Virus daun: SPFMV, SPCFV, SPLV, SPMMV, C6, C8	Manzila <i>et al.</i> (1997), Gibson <i>et al.</i> (1998), Karyeija <i>et al.</i> (2001), Gutierrez <i>et al.</i> (2003), Machmud <i>et al.</i> (2004), Kwak <i>et al.</i> (2006)
Tomat	RS, <i>Tomato Mosaic Virus</i>	Suryadi (tidak dipublikasi)
Kentang	RS, CMS, <i>Potato Virus S, X and Y, PLRV</i>	Heide dan Lange (1988), Charlotte dan Northcote (1989), Priou (2001), Gunawan <i>et al.</i> (2001), Machmud dan Suryadi (2006)

CMS = *Clavibacter michiganense* pv. *sepedonicus*, RRSV = *Rice Ragged Stunt Virus*, XOO = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryza*, RS = *Ralstonia solanacearu*, PSTV = *Peanut Stripe Virus*, PSG = *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, XAG = *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, SPFMV = *Sweetpotato Feathery Mosaic Virus*, SPCFV = *Sweet Potato Corky Virus*, SPLV = *Sweet Potato Leaf Roll Virus*, SPMMV = *Sweet Potato Mild Mottle Virus*.

cepat, sederhana, memerlukan sedikit reagen, dan kepekaannya setara dengan varian ELISA lain. Di antara varian *Dot Blot* ELISA, yang paling populer adalah NCM-ELISA. Teknik ini telah digunakan untuk deteksi *Escherichia coli*, berbagai patovar *X. Campestris*, *E. amylovora*, *E. carotovora*, *Pseudomonas lachrymans*, *Spiroplasma citri*, *Curtobacterium fascians* (Lazarovits 1990).

Lin *et al.* (1990) menggunakan NCM-ELISA untuk deteksi virus dan MLO dengan hasil memuaskan. Nakano *et al.* (1994) mengembangkan dan menggunakan teknik serta perangkat NCM-ELISA untuk deteksi 6 virus ubi jalar (SPFMV, SPCFV, SPLV, SPMMV, C-6, dan C-8) di CIP, Lima, Peru. Perangkat dan protokol NCM

ELISA untuk 6 virus ubi jalar tersebut juga telah diproduksi dan dikomersialkan oleh *International Potato Center* (CIP), Lima, Peru. Perangkat ini telah digunakan untuk deteksi virus ubi jalar di berbagai negara di Amerika Tengah dan Selatan, Afrika, Asia Tenggara, serta di Cina (Nakano *et al.* 1994), dan Korea (Kwak *et al.* 2006) dengan hasil yang baik. Di CIP Peru, Priou (2001) juga mengembangkan NCM-ELISA untuk deteksi RS pada kentang dengan kepekaan deteksi  $10^4$  sel/ml.

Modifikasi NCM-ELISA telah dilakukan untuk meningkatkan efisiensinya. Mariano *et al.* (1995) melakukan modifikasi NCM-ELISA untuk deteksi RS pada umbi kentang dengan menggunakan 8 jenis kertas produksi Filipina sebagai pengganti NCM yang relatif mahal dan harus diimpor dan hasilnya dinyatakan setara dengan hasil NCM-ELISA. Makkouk dan Kumari (2002) juga mencoba mengganti NCM dengan 6 jenis kertas, termasuk kertas saring dan kertas fotokopi, untuk deteksi tiga virus, *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV), *Bean Yellow Mosaic Virus* (BYMV), *Broad Bean Stain Virus* (BBSV), dan *Barley Yellow Striate Mosaic Virus* (BYSMV), hasilnya juga dinyatakan cukup baik dan dapat menekan biaya uji 40-50% daripada biaya dengan menggunakan NCM.

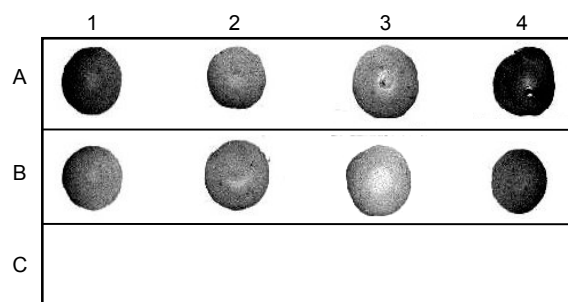
Varian *Dot Blot* ELISA menggunakan berbagai jenis kertas sebagai pengganti NCM telah digunakan untuk beberapa jenis patogen. Di Filipina, Mariano *et al.* (1995) telah menggunakan 8 jenis kertas termasuk kertas filter dan produk kertas lokal serta menyatakan dapat digunakan untuk deteksi RS pada umbi kentang, hasilnya setara dengan yang menggunakan NCM. Makkouk dan Kumari (2002) juga telah menggunakan kertas, termasuk kertas fotokopi dan kertas tulis untuk deteksi *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV), *Bean Yellow Mosaic Virus* (BYMV), dan *Broad Bean Stain Virus* (BBSV) pada jaringan *faba bean* serta *Barley Yellow Striate Mosaic Virus* (BYSMV) pada jaringan *barley*. Mereka menyatakan bahwa penggunaan kertas biasa dapat menghemat biaya uji lebih dari 40-50%. Varian *Dot Blot* ELISA dengan penambahan *disodium ethylenediaminetetraacetate* ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ) 0,02 M ke dalam bufer ekstraksi juga telah dibuktikan dapat meningkatkan kepekaan NCM-ELISA untuk deteksi *Potato Virus X* (PVX) dan *Potato Virus Y* (PVY) dari ekstrak daun kentang (Lazarovits 1990).

Di Indonesia, perangkat NCM-ELISA dari CIP, Peru, telah digunakan untuk deteksi virus pada sampel tanaman dari berbagai sentra produksi ubi jalar di Jawa Tengah dan Jawa Timur (Manzila *et al.* 1997) dengan 6 Ab virus ubi jalar (SPFMV, SPCFV, SPLV, SPMMV, C-6, dan C-8). Keenam virus tersebut terdapat pada kultivar ubi jalar yang ditanam di berbagai

daerah. Perangkat ini juga telah digunakan untuk mendeteksi keberadaan keenam virus tersebut pada koleksi plasma nutfah ubi jalar Papua yang ditanam di Lembang. Keenam virus tersebut terdapat pada sebagian plasma nutfah dengan intensitas infeksi SPFMV 49,2%, SPMMV 11,9%, SPCFV 13,4%, SPLV 11,9%, C-6 1,4%, dan C-8 1,4% (Machmud *et al.* 2004). Asadi (2003, 2004) memanfaatkan NCM-ELISA untuk deteksi virus kerdil kedelai (*Soybean Stunt Virus*, SSV) dan menyeleksi ketahanan plasma nutfah kedelai terhadap penyakit kerdil kedelai.

NCM-ELISA juga telah digunakan untuk deteksi beberapa bakteri patogen tanaman lainnya, seperti CMS, PSG, RS, dan XOO. Suryadi dan Machmud (2006) mendeteksi PSG pada benih dan tanaman kedelai dari lapang menggunakan Pab-PSG dengan kepekaan deteksi  $10^4\text{-}10^5$  sel/ml (Tabel 1). Gunawan *et al.* (2001) dengan perangkat NCM-ELISA asal CIP, Peru, berhasil mendeteksi RS dari ekstrak tanaman kentang asal Lembang. Suryadi *et al.* (2006, 2007) yang mengadopsi NCM-ELISA untuk deteksi RS pada tanaman kacang tanah dan XOO pada benih padi juga berhasil baik dengan kepekaan deteksi  $10^4$  sel/ml. Pada tahun 2005, Machmud *et al.* (*tidak dipublikasi*) menggunakan teknik NCM-ELISA dengan Mab-CMS (Agdia Inc., Lockhart, Indiana) untuk mengintersepsi bakteri *Curtobacterium michiganense* pv. *sepedonicus* (CMS), OPTK A1, dari umbi benih kentang asal Skotlandia, hasilnya menunjukkan bahwa beberapa contoh umbi benih kentang positif mengandung CMS.

Contoh penampilan hasil uji NCM-ELISA untuk deteksi bakteri RS disajikan pada Gambar 3, dan beberapa patogen tanaman yang telah dideteksi dengan NCM-ELISA disajikan pada Tabel 2.



**Gambar 3.** Hasil deteksi bakteri *Ralstonia solanacearum* (RS) dari tanaman kacang tanah dan kentang dengan teknik NCM-ELISA menggunakan Pab-RS9819. Baris A nomor 1, 2, dan 3 = sampel kacang tanah terinfeksi RS, Baris B nomor 1, 2, dan 3 = sampel kentang terinfeksi RS. Bercak A4 dan B4 = kontrol positif. Baris C nomor 1, 2, dan 3 = kontrol negatif (bufer), tidak ada bercak. Reaksi positif ditandai dengan bercak biru.

Sumber: Suryadi (*tidak dipublikasi*).

**Aplikasi teknik ELFA.** Hill (1990) menyatakan bahwa teknik ELFA dapat digunakan untuk semua patogen yang dapat dideteksi dengan teknik ELISA lain.

**Tabel 2.** Beberapa patogen tanaman pertanian yang telah dideteksi dengan teknik dan perangkat NCM-ELISA.

Tanaman	Patogen sasaran	Sumber referensi
Padi	RRSV, XOO	Suryadi <i>et al.</i> (2006), Suryadi <i>et al.</i> (2007)
Kedelai	PSG, XAG, SMV dan virus lain	Suryadi dan Machmud (2006), Hill (1990), Asadi ( <i>tidak dipublikasi</i> )
Kacang tanah	RS, PStV	Machmud dan Suryadi (2006)
Ubi jalar	Virus daun: SPFMV, SPCFV, SPLV, SPMMV, C6, C8	Manzila <i>et al.</i> (1997), Gibson <i>et al.</i> (1998), Karyeija <i>et al.</i> (2001), Gutierrez <i>et al.</i> (2003), Machmud <i>et al.</i> (2004), Kwak <i>et al.</i> (2006)
Tomat	RS	Suryadi ( <i>tidak dipublikasi</i> )
Kentang	RS, CMS, Potato Virus X and Y	Priou (2001), Machmud <i>et al.</i> ( <i>tidak dipublikasi</i> ), Charlotte dan Northcote (1989), Gunawan <i>et al.</i> (2001)

CMS = *Clavibacter michiganense* pv. *sepedonicus*, RRSV = *Rice Ragged Stunt Virus*, XOO = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryza*, RS = *Ralstonia solanacearum*, PStV = *Peanut Stripe Virus*, PSG = *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, XAG = *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, SPFMV = *Sweet Potato Feathery Mosaic Virus*, SPCFV = *Sweet Potato Corky Virus*, SPLV = *Sweet Potato Leaf Roll Virus*, SPMMV = *Sweet Potato Mild Mottle Virus*. SMV = *Soybean Mosaic Virus*, SSV = *Soybean Stunt Virus*.

**Tabel 3.** Kepekaan deteksi beberapa varian teknik ELISA untuk berbagai bakteri patogen tanaman.

Nama bakteri	Limit deteksi (CFU/ml)	Teknik ELISA	Sumber referensi
<i>Rhizobium</i> spp.	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	DAS	McLaughlin dan Chen (1990)
<i>Azospirillum basilense</i>	10 <sup>4</sup>	DAS	McLaughlin dan Chen (1990)
<i>Erwinia amylovora</i>	10 <sup>4</sup>	IDAS, NCM	Lazarovits (1990)
<i>E. carotovora</i> pv. <i>atroseptica</i>	10 <sup>4</sup>	IDAS	Converse dan Martin (1990)
<i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	10 <sup>4</sup>	NCM	Lazarovits (1990)
<i>Clavibacter michiganense</i> pv. <i>sepedonicus</i>	10 <sup>6</sup>	NCM	Lazarovits (1990)
<i>Corynebacterium fascians</i>	10 <sup>4</sup>	NCM	Lazarovits (1990)
<i>Pantoea stewartii</i>	10 <sup>5</sup>	IDAS	Converse dan Martin (1990)
<i>Pseudomonas lachrymans</i>	10 <sup>4</sup>	IDAS	Lazarovits (1990)
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	NCM	Suryadi dan Machmud (2006)
<i>Ralstonia solanacearum</i> (sin.: <i>Ralstonia solanacearum</i> )	10 <sup>4</sup>	IDAS, NCM	Rajeshwari <i>et al.</i> (1998), Smith (1994), Seal (1997), Priou (2001), Suryadi <i>et al.</i> (2006)

\*CFU/ml = colony forming unit atau sel hidup per ml.

Teknik ini telah digunakan dengan baik untuk deteksi beberapa jenis virus dan bakteri patogen dari biji atau umbi, di antaranya *Soybean Mosaic Virus* (SMV) pada kedelai dan *Lettuce Mosaic Virus* (LMV) pada *lettuce*, dan *Clavibacter michiganense* pv. *sepedonicus* (CMS) pada umbi kentang. Kendala teknik ELFA adalah munculnya reaksi floresensi yang terjadi secara otomatis (*autofluorescence*) pada beberapa jenis tanaman, sehingga mempengaruhi hasil pengamatan.

Pada Tabel 3 disajikan kepekaan atau limit deteksi beberapa varian teknik ELISA untuk deteksi beberapa jenis patogen.

### PELUANG DAN TANTANGAN PEMANFAATAN PERANGKAT ELISA

Peluang pemanfaatan teknik dan perangkat ELISA untuk diagnosis penyakit tanaman di Indonesia sangat baik, paling tidak karena dua faktor utama, yaitu (1) kondisi geografik Indonesia, dan (2) sistem perdagangan bebas dunia. Indonesia yang terletak di daerah tropik dan beriklim basah menjadi tempat yang sangat kondusif bagi kehidupan berbagai patogen yang mengancam produksi pertanian, sehingga pemantauan dan pengendalian penyakit perlu diutamakan. Pemantauan dan pengendalian penyakit memerlukan teknik dan perangkat diagnosis yang efektif dan efisien seperti ELISA.

Dalam sistem perdagangan bebas, ekspor dan impor komoditas pertanian semakin meningkat dan sulit dibatasi. Impor komoditas pertanian berpotensi membawa masuk patogen yang tidak ada di Indonesia (OPTK A1). Ekspor produk pertanian juga berpotensi membawa patogen dan memerlukan sertifikat sanitasi tanaman (*phytosanitary certificate*). Meningkatnya perdagangan komoditas tersebut membuat pekerjaan para petugas karantina pertanian dan sertifikasi benih menjadi semakin berat, harus berkerja lebih keras, cepat, dan efisien. Hal ini perlu didukung oleh ketersediaan teknologi deteksi dan identifikasi yang tepat guna.

Beberapa peluang lain untuk pemanfaatan teknik dan perangkat ELISA adalah:

1. Teknik produksi PAb, MAb, dan konjugat Ab-enzim telah dikembangkan oleh beberapa lembaga penelitian di Indonesia, lebih lanjut oleh *stakeholders* untuk produksi perangkat dan komponennya secara massal dalam rangka komersialisasi.
2. Model perangkat, komponen, dan protokol DAS-ELISA Tidak Langsung dan NCM-ELISA telah dirakit di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-Biogen) untuk deteksi beberapa patogen utama

tanaman, (PSg, RS, RSSV, dan XOO) dan dapat disosialisasikan kepada *stakeholders* untuk produksi masal dan komersialisasinya.

3. Sosialisasi manfaat dan aplikasi praktis teknik dan perangkat ELISA dapat dilakukan kepada para penggunanya, terutama mahasiswa, peneliti, petugas karantina, dan petugas sertifikasi benih melalui pelatihan dan lokakarya, seperti untuk uji kesehatan benih, intersepsi OPTK, serta kajian ekologi patogen dan epidemiologi penyakitnya.
4. Perangkat ELISA yang dirakit secara utuh dapat digunakan untuk deteksi patogen yang ada di Indonesia, sedangkan untuk OPTK A1, seluruh komponen perangkat ELISA dapat dibuat di dalam negeri, kecuali AbP atau konjugat AbP-enzimnya harus diimpor.
5. Beberapa lembaga penelitian memiliki sumber daya dan keterampilan memadai guna mengembangkan teknologi ELISA untuk patogen lain di Indonesia dengan mengoptimalkan penggunaan sumber daya lokal dan membatasi impor.
6. Perangkat dan komponen ELISA yang diproduksi di dalam negeri dapat: (a) mendukung upaya pengendalian penyakit yang efektif, (b) mengurangi biaya operasional pengendalian dengan menyediakan produk lokal yang harganya lebih terjangkau, dan (c) mengurangi ketergantungan terhadap produk impor, dan (4) memberikan peluang bisnis dan lapangan kerja domestik.

Beberapa kendala dan tantangan yang dapat terjadi dalam aplikasi teknologi dan perangkat ELISA adalah:

1. Hanya beberapa lembaga pemerintah di Indonesia yang saat ini memiliki sarana dan prasarana serta sumber daya manusia yang berpengetahuan dan keterampilan yang memadai tentang teknologi ELISA, sehingga belum dapat sepenuhnya mendukung program sosialisasi dan pemanfaatannya.
2. Sebagian besar bahan baku untuk komponen ELISA masih harus diimpor dari luar negeri. Beberapa perusahaan komersial yang menjual perangkat dan komponen ELISA di antaranya adalah Agdia Inc., Elkhart, Indiana, USA (<http://www.agdia.com>), dan Neurogen Inc. (<http://www.neogeneurope.com>), Scotland.
3. Teknik dan sebagian komponen perangkat ELISA untuk setiap patogen berbeda, terutama Ab dan konjugat Ab-enzimnya, sehingga perlu dilakukan penelitian berkelanjutan secara bertahap guna mengembangkan teknik dan membuat komponen ELISA untuk masing-masing patogen.

## KESIMPULAN

Sejak pertama kali diadopsi, teknik DAS-ELISA mengalami berbagai modifikasi dan perkembangan untuk meningkatkan efektifitas dan efisiensinya. Beberapa varian ELISA yang banyak digunakan adalah DAS-ELISA Langsung, ELISA Tidak Langsung, F(ab')<sub>2</sub> ELISA, *Dot Blot* ELISA, dan ELFA. Teknik ELISA di samping untuk deteksi dan identifikasi patogen juga dapat digunakan untuk kajian taksonomi, ekologi patogen, dan epidemiologi penyakit. Berdasarkan jenis membran reaksi yang digunakan, *Dot Blot* ELISA dibedakan menjadi NCM-ELISA, *tissue blotting* ELISA, dan ELISA kertas. Kepekaan atau limit deteksi teknik ELISA untuk bakteri berkisar antara 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> sel/ml dan untuk virus sekitar 1-10 ng/ml. Waktu pengujian berkisar antara 5-48 jam, bergantung pada jenis patogen yang dideteksi dan penyediaan sampel uji. Kebanyakan komponen dan perangkat ELISA yang digunakan di Indonesia saat ini masih harus diimpor dengan harga mahal. Model dan komponen perangkat ELISA untuk beberapa patogen telah dirakit dan berpotensi diproduksi masal untuk komersialisasi di Indonesia. Teknik dan perangkat ELISA perlu dikembangkan untuk patogen utama lain. Penggunaan teknik ELISA perlu disosialisasikan melalui lokakarya dan pelatihan untuk perakitan dan penggunaan teknik dan perangkatnya. Kerja sama dengan *stakeholders* perlu dilakukan untuk produksi masal perangkat ELISA untuk tujuan komersial.

## DAFTAR PUSTAKA

- Asadi. 2003.** Kendali genetik ketahanan kedelai terhadap penyakit virus kerdil kedelai (SSV). *Zuriat* 15(1):1-11.
- Asadi. 2004.** Keefektifan metode seleksi modifikasi bulk dan pedigree kedelai dan ketahanan terhadap penyakit virus kerdil kedelai (SSV) generasi F<sub>7</sub> kedelai. *Zuriat* 15(1):64-76.
- Badan Karantina Pertanian. 2004a.** Laporan hasil pemeriksaan pra-pengapalan (*Pre-Shipment Inspection*, PSI) benih jagung hibrida dari Thailand. Tim PSI Thailand, Badan Karantina Pertanian. 16 hlm.
- Badan Karantina Pertanian. 2004b.** Bahan temu teknis OPTK. Temu Koordinasi Karantina Tumbuhan. Badan Karantina Pertanian. **Charlotte, L. and E.N.F. Northcote. 1989.** Detection of potato viruses X and Y in sap extracts by a modified Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on nitrocellulose membranes (NCM-ELISA). *Plant Disease* 73:11-14.
- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977.** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.



- Converse, R.H. and R.R Martin. 1990.** ELISA methods for plant viruses. *In* Hampton, R., E. Ball, and S. De Boer (Eds.). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and bacterial Plant Patogens. APS Press, St Paul, Minn. p. 179-196.
- Gibson, R.W., I. Mpembe, T. Alicai, E.E. Carey, R.O.M. Mwanga, S.E. Seal, and H.J. Vetten. 1998.** Symptoms, etiology and serological analysis of sweet potato virus disease in Uganda. *Plant Pathol.* 47:95-102.
- Gunawan, O., R.S. Basuki, Z. Abidin, dan A. Asgar. 2001.** Strategi pengendalian penyakit layu bakteri (*R. solanacearum*) pada kentang di Pangalengan. Laporan Kerja Sama Balai Penelitian Tanaman Sayuran (Balitsa) dengan *International Potato Center* (CIP), Bogor. 43 hlm.
- Gutierrez, D.L., S. Fuentes, and L.F. Salazar. 2003.** Sweet Potato Virus Disease (SPVD): Distribution, incidence, and effect on sweet potato yield in Peru. *Plant Disease* 87:297-302.
- Hammond, J. and R.L. Jordan. 1990.** Dot blot (viruses) and colony screening. *In* Hampton, R., E. Ball, and S. De Boer (Eds.). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Patogens. APS Press, St Paul, Minn. p. 237-248.
- Hampton, R., E. Ball, and S. de Boer. 1990.** Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A Laboratory Manual. APS Press, St. Paul, Minn. 389 p.
- Heide, M. and L. Lange. 1988.** Detection of potato leaf roll virus and potato viruses M, S, X, and Y by dot immunobinding on plain paper. *Potato Res.* 31:367-373.
- Hill, J.H. 1990.** Enzyme-linked Fluorescent Assay. *In* Hampton, R., E. Ball, and S. De Boer (Eds.). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and bacterial Plant Patogens. APS Press, St Paul, Minn. p. 231-235.
- Hobbs, H.A., D.V.R. Reddy, R. Rajeshwari, and A.S. Reddy. 1987.** Use of direct antigen coating and protein A coating ELISA procedures for detection of three peanut viruses. *Plant Disease* 71:747-749.
- Jumanto, Bahagiawati, I. Manzila, H. Purwanti, M.A. Suhendar, M. Iman, R. Habib, D. Damayanti, Syamsudin, dan Suyono. 2001.** Produksi perangkat diagnostik dan peningkatan efisiensi teknik deteksi dan identifikasi penyakit dan hama tumbuhan. Laporan Hasil Penelitian APBN Tahun Anggaran 2001. BB-Biogen, Bogor.
- Karyeija, R.F., J.F. Kreuze1, R.W. Gibson, and J.P.T. Valkonen. 2001.** Variability of Sweet Potato Feathery Mottle Virus in Africa. *African Crop Sci. J.* 9(1):293-299.
- Kwak, H.E., M.K. Kim, M.N. Chung, S.H. Lee, J.W. Park, K.H. Kim, and H.S. Choi. 2006.** Virus disease incidences of sweet potatoes in Korea. *Plant Pathol. J.* 22(3):239-247.
- Lamka, G.L., J.H. Hill, D.C. McGee, and E.J. Braun 1991.** Development of an immunosorbent assay for seed-borne *Erwinia stewartii* in corn seeds. *Phytopathology* 81:839-846.
- Lazarovits, G. 1990.** The dot immunobinding assay (DIA)-Bacteria. *In* Hampton, R., E. Ball, and S. De Boer (Eds.). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and bacterial Plant Patogens. APS Press, St Paul, Minn. p. 248-261.
- Lin, L., Y.H. Hsu, and H.T. Hsu. 1990.** Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membrane. *Phytopathology* 80:824-828.
- Machmud M., Y. Suryadi, and I. Manzila. 2004.** Detection of sweet potato viruses in sweet potato germplasm from Irian Jaya. *Dalam* Hardaningsih *et al.* (Eds.). Prosiding Teknologi Inovatif Agribisnis Kacang-kacangan dan Umbi-umbian untuk Mendukung Ketahanan Pangan. Puslitbangtan, Badan Litbang Pertanian. hlm. 487-490.
- Machmud, M. dan Y. Suryadi. 2006.** Deteksi dan identifikasi strain *R. solanacearum* dengan teknik ELISA Tidak Langsung. *Penelitian Pertanian* 25(2):91-99.
- MacKenzie, D.J. 1990.** Preparation of antibody-enzyme conjugates. *In* Hampton, R., E. Ball, and S. De Boer (Eds.). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and bacterial Plant Patogens. APS Press, St Paul, Minn. p. 87-92.
- Makkouk, K.M. and S.G. Kumari. 2002.** Low-cost paper can be used in tissue-blot immunoassay for detection of cereal and legume viruses. *Phytopathol. Mediterr.* 41:275-278.
- Manzila, I., M. Machmud, A. Braun, dan S. Peter. 1997.** Deteksi virus ubi jalar menggunakan teknik NCM-ELISA. *Dalam* Risalah Kongres Nasional XIV dan Seminar Ilmiah PFI, Palembang. hlm. 86-91.
- Mariano, J.S., J.D.G. Dar, and T.M. Lorezco. 1995.** Local papers as substitute for nitrocellulose membrane in the detection of bacterial wilt latent infection of potato. *Philippine J. Plant Industry* 60(1).
- McLaughlin, R.J. and T.A. Chen. 1990.** ELISA methods for plant pathogenic prokaryotes. *In* Hampton, R., E. Ball, and S. De Boer (Eds.). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and bacterial Plant Patogens. APS Press, St Paul, Minn. p. 198-204.
- Mehan, V.K., B.S. Liaou, Y.J. Tan, A.R. Smith, D. McDonalds, and A.C. Hayward. 1994.** Potato. *Information Bull.* No 35. ICRISAT, India. 23 p.
- Nakano, M., S. Fuentes, and L.F. Salazar. 1994.** Sweet potato virus diseases detected in the tropics of South and Central America and Southeast Asia. *JIRCAS Workshop Paper* 1:58-65.
- Praptna, R. H. dan M. Yasin. 2008.** Peranan bioteknologi dalam pengelolaan penyakit tungro. *Iptek Tanaman Pangan* 3(1):98-111.
- Priou, S. 2001.** NCM-ELISA kit for the detection of *R. solanacearum* in potato. Instructions for use. CIP Lima Peru. 26 p.

- Rajeshwari, N., M.D. Shylaja, M. Krishnappa, H.S. Shetty, C.N. Mortensen, and S.B. Mathur. 1998.** Development of ELISA for the detection of *R. solanacearum* in tomato: Its application in seed health testing. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:697-704.
- Randles, J.W., R.A.J. Hodgson, and E. Weffels. 1996.** The rapid and sensitive detection of plant pathogens by molecular methods. *Australasian Plant Pathol.* 25:71-85.
- Seal, S. 1997.** Molecular methods for detection and discrimination of *R. solanacearum*. In Prior, P., C. Allen, and J. Elphinstone (Eds.). *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. Springer, Berlin. p. 103-109.
- Seal, S. and J. Elphinstone. 1994.** Advances in identification and detection of *P. solanacearum*. In Hayward, A.C. and G.L. Hartman (Eds.). *The Disease and Its Causative Agent, P. solanacearum*. CAB International, Wallingford, UK. p. 42-57.
- Smith, A.R. 1994.** Serological techniques for the detection of *Pseudomonas solanacearum*. In Mehan, V.K. and D. McDonalds (Eds.). *Techniques for Diagnosis of P. solanacearum and for Resistance Screening Against Groundnut Bacterial Wilt*. ICRISAT Patancheru, India. p. 18-22.
- Subandiyah, S. 2002.** Report on the banana disease workshop in Padang, West Sumatra, Indonesia. *Bacterial Wilt Newsletter* 17:20.
- Suryadi, Y. 1989.** Pengaruh tingkat inokulum *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* pada perkembangan penyakit hawar kedelai. *Dalam* Prosiding Kongres PFI X dan Seminar Ilmiah, Denpasar, Bali. hlm. 126-129.
- Suryadi, Y., M. Machmud, I. Manzila, dan Jumanto. 2003.** NCM-ELISA cara praktis untuk deteksi patogen tanaman. *Berita Puslitbangtan* 8:4-5.
- Suryadi, Y. dan M. Machmud. 2006.** Deteksi *P. syringae* pv. *glycinea* menggunakan antibodi poliklonal dan NCM-ELISA. *Berita Biologi* 8(1).
- Suryadi, Y., T.S. Kadir, dan M. Machmud. 2006.** Deteksi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, penyebab hawar daun bakteri pada tanaman padi. *Penelitian Pertanian* 25(2):108-115.
- Suryadi, Y., I. Manzila, M. Machmud, dan Jumanto. 2007.** Kajian efektifitas antibodi untuk deteksi patogen bakteri layu dan virus kerdil hampa. *Agrivita* 29(1):71-79.
- Thomas J.E., W.C. Wong, and D.H. Goanlock. 1989.** Modern methods for the detection of plant pathogens. *Queensland Agric. J.* Jan-Feb 1989. p. 49-53.
- Triny S.K., Y. Suryadi, IN. Widiarta, and IG.K. Dana Arsana. 2007.** Survey of bacterial leaf blight in Bali. In Kasim *et al.* (Eds.). *Rice Industry, Culture and Environment. Book 2. Proc. Internat'l. Rice Conf.* Tabanan, Bali. p. 555-560.
- Widiarta, IN. 2006.** Integrasi pengendalian penyakit tungro secara terpadu dalam pengelolaan tanaman terpadu. *Dalam* Hermanto *et al.* (Eds.). *Risalah Seminar Puslitbang Tanaman Pangan 2007*. hlm. 41-52.
-