

## DETEKSI *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (PSG) MENGGUNAKAN ANTIBODIPOLIKLONAL DAN NCM-ELISA

[Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (PSG) using Polyclonal Antibody and NCM-ELISA]

Y. Suryadi dan M. Machmud

Kelti Biokimia, BB Biogen, Jl. Tentara Pelajar 3 A Bogor 16111

Email: [yahid@yahoo.co.uk](mailto:yahid@yahoo.co.uk)

### ABSTRACT

Soybean bacterial blight is an important disease of the soybean crop. Since resistant cultivars are lacking, the disease is difficult to control, hence early detection and proper diagnosis as well as good knowledge on epiphytotic of the disease are important aspects for successful disease control. A serological technique, particularly the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) is an effective technique for detection and identification of plant pathogens. The objective of the research was to obtain polyclonal antibodies (PAb) and use of NCM-ELISA for detection PSG. Soybean plant samples showing symptoms of soybean bacterial blight were collected from the fields and used for antigen sources. Isolation and production of PSG antigen was done using King's B Agar medium. Immunizations of white New Zealand rabbits were done to produce antibodies to PSG. Yield of PAb-PSG was indicated by antisera titers ranging from 160 to 1280. Intravenous immunization produced more titer than that of intramuscularly. NCM-ELISA was used for detection of PSG from plant samples. It was applicable for detection of PSG from plant samples in relatively short time and limit detection of 10<sup>6</sup> cfu/ml.

**Kata Kunci:** Antibodi poliklonal, NCM-ELISA, deteksi PSG.

### PENDAHULUAN

Kedelai merupakan tanaman pangan yang cukup penting di Indonesia karena kegunaannya dalam memenuhi kebutuhan pangan dan pakan. Usaha peningkatan produksi kedelai diantaranya masih menghadapi kendala gangguan organisme pengganggu tanaman (OPT). Penyakit hawar daun yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (PSG) merupakan salah satu penyakit yang cukup penting pada tanaman kedelai. Gejala penyakit pada umumnya dijumpai pada permukaan daun berupa bercak kecil berwarna coklat muda kekuning-kuningan. Bila infeksi sangat parah dapat menyebabkan daun-daun gugur (Suryadi *et al*, 1995). Penyakit tersebut dapat menurunkan hasil kedelai secara kuantitatif dan kualitatif. Kerugian hasil yang diakibatkannya berkisar dari 11 sampai 20% (Schaad, 1979; Sinclair 1983; Suryadi, 1989).

Penggunaan benih bermutu merupakan salah satu upaya keberhasilan usaha tani kedelai. Pada umumnya bakteri dan virus patogen kacang-kacangan dapat ditularkan melalui benih dengan intensitas cukup tinggi (Sinclair, 1983). Benih yang terserang patogen dapat mempengaruhi mutu benih secara kualitas dan

kuantitas, disamping dapat memungkinkan menjadi sumber inokulum pada pertanaman berikutnya, oleh karena itu deteksi patogen secara dini dari contoh tanaman maupun patogen terbawa benih (*seed borne*) merupakan pengendalian secara tidak langsung sehingga dapat mencegah penularan penyakit melalui transportasi antar wilayah.

Upaya pengendalian melalui penggunaan varietas tahan belum berhasil secara optimal. Untuk menunjang keberhasilan pengendalian penyakit, kajian ekologi patogen dan epidemiologi perlu diteliti lebih lanjut. Deteksi patogen secara dini melalui pengujian sifat-sifat biokimia dan fisiologi yang biasa digunakan secara rutin memerlukan waktu relatif lebih lama. ELISA adalah suatu teknik serologi, yang dapat digunakan secara cepat untuk deteksi patogen (Clark dan Adams, 1977) dan telah dimanfaatkan untuk mempelajari epidemiologi penyakit serta uji sertifikasi benih tanaman (McLaughlin dan Chen 1990; Sige, 1993). Teknik tersebut berdasarkan reaksi antara antigen (Ag) dan antibodi (Ab), sehingga ketersediaan kedua bahan tersebut sangat diperlukan. Beberapa varian ELISA yang disederhanakan telah dilaporkan seperti penggunaan kertas filter dan *tissue blotting* (Lange

dan Heide, 1986; Lin *et al.*, 1990). NCM-ELISA (*nitrocellulose membrane*) merupakan teknik ELISA dengan menggunakan membran sebagai pengganti cawan mikrotiter (*microtiter plate*). Teknik ini mempunyai kepekaan yang hampir sama dengan DAS (*double antibody sandwich*) ELISA, tetapi lebih cepat dan praktis (Priou, 1998). Berdasarkan hasil pengujian di Peru, Fuentes (1993) telah melaporkan keberhasilan deteksi berbagai virus ubi jalar dengan varian ELISA menggunakan nitocellulose membrane (*dot blot ELISA*). Di dalam negeri, beberapa strain virus bilur kacang tanah (PStv) juga telah berhasil dideteksi dengan teknik tersebut (Manzila, 2001). Suryadi *et al* (1998) telah mengadaptasi penggunaan poliklonal antibodi (PAb) asal NRI-UK dalam mendeteksi patogen layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) yang berasal dari contoh tanaman kentang dengan teknik NCM-ELISA.

Produksi PAb terhadap PSG di Indonesia saat ini relatif masih sangat terbatas hingga perlu upaya produksinya agar dapat tersedia dalam jumlah yang cukup saat diperlukan khususnya untuk menunjang program sertifikasi benih. Ab poliklonal (PAb) yang diproduksi pada kelinci lebih mudah diproduksi dan memiliki spesifisitas yang tinggi bila dibuat dari Ag dengan kemurnian yang tinggi (Van Regenmortel, 1982; Hampton *et al.*, 1990). Mengingat deteksi dini patogen masih menjadi kendala dimana saat ini perangkat untuk uji ELISA umumnya masih harus diimpor dengan harga yang mahal, maka produksi PAb bakteri PSG diharapkan dapat membantu upaya pengendalian penyakit hawar daun kedelai, dan dapat mengembangkan sarana yang

dapat diproduksi di dalam negeri, sehingga harga perangkat deteksinya lebih terjangkau oleh pengguna. Tulisan ini melaporkan hasil penelitian produksi PAb-PSG dan aplikasinya untuk deteksi penyakit hawar daun bakteri pada kedelai menggunakan NCM-ELISA.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilaksanakan di laboratorium dan rumah kaca Kelompok Peneliti (Kelti) Rekayasa Protein dan Imunologi (RPI), BB Biogen Bogor, sejak bulan Februari sampai September 2005.

### Penyiapan isolat PSG dan produksi PAb-PSG

Untuk menghasilkan dan mamperbanyak PAb dilakukan sesuai dengan protokol standar (Smith, 1994). Tahapan kegiatan penelitian meliputi: (1) koleksi contoh tanaman sakit dari lapangan; (2) isolasi patogen dan pembuatan Ag, (3) imunisasi kelinci, dan (4) pemumian PAb. Contoh daun kedelai bergejala penyakit hawar daun bakteri dikoleksi dari lapangan, (KP Cikeumeuh Bogor, Citayam, Bogor dan Pacet, Cianjur) ditempatkan dalam kantong plastik dan dibawa ke laboratorium untuk diisolasi guna memperoleh isolat PSG. Isolasi PSG dipilih dari daun yang masih segar dengan gejala yang masih awal berupa bercak nekrosis berukuran kecil. Contoh daun diisolasi menggunakan medium King's B Agar (KBA) (Schaad, 1979). Dari koloni tunggal bakteri berumur biakan 48 jam selanjutnya dibuat suspensi bakteri dalam *varutan phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,2 dan kepekatannya diukur setara dengan konsentrasi sel hidup bakteri +10<sup>10</sup> cfu/ml. Suspensi bakteri ini disimpan dalam freezer sebagai stok Ag (Tabel 1).

**Tabel. 1.** Isolasi PSG dari berbagai contoh tanaman kedelai dari berbagai lokasi

NO. Isolat	Asal Contoh	Asal Lokasi
1	daun	Cikeumeuh, Bogor Cikeumeuh, Bogor
2	daun	Cikeumeuh, Bogor
3	daun	Cikeumeuh, Bogor
4	daun	Cikeumeuh, Bogor
5	tanah	Cikeumeuh, Bogor
6	tanah	Pacet, Cianjur
7	tanah	Pacet, Cianjur
8	daun	Pacet, Cianjur
9	daun	Citayam, Bogor
10	daun	Citayam, Bogor
11	daun	Citayam, Bogor
12	daun	Citayam, Bogor
13	daun	Citayam, Bogor
14	daun	Citayam, Bogor
15	daun	Citayam, Bogor

Perbanyakan PAb- PSG dilakukan dengan cara imunisasi/penyuntikan pada kelinci putih *New Zealand* berumur sekitar empat bulan (berat badan sekitar 2,0 kg). Sebelum imunisasi kelinci, Ag PSG disiapkan dengan membuat enceran dari stok suspensi larutan PSG berupa sel utuh (*whole cells*) yang kepekatannya diukur setara dengan kerapatan sel  $10^6$  -  $10^8$  cfu/ml dengan menambahkan larutan adjuvan *Freund's*. Kemudian enceran Ag PSG disw'tikkan pada kelinci masing-masing melalui penyuntikan *intravena* (vena telinga) dan *intramuscular* pada otot paha dengan volume 500  $\mu$ l Ag PSG dengan interval waktu penyuntikan dua minggu sekali. Dua minggu setelah penyuntikan terakhir, contoh darah kelinci dipanen dan antisernya dipisahkan. Titer antisernya yang diperoleh diuji menggunakan teknik mikropresipitasi. Seminggu kemudian, serum darah dipanen seluruhnya untuk selanjutnya diproses menjadi PAb. Pemurnian parsial PAb-PSG dilakukan menggunakan teknik presipitasi dengan ammonium sulfat (Smith, 1994) dan proses dialisis. PAb yang diperoleh diencerkan dengan larutan PBS 0,1N pH 7,0 yang selanjutnya ke dalam larutan PAb ditambahkan senyawa pengawet Na-azide 0,025%, glycerol 15% dan disimpan dalam botol serum. Kepekatan PAb-PSG ditetapkan berdasarkan pengukuran absorbansi dengan kerapatan optik  $(OD)_{260/260nm}$  setara dengan 1,4 menggunakan alat spektrofotometer (Hitachi).

#### Pengujian PAb untuk deteksi contoh tanaman terinfeksi PSG menggunakan NCM-ELISA

Enzim konjugat disiapkan menurut metode Smith (1994) dengan cara mencampurkan larutan Ab dengan

glutaraldehida 20% dan ditambah dengan enzim *alkaline phosphatase* (AP). Setelah melalui proses inkubasi, campuran larutan didialisis tiga kali pada larutan penyangga fosfat selama semalam pada suhu 4°C (Me Kenzie, 1990). Pengambilan contoh tanaman terinfeksi patogen bakteri PSG dilakukan dari beberapa lokasi sekitar Bogor dan Cianjur (Tabel 1). Sediaan murni PSG digunakan sebagai pembanding positif dan larutan penyangga Tris sulfat (TBS) pH 7,0 sebagai kontrol negatif. Contoh tanaman diekstraksi dan diuji dengan NCM-ELISA mengikuti prosedur Fuentes (1993). Ag bakteri PSG diteteskan pada membran NCM kemudian diekspos dengan PAb. Ab kedua diteteskan bersama enzim konjugat *goat antirabbit* (GAR) yang dilabel dengan AP. Reaksi substrat selanjutnya dideteksi berdasarkan reaksi perubahan warna pada membran setelah diberikan larutan NBT/BCIP. Pengamatan dilakukan terhadap kepekaan dari PAb yang telah diproduksi untuk mendeteksi contoh daun kedelai yang terinfeksi PSG.

#### HASIL

##### *Penyiapan isolat PSG dan produksi PAb- PSG*

Contoh daun tanaman kedelai terinfeksi hawar daun bakteri yang diperoleh diisolasi pada media KBA. Koloni PSG berwarna putih keruh dengan margin rata. Hasil isolasi telah diperoleh lima belas isolat PSG (Tabel 1). Uji hipersensitif dilakukan pada daun tanaman tembakau dan menghasilkan gejala nekrotik kuning kecoklatan (*water soaking*) pada daun yang diinokulasi bakteri tersebut. Sebagian isolat PSG asal Bogor kemudian diperbanyak untuk digunakan sebagai sumber Ag dan disimpan sebagai control positif. Hasil

**Tabel 2.** Titer PAb-PSG yang diperoleh dari serum hasil penyuntikan kelinci secara *intramuscular* dan *intravena*

Contoh serum	Titer PAb	Titer PAb
	<i>intramuscular</i>	<i>intravena</i>
1. As1-PSG	320	640
2. As2-PSG	320	640
3. As3-PSG	640	1280
4. As4-PSG	160	1280

Keterangan: Nomor serum menunjukkan contoh serum yang diproduksi dari kelinci yang berbeda

perolehan panen antiserum kasar dari kelinci yang diimunisasi Ag PSG adalah sebanyak 40 ml antiserum. Berdasarkan reaksi aglutinasi antara Ag dan antiserum, hasil titer antiserum PSG berkisar dari 160 hingga 280. Pada taraf pengujian titer antiserum PSG dengan menggunakan teknik mikropresipitasi, diketahui bahwa titer terendah diperoleh pada pengenceran 1:160 untuk kelinci yang diimunisasi melalui cara *intramuscular*, sedangkan titer tertinggi yang diperoleh dari hasil imunisasi melalui *intravena* adalah sebanyak 1 : 1280 (Tabel 2).

Meskipun titer yang diperoleh belum cukup tinggi, kepekaan Ab ditetapkan menjadi 1 mg/ml melalui sentrifugasi dan presipitasi lanjutan dengan Amonium sulphat. Dari hasil pemurnian parsial menggunakan presipitasi Amonium sulphat jenuh terhadap antiserum tersebut diperoleh PAb yang cukup murni meskipun kandungan IgG masih relatif rendah (Tabel 3). Rata-rata kemurnian Ab hasil penyuntikan secara *intramuscular* adalah sebesar  $1,04 \pm 0,008$ ; sedangkan

nilai rata-rata kemurnian PAb hasil imunisasi secara *intravena* mencapai  $1,36 \pm 0,04$ . Hasil uji rata-rata terhadap kedua cara penyuntikan menunjukkan perbedaan yang nyata berdasarkan uji *t student* ( $t_{hit} > t_{tabel}$ ;  $P=0,05$ ).

**Pengujian PAb untuk deteksi contoh tanaman terinfeksi PSG menggunakan NCM-ELISA**

Sediaan murni bakteri PSG dengan kepekatan koloni  $10^4$  cfu/ml digunakan sebagai sumber Ag (kontrol positif) dan bufer TBS pH 7,0 digunakan sebagai kontrol negatif. Sebelum uji NCM-ELISA dilakukan untuk mendeteksi Ag PSG, PAb ditentukan konsentrasinya dengan pengenceran (1:100, 1:200, 1:400 dan 1:800). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua pengenceran Ab menunjukkan reaksi positif untuk mendeteksi contoh Ag PSG (gambar 1 dan 2). Pengenceran Ag dilakukan berdasarkan pengenceran  $10^1$  dari konsentrasi awal. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi terendah Ag yang

**Tabel 3.** Kemurnian PAb PSG hasil penyuntikan *intravena* dan *intramuscular* setelah pemurnian dengan ammonium sulfat dan dialisis

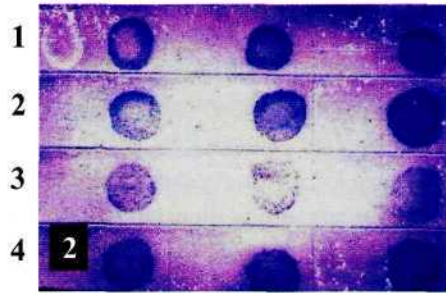
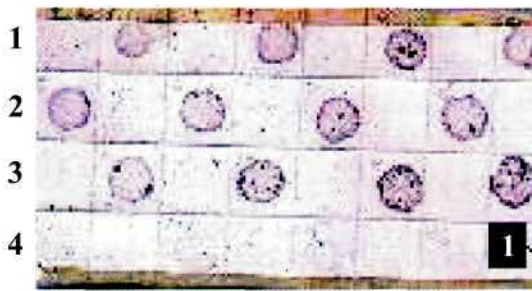
Contoh PAb	<i>Intramuscular</i>	<i>intravena</i>
	Nilai Absorbansi OD <sub>280/260nm</sub>	Nilai Absorbansi OD <sub>280/260nm</sub>
1. PAb 1	1,04	1,32
2. PAb 2	1,03	1,38
3. PAb 3	1,02	1,32
4. PAb 4	1,04	1,32
5. PAb 5	1,03	1,39
6. PAb 6	1,04	0,46
7. PAb 7	1,04	1,37
8. PAb 8	1,04	1,33
9. PAb 9	1,04	1,38
10. PAb 10	1,04	1,37

Keterangan: Nomor Pab menyatakan contoh PAb hasil purifikasi Amonium sulphat.  $A_{280}/A_{260}$  sama dengan 1,4 setara dengan 1 mg/ml protein Rerata protein intravena =  $1,36 \pm 0,04$  Rerata protein intramuscular =  $1,04 \pm 0,008$   $t_{hit} > t_{tabel}$  nyata ( $P=0,05$ )

**Tabel 4.** Kepekaan deteksi contoh tanaman terinfeksi PSG dengan NCM-ELISA

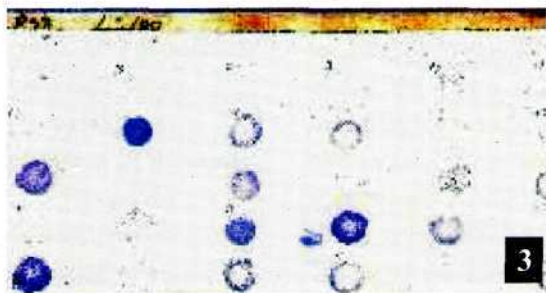
Pengenceran PAb	Ag								Kontrol negatif (TBS)
	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	
1: 100	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
1: 400	++	++	++	++	++	-	-	-	-
1: 800	++	++	++	++	++	-	-	-	-

Keterangan: +++=reaksi sangat kuat, ++= reaksi kuat, -= tidak ada reaksi



**Gambar1.** Contoh hasil deteksi PSG dengan pengenceran PAb 1:800 (*intramuscular*). Keterangan: baris 1 = kontrol negatif dan positif, 2,3, = isolat PSG, 4= isolat Rs.

**Gambar2.** Contoh hasil deteksi PSG dengan pengenceran PAb (1:800) (*intravena*). Keterangan: baris 1 = kontrol negatif dan positif, 2,3, 4= isolat PSG.



**Gambar3.** Contoh hasil deteksi isolat hawar daun bakteri dengan PAb- PSG (1:800). Nomor contoh menunjukkan isolat yang diuji

masih dapat dideteksi adalah kira-kira  $10^4$  cfu/ml (Tabel 4). Pada uji serologi ELISA konsentrasi yang tepat antara Ag, Ab dan konjugat yang optimum sangat penting untuk mengetahui efektifitas maupun efisiensi hasil deteksi.

Uji efektifitas PAb untuk deteksi patogen PSG asal lapangan dengan teknik serologi NCM-ELISA terhadap daun kedelai bergejala hawar daun telah digunakan suspensi yang berasal dari ekstrak yang dibuat dalam enceran  $10^1$  kali menggunakan bufer TBS pH 7,0. Hasil penelitian menunjukkan bahwa contoh isolat PSG yang ditetaskan pada membran NCM bereaksi positif dengan PAb-PSG yang telah diproduksi (gambar 3).

## PEMBAHASAN

Saat ini metode deteksi pada tingkat asam nukleat (DNA/RNA) misalnya dengan reaksi rantai polimorfisme (PCR) dilaporkan sangat sensitif dalam

mendeteksi suatu patogen, tetapi penggunaan metode ini sangat terbatas karena secara ekonomis lebih mahal dibanding serodiagnostik. Pada penelitian serologi untuk memproduksi PAb ini, telah diperoleh antiserum kasar dengan titer bervariasi dari 160 hingga 1280. Rendahnya titer ini mungkin disebabkan oleh rendahnya respon kekebalan (*immune response*) pada hewan uji atau disebabkan oleh penempelan protein yang kurang spesifik (*non specific binding site*). Seperti dikemukakan oleh Van Regenmortel (1982) hasil produksi PAb bervariasi tergantung hewan yang diuji. Selain itu, produksi Ab antara lain dipengaruhi oleh dosis, bentuk Ag dan prosedur penyuntikan (Klement *et al*, 1996). Menurut Brunt *et al*, (1992) kemurnian IgG tertinggi diperoleh bila nilai absorbansi  $A_{280}/A_{260} > 1.4$ . Pada penelitian ini, hasil rata-rata kemurnian Ab (IgG) masing-masing untuk hasil penyuntikan secara *intramuscular* dan *intravena* adalah sebesar  $1,04 \pm 0,008$  dan  $1,36 \pm 0,04$  masih berada dibawah kemurnian

optimal, hal ini mungkin disebabkan sebagian proteinnya hilang selama proses dialisis. Namun demikian, hal ini tidak mengurangi efektifitasnya dalam mendeteksi molekul patogen PSG. Pada uji serologi ELISA, adanya kompleks Ag-Ab digunakan sebagai dasar untuk mengetahui identitas suatu molekul antigen.

Pada kotak membran nitrocelulose yang diberi buffer TBS (kontrol negatif) tidak terjadi perubahan warna substrat. Ketebalan warna yang dihasilkan menunjukkan banyaknya Ag yang berikatan dengan PAb, dengan kata lain intensitas warna ungu yang diamati pada membrane nitroselulose tergantung dari konsentrasi Ag yang terdeteksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi terendah PAb yang diuji masih dapat mendeteksi adanya PSG. Hal ini menunjukkan bahwa PAb yang diperoleh cukup spesifik dalam mendeteksi adanya PSG. Hasil penelitian Lee *et al* (1982) di China dengan menggunakan PAb *XOO* asal sel hidup dan teknik FAS (*fluorescence antibody staining*) mampu mendeteksi 88 kultur positif terinfeksi *XOO* dari contoh asal benih dan daun padi. Hal yang sama diperoleh dari penelitian sebelumnya terhadap isolat *R. solanacearum* (Rs) yang dideteksi PAb-Rs dengan teknik NCM-ELISA berkisar dari  $10^4$ - $10^5$  cfu/ml (Suryadi *et al*, data tidak dipublikasi). Menurut Priou (1998) untuk deteksi bakteri Rs asal contoh tanaman tingkat kepekaan deteksi ini dapat ditingkatkan hingga  $10^2$  cfu/ml dengan cara pengkayaan (*enrichment technique*) terhadap ekstrak tanaman yang akan dideteksi, tetapi pada percobaan ini tingkat pengkayaan tersebut belum dicoba.

#### KESEMPULAN DAN SARAN

Lima belas isolat PSG telah diperoleh dari contoh tanaman kedelai dan Ab PSG telah diproduksi pada kelinci yang diimunisasi dengan patogen tersebut baik secara *intramuscular* maupun *intravena*. Hasil titer tertinggi yang diperoleh berkisar dari 160 sampai 1280. Contoh Ag asal isolat PSG berhasil dideteksi dengan kepekaan deteksi sekitar  $10^4$  cfu/ml.

PAb tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi berbagai contoh Ag yang terinfeksi bakteri PSG khususnya dari benih atau contoh tanaman terinfeksi PSG asal lapangan. Untuk aplikasi PAb-PSG

secara rutin masih perlu dipelajari efisiensi dan efektifitasnya dalam skala luas.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr Endang, Windiyati dan Wawan atas penyediaan PAb dan perbanyakan isolat PSG.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Brunt A, K Crabtree and A. Gibbs. 1992.** Viruses in tropical plants. CAB, Int. Wallingford UK. 707 pp.
- Clark MF and AN Adams. 1977.** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *1. Gen. Virol.* 34,475-483.
- Fuentes, S. 1993.** *Detection of sweet potato viruses using NCM-ELISA techniques.* Int. Potato Center (CIP). Lima, Peru (mimeograph).
- 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.
- Klement,Z, K. Rudolph and DC Sand. 1990.** Methods in phytobacteriology. Acad. Kiado Budapes. 568pp.
- Lange L and M Heide. 1986.** Dot immunobinding (DIBA) for detection of viruses in seed. *Can. J. of Plant Pathol.* 8, 373-379.
- Lee S, Di Yuanbo, CS Rong and XX Xea. 1982.** Indirect fluorescent antibody staining (IFAS) for detection office leaf blight bacteria (*X. campestris* pv *oryzae*) (Uyeda et Ishiyama) Dowson. *Chinese Acad of Agric. Sciences*, 12. Beijing China.
- Lin L, YH Hsu and HT Hsu. 1990.** Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membrane. *Phytopathol.* 80, 824-828.
- MacKenzie DJ. 1990.** Preparation of antibody conjugates, p. 87-96. In; R. Hampton and S. H. De Boer (Eds.). *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A laboratory Manual.* The APS. St Paul, Minnesota.
- McLaughlin RJ and TA Chen. 1990.** ELISA methods for plant pathogenic procaryotes, p. 197-201. *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A laboratory*

- Manual. In* R. Hampton and S. H. De Boer (Eds.). The APS Press, St Paul, Minnesota.
- Manzila, IR Suseno, S Hendrastuti dan Jumanto 2001.** Deteksi virus bilur kacang tanah di dalam benih kacang tanah menggunakan DNA berciri zat non radioaktif. *J. Bioteknologi Pertanian* **6(1)**, 9-15.
- Priou S. 1998.** *Manual for detection of P. solanacearum using the NCM-ELISA technique.* CIP Lima Peru. (mimeograph).
- Schaad NW. 1979.** Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **17**, 123-147.
- Sigee DC. 1993.** Bacterial plant pathology: cells and molecular aspects. Cambridge Univ. Press. 66 pp.
- Sinclair JB. 1983.** *Compendium of Soybean Diseases.* Amer. Phytopathol. Soc, St. Paul, Minn.
- Smith, A.R. 1994.** Serological techniques for the detection of *Pseudomonas solanacearum*. *Techniques for diagnosis of P. solanacearum and for resistance screening against groundnut bacterial wilt.* 18-22 **In:** Mehan VK dan D. McDonalds (Eds). ICRISAT, Patancheru India.
- Suryadi Y. 1989.** Pengaruh tingkat inokulum *P. syringae* pv *glycinea* pada perkembangan penyakit hawar kedelai. Proc. PFI X, 126-129 Denpasar.
- Suryadi, YYulianto dan S Kartaatmadja. 1995.** Pengaruh Kalium dan mulsa terhadap penyakit hawar daun bakteri (*P. syringae* pv *glycinea*) Proc. Kongres dan Seminar Ilmiah PFI, 414-418. Yogyakarta.
- Suryadi Y, M Machmud, Rusmadi and MA Suhendar. 1998.** Detection of *P. solanacearum* from latently infected potato tubers using ELISA and PCR techniques. *J. Biol. Indon.* **2(3)**, 142-149.
- Van Regenmortel MHV. 1982.** *Serology and Immunochemistry of Plant Viruses.* Academic, New York.