

Produksi dan Evaluasi Antibodi Poliklonal untuk Deteksi Toksin *Photorhabdus* spp.

Yadi Suryadi, Ifa Manzila, Alina Akhdiya, dan Etty Pratiwi

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

ABSTRACT

Production and Evaluation of Polyclonal Antibody for Detection of *Photorhabdus* spp. Toxin. Yadi Suryadi, Ifa Manzila, Alina Akhdiya, and Etty Pratiwi. The research was aimed to produce and evaluate polyclonal antibody (PAb) for specific *Photorhabdus* spp. bacterial toxin detection. *Photorhabdus* spp. toxin of HJ isolates which was purified using Hi Prep. 16/60 Sephacryl S-200 HR column chromatography revealed three different peaks of polypeptides. The results showed that the protein concentration of crude antigen protein (supernatant) was 3,711 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, whilst fraction of protein was $1,95 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectively. The bioassay using *Tenebrio molitor* larvae-3 indicated that after 48 h application, the percentage of larvae mortality by crude antigen was lower (73%) than by fraction antigen (93%). Based upon NCM-ELISA test, PAb of fraction protein derived from HJ isolate reacted with *Photorhabdus* spp. antigen yielded stronger or darker violet color on membrane than that of crude protein. In addition, it was observed that PAb could differentiate specifically *Photorhabdus* spp. toxin with other bacterial filtrate such as *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, *X. campestris* pv *glycinea*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* and *P. fluorescens*, however it showed cross reaction with *Escherichia coli*. Further tests are needed in optimizing PAb-*Photorhabdus* spp. sensitivity to achieve effective concentration for detection of *Photorhabdus* spp. toxin as well as specificity test against other bacterial antigens.

Key words: *Photorhabdus* spp., PAb, NCM-ELISA.

PENDAHULUAN

Pengendalian patogen tanaman dan pengurangan jumlah populasi hama yang ramah lingkungan dewasa ini semakin intensif dilakukan, dan saat ini diketahui beberapa jenis bakteri, virus, jamur, dan nematoda berpotensi sebagai pengendali hayati hama. Nematoda Patogen Serangga (NPS) *Steinernema carpocapsea* dan *Heterorhabditis* spp. merupakan 2 kelompok spesies nematoda yang dapat dimanfaatkan sebagai pengendali hayati (Suryadi dan Chaerani 1999). Penggunaan NPS semakin berkembang karena memiliki beberapa keunggulan, antara lain (1) bersifat virulen sehingga mampu menyebabkan kematian secara cepat, (2) daya reproduksi tinggi, (3) spektrum inang yang luas dan mudah dibiakkan pada medium

buatan, (4) mudah diaplikasikan dan kompatibel terhadap beberapa jenis pestisida, dan (5) aman bagi vertebrata dan jasad yang bukan sasarannya (Kaya dan Gaugler 1993).

NPS *Heterorhabditis* sp. mempunyai beberapa stadium perkembangan, yaitu stadium telur, 4 stadium larva, dan dewasa. Setiap tahap ditandai dengan pergantian kulit, dan stadium infektifnya disebut Juvenil Infektif (JI), yaitu stadium larva ke-3 yang berhenti berkembang untuk sementara pada kondisi yang kurang menguntungkan (Woodring dan Kaya 1988). JI yang masih terbungkus kulit, dan mengandung sel-sel bakteri yang tersimpan di dalam ususnya sebagai cadangan makanan, mampu hidup bebas di lingkungan luar tubuh inangnya untuk bergerak mencari inang potensial (Poinar 1990). Serangga terinfeksi NPS *Heterorhabditis* sp. berwarna coklat kemerahan, tubuhnya tetap keras dan bila dibedah jaringan tubuhnya agak lengket, berwarna coklat kekuningan (Kaya dan Gaugler 1993).

Heterorhabditis sp. hidup bersimbiosis secara mutualistik dengan bakteri genus *Photorhabdus* spp. NPS sangat bergantung nutrisinya dari bakteri simbiosis yang berperan memberi perlindungan dan sebagai vektor bagi bakteri dari satu inang ke inang lainnya serta mematahkan mekanisme pertahanan tubuh serangga melalui toksin yang dihasilkan bakteri (Klein 1990). Bakteri *Photorhabdus* spp. dapat dikembangkan penggunaannya untuk mengendalikan populasi serangga hama terutama pada tanaman padi. Para peneliti di Amerika Serikat telah berhasil mengintroduksi gen penyandi toksin insektisida ke dalam tanaman *Arabidopsis thaliana* yang tahan terhadap serangga hama *Manduca sexta*. Gen penyandi toksin *Photorhabdus* spp., saat ini telah dikembangkan melalui teknik rekayasa genetik untuk dapat diisolasi, diklon, dan diintroduksi ke dalam tanaman (Forst dan Nelson 1996).

Salah satu kendala upaya kloning adalah tidak tersedianya teknik efisien untuk mendeteksi hasil klon yang relatif lebih cepat, sehingga dapat dimanfaatkan secara rutin dan berkesinambungan untuk menguji contoh/sampel dalam jumlah besar. Ketersediaan teknik deteksi yang efektif diharapkan dapat membantu menapis hasil rekombinan yang diinginkan. Teknik de-

teksi produk rekombinan dengan bioasai cukup efektif tetapi masih memerlukan waktu lama dan kurang efisien apabila digunakan untuk menapis hasil kloning dalam jumlah besar. Berbagai teknik deteksi patogen secara cepat yang telah dikembangkan di antaranya teknik *immunoassay* ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), yaitu teknik serologi yang menggabungkan kepekaan, kespesifikan deteksi, dan kemudahan (Clark 1981). *Nitro Cellulose Membrane* (NCM-ELISA) adalah varian ELISA untuk mendeteksi berbagai jenis molekul antigen dengan menggunakan membran nitroselulose sebagai pengganti cawan mikrotiter. Teknik ini hampir sama kepekaannya dengan DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich* ELISA), tetapi lebih cepat dan mudah. Keuntungan lainnya ialah membran yang telah diberi sampel dapat disimpan beberapa minggu, dan dapat dikirim ke laboratorium lain untuk pengujian (Priou 1999). Upaya penyediaan perangkat deteksi yang cukup lengkap masih perlu dikembangkan. Hal ini mendorong kegiatan untuk menyediakan antibodi (Ab) dan perangkatnya secara berkesinambungan sehingga dapat digunakan oleh para pengguna dengan biaya relatif lebih murah dibandingkan harus mengimpor dari luar negeri (Suryadi dan Kadir 2004). Penggunaan Ab *Photorhabdus* spp. saat ini relatif masih terbatas dan perlu diteliti tingkat kepekaan serta

kespesifikannya. Penelitian ini bertujuan memproduksi dan mengevaluasi poliklonal Ab (Pab) untuk mendeteksi toksin spesifik bakteri *Photorhabdus* spp., dengan teknik NCM-ELISA, apabila teknik ini efektif, maka produksi PAB untuk deteksi bakteri *Photorhabdus* spp., penghasil toksin dapat diproduksi secara luas.

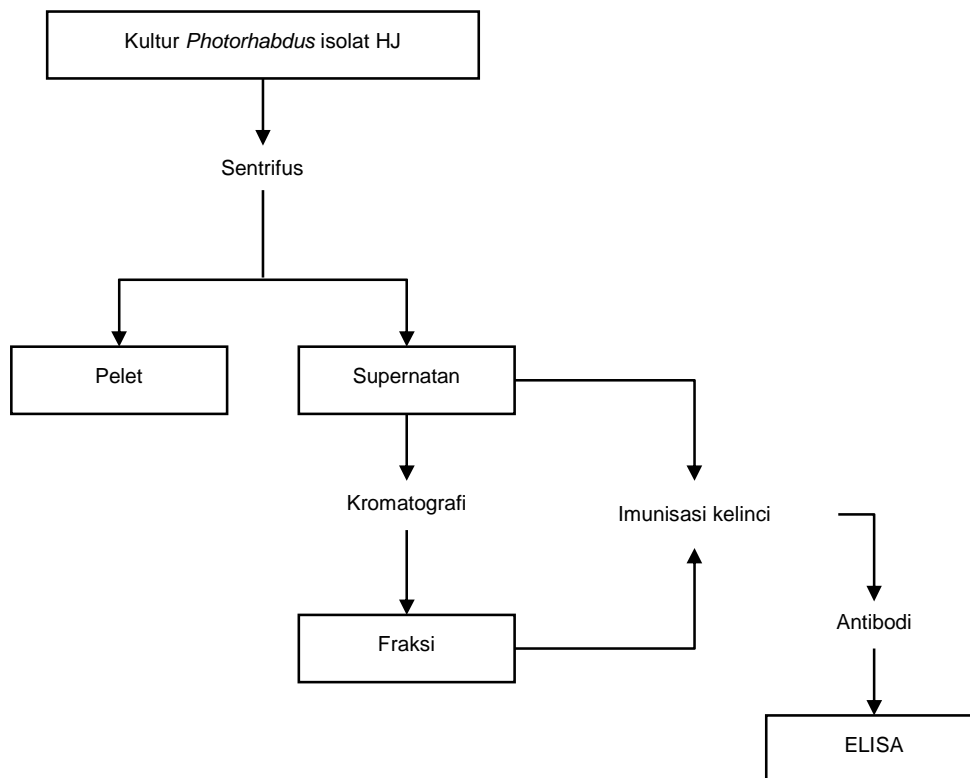
BAHAN DAN METODE

Alur diagram untuk memproduksi dan mengevaluasi PAB toksin *Photorhabdus* spp. disajikan pada Gambar 1.

Produksi PAB Toksin *Photorhabdus* spp.

Penyiapan/penyediaan antigen

Bakteri *Photorhabdus* spp. isolat HJ asal NPS *Heterorhabditis* sp. Pelabuhan Ratu secara rutin dipelihara, diperbanyak dan diremajakan dalam medium padat *Nutrient Bromthymol Blue Triphenyltetrazolium Chloride* (NBT), disuplementasi dengan *Bromthymol Blue* (BTB) 0,025% dan *Triphenyltetrazolium Chloride* (TZC) 0,004%, sedangkan untuk memproduksi toksin digunakan media cair *Luria Bertani* (LB) (Woodring dan Kaya 1988).



Gambar 1. Diagram alir prosedur kerja produksi PAB toksin *Photorhabdus* spp.

Perbanyak bakteri *Photorhabdus* spp., dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri HJ dalam Erlenmeyer berisi 10 ml media cair LB sambil dikocok menggunakan *rotary orbital shaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 48 jam inkubasi, kemudian sebanyak 100 μ l biakan diinokulasikan dalam 250 ml Erlenmeyer berisi media cair LB. Kultur diinkubasi pada suhu ruang dalam *rotary orbital shaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 48 jam, dan disentrifus dengan kecepatan 15.000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit kemudian diambil supernatnya. Toksin asal ekstrak kasar *Photorhabdus* spp. dimurnikan secara parsial dengan menambahkan amonium sulfat 70% ke dalam supernatan sambil dikocok merata dengan *magnetic stirrer* selama semalam, dan disentrifus dengan kecepatan sentrifugasi 15.000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam *Phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,3, kemudian didialisis dalam bufer yang sama selama 24 jam (Bollag *et al.* 1996).

Pemurnian protein toksin hasil dialisis dilakukan dengan teknik kromatografi menggunakan kolom Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution (HR). Elusi dilakukan dengan menggunakan larutan PBS pH 7,3 dengan kecepatan alir 0,3 ml/menit. Proses elusi dilakukan menggunakan detektor dengan panjang gelombang 280 nm dan fraksi yang keluar ditampung masing-masing menggunakan 1,5 ml *fraction collector*.

Penentuan protein asal supernatan dan fraksi protein murni dilakukan dengan metode Bradford (1976) menggunakan larutan bovine serum albumine (BSA) sebagai standar dari hasil pengukuran absorbansi larutan dengan spektrofotometer menggunakan panjang gelombang 595 nm.

Bioasai untuk menguji toksisitas antigen (Ag) toksin dilakukan terhadap larva *T. molitor* instar 3-4. Larva serangga disuntik masing-masing dengan 2 μ l supernatan (Sp) ekstrak kasar toksin *Photorhabdus* spp. dan fraksi aktif protein toksin hasil kolom (Fr). Sebagai kontrol negatif dilakukan penyuntikan dengan larutan Ringer dan bufer PBS. Setiap perlakuan (sebanyak 15 larva) masing-masing diulang tiga kali, yang ditempatkan dalam cawan petri dan diberi pakan buatan. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah larva yang mati (mortalitas) setelah waktu 24-48 jam.

Imunisasi kelinci

Kelinci betina *New Zealand White* berumur sekitar 4 bulan (berat badan sekitar 2,0 kg) dipelihara dalam kandang dengan makanan pelet. Imunisasi dilakukan dengan cara menyuntikkan Ag berupa ekstrak kasar dan fraksi aktif toksin *Photorhabdus* spp., isolate

HJ. Penyuntikan dilakukan sebanyak empat kali dengan interval waktu penyuntikan selama seminggu secara intramuskular pada bagian paha kaki belakang. Dua minggu pertama toksin ekstrak kasar dan fraksi *Photorhabdus* spp. dicampur dengan 0,5 ml ajuvan *Freund's complete* dan dua minggu berikutnya dilakukan penyuntikan ulang dengan toksin yang sama tetapi dicampur dengan ajuvan *Freund's incomplete*.

Panen antiserum, uji titer, dan pemurnian PAb

Panen berupa serum darah dilakukan satu minggu setelah penyuntikan terakhir melalui intravena. Serum darah kemudian ditempatkan dalam tabung sentrifus dan diendapkan pada suhu 4°C selama semalam, lalu disentrifugasi 2.000 g selama 15 menit. Antiserum yang merupakan supernatan dipisahkan kemudian ditambahkan larutan gliserol dan disimpan dalam botol serum. Pengujian titer dilakukan dengan teknik aglutinasi. Antiserum yang telah disiapkan dalam botol serum kemudian dimurnikan kembali secara parsial menggunakan dialisis dan amonium sulfat. Konsentrasi Ab diukur absorbansinya berdasarkan kerapatan optik (OD)_{280/260nm} setara dengan 1,4 atau setara dengan konsentrasi protein 1 mg/ml (Van Regenmortel 1992).

Uji Spesifisitas PAb dengan Teknik NCM-ELISA

Evaluasi dan pengujian spesifisitas serta kepekaan PAb yang dihasilkan dilakukan dengan uji serologi NCM ELISA sesuai dengan prosedur Priou *et al.* (1999). Sampel/kontrol positif berupa ekstrak kasar (supernatan) dan fraksi asal isolat HJ, sedangkan sebagai kontrol negatif digunakan *Escherichia coli*, *Xanthomonas oryzae* (Xoo), *Xanthomonas campestris* pv. *glycinea* (Xcg), *Ralstonia solanacearum* (Rs), *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Psg), dan *Pseudomonas fluorescens* (Pf). Penyiapan nitroselulose membrane (NCM) dilakukan sebagai berikut: membran dipotong-potong dengan ukuran 8 x 8 cm², selanjutnya dibasahi dengan 30 ml *Tris buffer saline* (TBS). Sebanyak 20 μ l sampel ditetaskan (*dot-blotted*) pada NCM yang sudah kering. Selaput membran yang telah ditetesi Ag diletakkan dalam kotak plastik berisi 30 ml larutan penghambat/*blocking* selama 1 jam, selanjutnya larutan Ab ditambahkan ke dalam NCM berisi larutan penghambat dan diinkubasikan semalam pada suhu ruang sambil dikocok dengan kecepatan 50 rpm. NCM dicuci dengan *Tris buffer saline-Tween* (TTBS) tiga kali masing-masing selama 3 menit, kemudian ditambahkan 40 ml bufer konjugat dan larutan goat antibodi rabbit (GAR) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Setelah pencucian kedua dilakukan pemberian substrat untuk pewarnaan (reaksi enzimatik) dengan

menambahkan larutan pewarna (30 ml stok larutan bufer substrat *Alkaline Phosphatase* (AP) pH 9,5, 90 μ l Nitroblue Tetrazolium (NBT), dan 90 μ l *Bromochloro Indole acetil Phosphate* (BCIP) selama 10-30 menit. Perubahan warna ungu muda sampai ungu tua pada bekas tetesan diamati. Warna ungu menunjukkan reaksi positif, dan bila tidak terjadi perubahan warna pada bekas tetesan dianggap reaksinya negatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi PAb Toksin *Photorhabdus* spp.

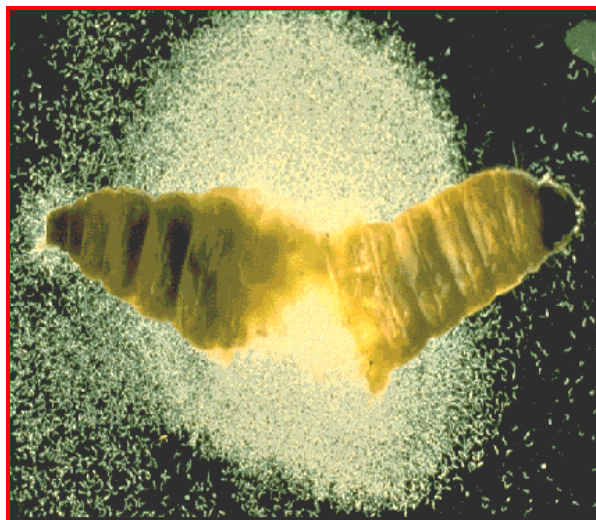
Photorhabdus spp. termasuk ke dalam famili *Enterobacteriaceae*, berciri gram negatif, berbentuk batang, dan anaerob fakultatif (Poinar 1990). Bakteri ini berasosiasi dengan NPS *Heterorhabditis* sp dan mengeluarkan luminensi dalam keadaan gelap sehingga serangga yang terinfeksi bakteri akan berpendar (Gambar 2).

Sel bakteri simbiosis bertahan dalam saluran pencernaan NPS dan mematikan serangga melalui toksin yang dihasilkan dalam waktu 24-28 jam. Sel-sel ini mulai aktif bekerja dan berkembangbiak setelah keluar dari saluran pencernaan NPS dan JI NPS memasuki *hemocoel* serangga (Buecher dan Popiel 1989). Selanjutnya dikemukakan bahwa bakteri menghasilkan enzim yang mampu memecah jaringan tubuh serangga menjadi nutrisi bagi nematoda dan antibiotik yang mampu mencegah pertumbuhan mikroba sekunder pesaing nematoda.

Pemurnian protein dari supernatan *Photorhabdus* spp. isolat HJ dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu pemisahan protein dengan amonium sulfat, dialisis dan kromatografi (Bollag *et al.* 1996). Pada penelitian

ini ditambahkan amonium sulfat kadar jenuh 70% ke dalam ekstrak kasar *Photorhabdus* spp. isolat HJ. Konsentrasi ini dianggap cukup untuk memisahkan protein, sekaligus tetap mempertahankan kandungan protein yang dimiliki. Protein hasil dialisis dilewatkan pada kolom High Sephacryl *prepacked* 200 *high resolution* berukuran 16 x 60 cm suhu 20°C yang mempunyai butiran-butiran gel tersusun rapat dan stabil sehingga bila sampel dan bufer dialirkan ke dalam kolom akan terjadi pemisahan protein. Hasil pemurnian toksin dengan kolom *Hi Prep* 16/60 *Sephacryl S-200 HR* menunjukkan tiga puncak protein (*peak*) yang berbeda (A, B, C). Puncak A terdiri dari fraksi 26-27 mulai keluar pada volume ke-39 sampai volume ke-40. Puncak B terdiri dari fraksi 35-39, mulai keluar pada volume ke-52,5 sampai volume ke-58,5. Puncak C (Gambar 3) terdiri dari fraksi 42-72, mulai keluar pada volume ke-63 sampai volume ke-108. Fraksi yang diambil untuk bioasai adalah fraksi yang berada di puncak utama, yaitu fraksi dengan kandungan toksin tinggi dan ditunjukkan dengan tingginya nilai absorbansi (puncak A).

Pengukuran kandungan protein pada kolom dilakukan pada tiap tabung yang dikumpulkan sesuai dengan puncak (*peak*) yang terbentuk, dan merupakan fraksi yang mengandung protein, ditunjukkan dengan tingginya nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Berdasarkan kurva protein standar pada contoh supernatan (ekstrak kasar) diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0142x + 0,0113$ ($R^2 = 0,98$) sehingga dapat diketahui konsentrasi protein sebesar 3,711 μ g/ μ l, sedangkan pada fraksi diperoleh persamaan regresi $y = 0,6868x + 0,0336$ ($R^2 = 0,97$) dengan konsentrasi protein sebesar $1,95 \times 10^{-2}$ μ g/ μ l. Penurunan konsentrasi protein total pada fraksi, mungkin terjadi

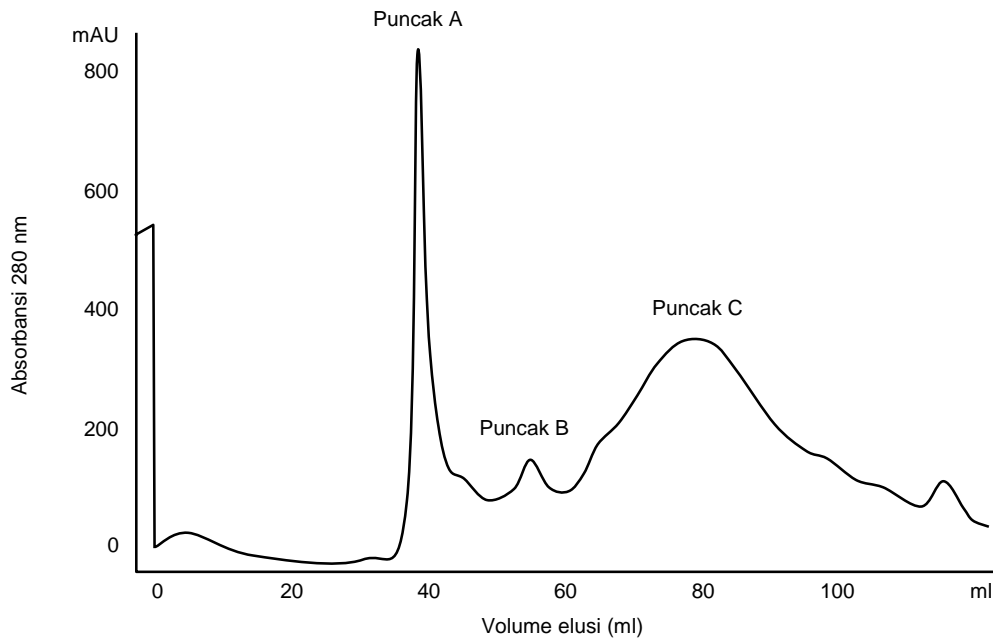


Gambar 2. Serangga terinfeksi NPS/*Photorhabdus* spp.

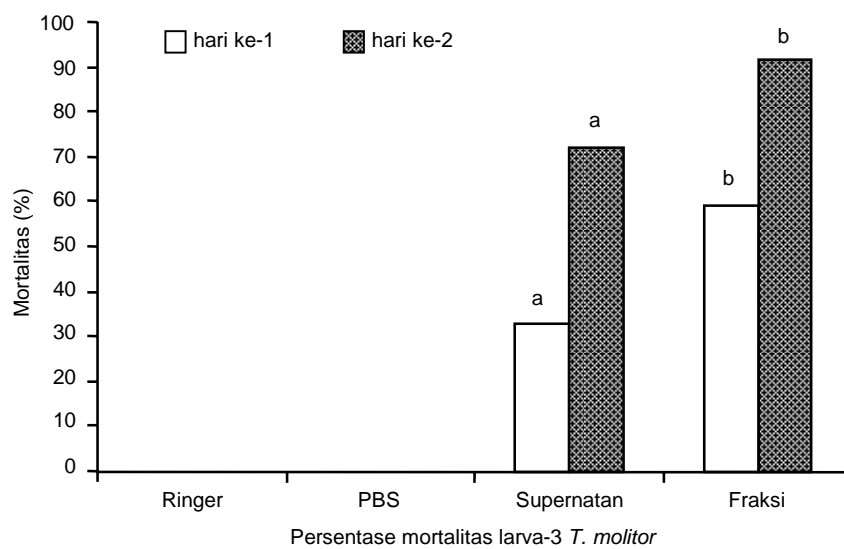
selama proses presipitasi dengan amonium sulfat dan elusi pada kolom yang disebabkan oleh semakin murninya protein. Berdasarkan hasil uji toksisitas toksin asal ekstrak kasar (supernatan sp.) dan fraksi (Fr) yang diuji terhadap larva *T. molitor* instar 3-4, menunjukkan persentase mortalitas larva oleh ekstrak kasar (supernatan) pada hari pertama sebesar 33% dan pada hari kedua sebesar 73%, sedangkan fraksi murni menunjukkan mortalitas pada hari pertama sebesar 60% dan hari kedua sebesar 93% (Gambar 4). Hal ini mengindi-

kasikan bahwa walaupun konsentrasi protein pada fraksi murni mengalami penurunan, namun kadar proteinya memiliki aktivitas toksin tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar (supernatan) yang ditunjukkan dengan persentase mortalitas lebih besar.

Produksi Ab yang dilakukan pada kelinci jenis *New Zealand White*, secara normal memberikan respon terhadap sebagian besar Ag. Pada penelitian ini telah dihasilkan sebanyak kira-kira 20 ml Ab kasar. Menurut Klement *et al.* (1990), produksi Ab antara lain



Gambar 3. Profil elusi Hi Prep 16/60 Sephacryl S200 HR dari fraksi protein toksin HJ.



Gambar 4. Bioasai toksin *Photobacterium* spp. terhadap larva-3 *T. molitor*.

ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu pemilihan jenis hewan, dosis, dan bentuk Ag, penggunaan ajuvan, prosedur, dan jumlah suntikan yang diberikan, serta selang waktu antara dua suntikan yang berurutan. Berdasarkan hasil uji titer dari serum yang diencerkan, pada penelitian ini telah diperoleh reaksi aglutinasi sampai pengenceran 320 kali. Hal ini berarti bahwa Ab telah bereaksi dengan Ag menjadi tidak larut yang ditunjukkan dengan terbentuknya gumpalan pada pengenceran ke-320 kali.

Ag dalam proporsi yang tepat bila dicampur dengan Ab akan terjadi presipitasi. Hal ini mengakibatkan terbentuknya ikatan antar sel yang menyebabkan penggumpalan (aglutinasi), tetapi bila Ag atau Ab jumlahnya relatif berlebihan maka reaksi tersebut akan berkurang. Proporsi Ag dan Ab yang tepat merupakan hal yang penting dalam uji serologi (Lelliot dan Schaad 1987). Kualitas antiserum tergantung juga pada jadwal imunisasi, umumnya makin lama dan sering pengulangan hewan distimulasi dengan Ag pita presipitin yang dihasilkan semakin banyak dan bervariasi, sehingga antiserum yang dihasilkan juga mempunyai titer yang tinggi, tetapi spesifitasnya rendah (Klement *et al.* 1990).

Evaluasi PAb dan Uji Spesifisitas dengan NCM-ELISA

Ag bakteri *Photorhabdus* spp., terikat kuat pada dinding sel yang terdiri dari suatu kompleks polisakarida, lipid, dan protein serta tidak terbilas dengan pencucian sehingga dapat dideteksi bila seluruh sel bereaksi dengan Ab. Pada uji serologi, adanya kompleks Ag-Ab digunakan sebagai dasar untuk mengetahui identitas Ag atau Ab (Van Regenmortel 1992). NCM-ELISA merupakan teknik ELISA secara kualitatif dan mempunyai kepekaan yang cukup tinggi, lebih cepat serta praktis untuk mengetahui ada tidaknya molekul patogen pada tanaman (Priou 1999). Protein terlarut, asam nukleat, macam-macam organel, jamur, bakteri,

dan virus juga dapat menempel dengan baik pada nitroselulosa. Reaksi terjadi jika enzim terikat pada molekul yang mendeteksi adanya imunoglobulin antibodi (Priou 1999). NCM-ELISA termasuk jenis *indirect* ELISA di mana Ag direaksikan dengan Ab spesifik. Ab spesifik akan berikatan dengan Ag, sedangkan yang tidak berikatan akan terbuang pada saat pencucian. Konjugat (Ab yang ditandai enzim) yang menempel pada ikatan/kompleks Ag-Ab menjadi indikator warna dan agar ikatan tadi dapat dilihat maka ditambahkan substrat enzim. Substrat bereaksi dengan konjugat, dan enzim akan menghidrolisis substrat dan menghasilkan produk akhir berwarna (Van Regenmortel 1982).

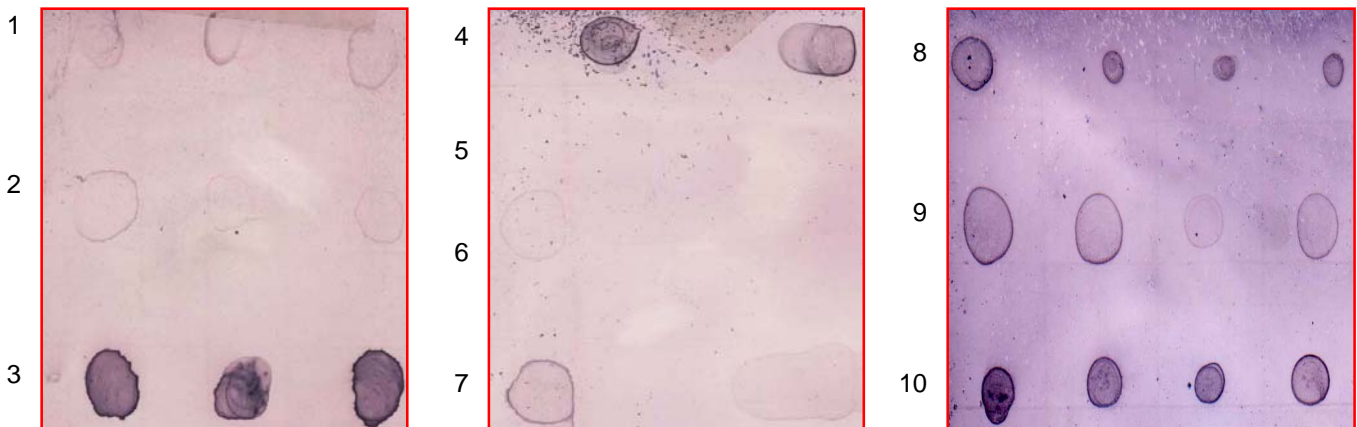
Hasil reaksi berupa intensitas warna dari masing-masing sampel setara dengan jumlah kompleks Ag-Ab spesifik yang terdapat dalam sampel serum. Semakin tinggi intensitas warna sampel, maka semakin tinggi jumlah Ab yang terkandung di dalamnya. Intensitas warna ungu bervariasi tergantung dari konsentrasi Ag yang terdeteksi. Pada Tabel 1 ditunjukkan bahwa Ag toksin ekstrak kasar dan fraksi *Photorhabdus* spp. isolat HJ dapat dideteksi oleh PAb yang diproduksi.

Evaluasi visual terhadap reaksi antara PAb dan Ag bakteri yang dideteksi dengan NCM ELISA disajikan pada Gambar 5. Dapat dilihat bahwa Ag berupa protein asal fraksi bakteri *Photorhabdus* spp. isolat HJ menunjukkan reaksi sangat kuat dengan PAb yang ditunjukkan dengan kepekatan warna ungu pada membran dibandingkan dengan protein ekstrak kasar (supernatan). Hal ini terjadi karena fraksi lebih murni dan memiliki kandungan protein toksin lebih tinggi dibandingkan supernatan. Ag bakteri lain seperti dari spesies bakteri Xoo, Xcg, Rs, Psg, Pf, dan *E. coli* yang berfungsi sebagai kontrol negatif tidak menunjukkan reaksi, kecuali pada *E. coli* masih bereaksi positif. Hal ini mengindikasikan bahwa PAb yang diproduksi menghasilkan reaksi silang dengan Ag tersebut. Pada umumnya, reaksi silang terjadi pada Ag lain yang memiliki kemi-

Tabel 1. Deteksi HJ ekstrak kasar, fraksi, dan Ag bakteri lain dengan PAb *Photorhabdus* spp. dan uji NCM-ELISA.

Jenis Ag	Reaksi
Ekstrak kasar <i>Photorhabdus</i> spp. (Sp) HJ	++
Fraksi <i>Photorhabdus</i> spp. (Fr) HJ	+++
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	+
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo)	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>glycin</i> (Xcg)	-
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Rs)	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycin</i> (Psg)	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pf)	-

Reaksi dinilai berdasarkan intensitas warna ungu pada membran, +++ = reaksi sangat kuat, ++ = reaksi kuat, + = reaksi agak kuat, - = tidak ada reaksi.



Gambar 5. Hasil deteksi toksin *Photorhabdus* spp. isolat HJ dibandingkan dengan Ag Xoo, Xcg, Rs, dan Psg *E. coli* sebagai kontrol (-). Baris 1 = Xoo, 2 = Xcg, 3 = kontrol positif, 4, 8, = fraksi HJ, 5 = Rs, 6 = Psg, 7, 10 = ekstrak kasar (supernatan) HJ, 9 = *E. coli*.

ripan struktur molekuler dengan Ag spesifiknya, dan diduga karena *E. coli* termasuk ke dalam satu famili dengan bakteri *Photorhabdus* spp. Dengan kata lain Ab yang bereaksi silang tersebut tidak hanya merespon satu Ag yang merangsang pembentukannya, tetapi juga dapat berikatan dengan Ag lain. Reaksi Ab tidak hanya terhadap Ag yang disuntikkan tetapi dapat juga terhadap Ag lain, hal ini terjadi karena PAB adalah produk dari banyak klon sel saling berhubungan yang mengakibatkan timbulnya keragaman baik spesifitas maupun afinitasnya terhadap Ab yang dihasilkan (Van Regenmortel 1982).

KESIMPULAN DAN SARAN

Produksi PAB pada kelinci telah diperoleh dan dievaluasi untuk mendeteksi senyawa toksin *Photorhabdus* spp.

PAB dan teknik NCM-ELISA efektif untuk mendeteksi toksin *Photorhabdus* spp. dan cukup spesifik dapat membedakan *Photorhabdus* spp. dengan antigen bakteri lain.

Penelitian masih perlu dilakukan untuk mengoptimalkan pengujian kepekaan antibodi *Photorhabdus* spp. serta untuk mendapatkan konsentrasi yang efektif untuk mendeteksi toksin *Photorhabdus* spp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada sdr. Febi Rizkiani sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan dan penghargaan kepada sdr. Endang Windiyati, Yusuf Habibi, dan Sujatmo atas penyediaan bioasai, perbanyak NPS, *Photorhabdus* spp., dan larva *T. molitor*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bollag, D.M., D.R. Michael, and J.E. Stuart. 1996.** Protein methods 2nd Ed. A John Wiley and Sons, Inc. Pub., New York. 414 p.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for quantification of micrograms quantities of protein utilization of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:249-254.
- Buecher, E. and I. Popiel. 1989.** Growth of *Steinernema feltiae* in liquid culture. *J. Nematol.* 21:500-505.
- Clark, M.F. 1981.** Immunosorbent assay in plant pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19:83-106.
- Forst and K. Nelson. 1996.** Molecular biology of the symbiotic pathogenic bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. *Microbiol. Rev.* 60(1):21-43.
- Kaya, H.K. and R. Gaugler. 1993.** Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38:181-206.
- Klement, Z., K. Rudolph, and D.C. Sand. 1990.** Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado Press, Budapest. 568 p.
- Klein, M.G. 1990.** Efficacy against soil inhabiting insect pests. In Gaugler, R. and H.K. Kaya (Eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control.* CRC Press, Boca Raton. p. 195-214.
- Lelliot, R.A. and D.E. Schaad. 1987.** Methods for diagnosis of bacterial disease of plant. Published on behalf of the British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publication. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo, Alto, Melbourne. 216 p.
- Poinar, G.O., Jr. 1990.** Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In Gaugler, R. and H.K. Kaya (Eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control.* CRC Press, Boca Raton. p. 23-61.
- Priou, S. 1999.** NCM-ELISA for the detection of *Ralstonia solanacearum*. User Manual. International Potato Center (CIP), Lima, Peru. 12 p.

Suryadi, Y. dan Chaerani. 1999. Potensi nematoda patogen serangga dalam pengendalian serangga hama. *Dalam Prasadja et al. (Eds.). Proc. Buku 2. Seminar Nasional PEI. Peranan Entomologi dalam Pengendalian Hama yang Ramah Lingkungan dan Ekonomis.* PEI Cabang Bogor 1999. hlm. 509-514.

Suryadi, Y. dan T.S. Kadir. 2004. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by NCM-ELISA in naturally infected rice plants. *IRRN* 29(2):34-35.

M.H.V. Van Regenmortel. 1982. Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press, New York. 302 p.

Woodring, J.L. and H.K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of techniques. South Coop. Ser. Bull. Arkans. Agric. Exp. Stn, Fayetteville 331:1-30.
