



OSIDING

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang menyalin dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

SEMINAR NASIONAL PERLINDUNGAN TANAMAN II

“Strategi Perlindungan Tanaman dalam Memperkuat Sistem Pertanian Menghadapi ASEAN Free Trade Area (AFTA) dan ASEAN Economic Community (AEC) 2015”

BOGOR, 13 NOPEMBER 2014

Bogor Agricultural University



PUSAT KAJIAN PENGENDALIAN HAMA TERPADU

Departemen Proteksi Tanaman
 Fakultas Pertanian - Institut Pertanian Bogor
 Jl. Kamper Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680
 Telp: 0251-8629364, Fax: 0251-8629362
 Email : pkpht.ipb@gmail.com

2014



ISBN: 978-602-96419-1-2

PROSIDING SEMINAR NASIONAL PERLINDUNGAN TANAMAN II

Bogor, 13 Nopember 2014

Tema:

**"Strategi Perlindungan Tanaman dalam Memperkuat Sistem
Pertanian Nasional Menghadapi ASEAN Free Trade Area (AFTA) dan
ASEAN Economic Community (AEC) 2015"**

Hak cipta dimiliki oleh Institut Pertanian Bogor



**PUSAT KAJIAN PENGENDALIAN HAMA TERPADU
DEPARTEMEN PROTEKSI TANAMAN
FAKULTAS PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Bogor Agricultural University



Tim Penyusun

Reviewer:

Dr. Ir. Abdjad Asih Nawangsih, MSi	Dr. Ir. Pudjiyanto, MSi
Dr. Ir. Abdul Munif, MSc.Agr	Dr. Ir. Ruly Anwar, MSi
Dr. Ir. Ali Nurmansyah, MSi	Dr. Ir. Supramana, MSi
Dr. Efi Toding Tondok, SP., MSi	Dr. Ir. Teguh Santosa, DEA
Dr. Dra. Endang Sri Ratna	Dr. Ir. Titiek Siti Yuliani, SU
Fitrianiingrum Kurniawati, SP., MSi	Dr. Ir. Tri Asmira Damayanti, MAgr
Dr. Ir. Giyanto, MSi	Dr. Ir. Wayan Winasa, MSi
Dr. Ir. Idham Sakti Harahap, MSi	Dr. Ir. Yayi Munara Kusumah, MSi
Dr. Ir. Nina Maryana, MSi	

Penyunting Naskah:

Nadzirum Mubin, SP., MSi
Mahardika Gama Pradana, SP
Suryadi, SP
Moch. Yadi Nurjayadi, SSI
Dede Sukaryana

Desain Sampul:

Suryadi, SP

UCAPAN TERIMA KASIH KEPADA

Sponsor:

PT. Petrosida Gresik

Pusat Kajian Pengendalian Hama Terpadu

Departemen Proteksi Tanaman
Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga Bogor
Telp./Faks: 0251-8629364
Email: pkpht.ipb@gmail.com

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.



DAFTAR ISI

Kata Pengantar	i
Sambutan Ketua Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian IPB	vii
Sambutan Wakil Rektor IPB Bidang Akademik dan Kemahasiswaan	viii
Makalah Utama	
Persiapan Sistem Perkarantinaan Nasional dalam Manajemen Risiko Hama dan Penyakit Tanaman (OPT) Menghadapi MEA 2015 Banun Harpini (Kepala Badan Karantina Pertanian)	1
Peluang dan Tantangan Perdagangan Produk Pertanian Menghadapi MEA 2015 Garjita Budi (Direktur Mutu dan Standart Dirjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian Kementerian Pertanian)	9
Keragaan Produk Pertanian Indonesia Menghadapi MEA 2015 Muh. Basuki (Kepala Bagian Proteksi Tanaman, Research and Development Department, PT. Great Giant Pineapple)	13
Inovasi Teknologi Agrokimia yang Ramah Lingkungan dalam Mendukung Produksi Pertanian yang Berdaya Saing Guntur Sulistiawan (Kepala Bagian Perencanaan dan Pengembangan Pasar PT. Petrosida Gresik)	18
Perspektif Pelaku Usaha Pertanian Menghadapi MEA 2015 Himma Zakia (Direktur CV. Salsabiila Nursery)	25
Makalah Penunjang	27
1. Biologi dan Ekologi	
Adaptasi Koloni Wereng Hijau dan Virulensi Virus Tungro dari Daerah Endemis Tungro pada Ketinggian Tempat Berbeda Dini Yuliani dan I Nyoman Widiarta	28
Biologi <i>Panacra elegantulus</i> herrich-schaffe (Lepidoptera: Sphingidae) pada Tanaman Hias <i>aglaonema</i> Rizky Marcheria Ardiyanti dan Nina Maryana	36
Biologi <i>Hyposidra talaca</i> Wlk. pada beberapa Jenis Tanaman di Sekitar Perkebunan Teh Gunung Mas PTPN VIII Bogor Yayi Munara Kusumah dan Yugih Tiadi Halala	45

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Pengaruh Instar Larva Ulat Jengkal Teh (<i>Hyposidra talaca</i> Wlk.) dan Hari Panen Polihedra Pascainokulasi terhadap Produksi Polihedra <i>Hyposidra talaca</i> Nucleopoyherovirus (<i>HNPV</i>)	59
Michelle Rizky Yuditha dan Yayi Munara Kusumah	
2. Pengendalian Hama dan Penyakit Tanaman	70
2.1 Pestisida Hayati	
Kerentanan <i>Plutella xylostella</i> dari Kecamatan Cipanas, Kabupaten Cianjur, Jawa Barat terhadap Lima Jenis Insektisida Komersial	71
Aulia Rakhman dan Djoko Priyono	
Toksistas Minyak Atsiri <i>Cinnamomum</i> spp. terhadap Ulat Krop Kubis, <i>Crocidolomia pavonana</i> , dan Keamanannya terhadap Tanaman Brokoli	79
Catur Hertika, Djoko Priyono, Gustini Syahbirin, dan Dadang	
Keefektifan Ekstrak Lima Spesies <i>Piper</i> (Piperaceae) untuk Meningkatkan Toksistas Ekstrak <i>Tephrosia vogelii</i> terhadap Hama Kubis <i>Crocidolomia pavonana</i>	88
Annisa Nurfajrina dan Djoko Priyono	
Pengembangan Formulasi Biopestisida Berbahan Aktif Bakteri Endofit dan PGPR untuk Mengendalikan Penyakit Layu Bakteri	97
Abdjad Asih Nawangsih, Eka Wijayanti, dan Juang Gema Kartika	
2.2 Pengendalian Penyakit Tanaman	104
Potensi Pemanfaatan Bakteriofage sebagai Agens Antagonis Patogen <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzae</i> Penyebab Hawar Daun Bakteri pada Padi	105
Syaiful Khoiri, M. Candra Putra, Sari Nurulita, Dian Fitriah, Fitri Fatma Wardani, dan Giyanto	
Monitoring Penyakit Utama Padi di Beberapa Sentra Produksi Padi di Jawa Tengah	112
Dini Yuliani dan Sudir	
Pengendalian Biologi Penyakit Rebah Kecambah (<i>Pythium</i> sp.) pada Tanaman Mentimun dengan Bakteri Endofit	124
Abdul Munif dan Fitriah Sumacipta	
Isolasi Cendawan Endofit dari Tanaman Padi dan Potensinya sebagai Pemacu Pertumbuhan Tanaman	132
Abdul Syukur, Mochamad Yadi Nurjayadi, dan Abdul Munif	



Potensi Kitosan dan Agens Antagonis dalam Pengendalian Penyakit Karat (<i>Phakopsora Pachyrhizi</i> Syd.) Kedelai Hagia Sophia Khairani dan Meity Suradji Sinaga	139
Aktifitas Antibiosis Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih terhadap Cendawan Patogen Tular Tanah Fitrah Sumacipta dan Abdul Munif	147
Uji Potensi Kompos Hasil Dekomposisi Empat Isolat <i>Trichoderma</i> sp. pada Pertumbuhan Tanaman Mentimun Muhammad Firdaus Oktafiyanto, Loekas Soesanto, dan Tamad	154
Pengaruh Bakteri Endofit terhadap Nematoda Puru Akar (<i>Meloidogyne</i> spp.) pada Tanaman Kopi Rita Harni	161
Eksplorasi Cendawan Antagonis dari Tanaman Kirinyuh (<i>Chromolaena odorata</i> L.) sebagai Agens Hayati dan Pemacu Pertumbuhan Hishar Mirsam, Amalia Rosya, Yunita Fauziah Rahim, Aloysius Rusae, dan Abdul Munif	167
Aplikasi Kompos yang Diperkaya Asam Humat dan Bakteri Endofit untuk Pengendalian Penyakit Blas pada Tanaman Padi Diska Dwi Lestari, Bonny P.W. Soekarno, dan Surono	176
Potensi Bakteri Endofit sebagai Agens Penginduksi Ketahanan Tanaman Padi terhadap <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzae</i> Ida Parida, Tri Asmira Damayanti, dan Giyanto	189
Isolasi dan Uji Potensi Konsorsium Bakteri Endofit Asal Tanaman Kehutanan Sebagai Agen Biokontrol dan Pemacu Pertumbuhan Tanaman Abdul Munif, Ankardiansyah Pandu Pradana, Bonny P.W. Soekarno, dan Elis N Herliyana	198
Kejadian Penyakit Cendawan Entomopatogen pada <i>Spodoptera exigua</i> (Lepidoptera: Noctuidae) dalam Jaring Tritropik pada Tanaman Bawang Daun Suci Regita, Yayi Munara Kusumah, dan Ruly Anwar	207
3. Pengetahuan, Sikap, dan Tindakan	217
Pengetahuan, Sikap, dan Tindakan Petani dalam Pengendalian Hama Terpadu Tanaman Padi di Kabupaten Lebak dan Serang Miftah Faridzi dan Abdul Munif	218

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

4. Keanekaragaman Hayati	231
Catatan Hama Baru, <i>Caloptilia</i> sp. (Lepidoptera: Gracillariidae) pada Tanaman Kedelai di Kabupaten Ngawi, Jawa Timur	232
<i>Ciptadi Achmad Yusup, Irfan Pasaribu, Lutfi Afifah, dan Purnama Hidayat</i>	
Survei Trips Pada Tanaman Krisan Di Perusahaan Bunga Potong Natalia Nursery	239
<i>Furgon Avero dan Ruly Anwar</i>	
Identifikasi Kutudaun (Hempitera: Apididae) pada Akar Padi	250
<i>Harleni, Purnama Hidayat, dan Hermanu Triwidodo</i>	
Identifikasi Kutudaun Subfamili Hormaphidinae (Hemiptera: Aphididae) Dari Bogor, Sukabumi Dan Ciamis Jawa Barat	256
<i>Yani Maharani, Purnama Hidayat, Aunu Rauf, dan Nina Maryana</i>	
Keanekaragaman Arthropoda Tanah pada Pertanaman Kedelai Di Ngale, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur	265
<i>Lutfi Afifah, Purnama Hidayat, dan Damayanti Buchori</i>	
Eksplorasi <i>Neozygites</i> sp. (Zygomycotina: Entomophthorales) pada Kutudaun Wortel, Bawang Daun, dan Mentimun di Bogor	273
<i>Syifa Febrina dan Ruly Anwar</i>	
Keanekaragaman Hymenoptera Parasitoid pada Vegetasi Bawah di Perkebunan Kelapa Sawit	281
<i>Agus Hindarto, Purnama Hidayat, dan Nina Maryana</i>	
Eksplorasi Bakteri Endofit pada Tanaman Bengkoang (<i>Pachyrrhizus erosus</i>)	288
<i>Asti Irawanti Azis, M. Rizal, Laras, dan Abdul Munif</i>	
Survei Nematoda Parasit Rumput Golf pada <i>Green</i> di klub Golf Bogor Raya	297
<i>Fitrianingrum Kurniawati dan Supramana</i>	
5. Deteksi Molekuler	305
Deteksi Migrasi Wereng Coklat (<i>Nilaparvata lugens</i> Stal) Menggunakan Zat Warna Fluoresen <i>Stardust</i>	306
<i>Ratna Sari Dewi, Eko H. Iswanto, dan Baehaki</i>	
Teknik <i>Tissue Blot Immunobinding Assay</i> dan RT-PCR langsung RNA BCMV dari <i>Nitro Cellulose Membrane</i> (NCM)	316
<i>Tri Asmira Damayanti dan Avanty Widias Mahar</i>	

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



Insidensi *Bean common mosaic virus* dari Benih Kacang Panjang Komersial dan Lokal Petani Berdasarkan Uji Serologi
Avanty Widias Mahar dan Tri Asmira Damayanti

323

Komunikasi Singkat

329

Pencegahan Penyakit Karat pada Ekaliptus dan Myrtaceae Lainnya

330

Budi Tjahjono

Daftar Peserta

333

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Teknik *Tissue Blot Immunobinding Assay* dan RT-PCR langsung RNA BCMV dari *NitroCellulose Membrane* (NCM)

Tri Asmira Damayanti dan Avanty Widias Mahar

Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Email: triasmiradamayanti@gmail.com

Abstrak

Bean common mosaic virus (BCMV) merupakan virus yang menginfeksi kacang panjang dan menyebabkan kehilangan hasil yang cukup tinggi di lapangan. Tersedianya teknik deteksi yang cepat dan mudah akan sangat membantu dalam diagnosis penyakit virus. *Tissue blot immunobinding assays* (TBIA) adalah salah satu teknik deteksi serologi yang cepat dan mudah. TBIA menggunakan kertas Nitro Cellulose Membrane (NCM) sebagai matrik solid yang mengikat protein tanaman dan virus. Agar dapat digunakan secara rutin maka perlu dilakukan optimasi untuk mendapatkan hasil deteksi yang diharapkan. Optimasi deteksi BCMV dengan TBIA dilakukan dengan menggunakan pengenceran antiserum 1:3000 sampai dengan 1:15.000. RNA total BCMV diekstraksi dari NCM dan dideteksi dengan *two-step* RT-PCR menggunakan primer spesifik gen CP BCMV. Hasil optimasi menunjukkan semakin rendah pengenceran antiserum, waktu yang dibutuhkan untuk perubahan warna ungu semakin lama. Diantara pengenceran antiserum yang diuji, pengenceran 1:3.000 sampai 1:10.000 memberikan hasil deteksi terbaik dalam waktu singkat. RT-PCR RNA total dari *blotting* daun terinfeksi BCMV pada NCM berhasil mengamplifikasi gen CP BCMV sebaik RT-PCR RNA total yang diekstraksi dengan kit komersial. Hal ini menunjukkan NCM selain dapat mengikat protein virus, juga sekaligus dapat menyimpan RNA virus dengan baik.

Kata Kunci: BCMV, NCM, RT-PCR, TBIA, NPN

Pendahuluan

Bean common mosaic virus (BCMV) adalah salah satu virus penting pada kacang panjang di Indonesia. Beberapa tahun lalu BCMV dilaporkan sebagai salah satu penyebab ledakan penyakit mosaik kuning pada kacang panjang. Insidensi penyakit mosaik kuning di lapangan tinggi dan menyebabkan kehilangan hasil yang signifikan (Damayanti *et al.* 2009). Upaya mitigasi penyakit ini telah dilakukan, dan salah satunya adalah dengan mengembangkan metode deteksi serologi dan RT-PCR yang mudah dan dapat digunakan secara rutin. Sensitivitas metode serologi *dot immunobinding assay* (DIBA) dan RT-PCR BCMV telah dilaporkan sebelumnya oleh

Anggraini dan Hidayat (2014). Salah satu metode serologi yang layak dimanfaatkan adalah *tissue blot immunobinding assay* (TBIA). Metode ini mirip dengan DIBA, namun lebih mudah dalam pengerjaannya karena tidak menggunakan sap tanaman, tetapi sampel protein tanaman langsung dijerab (*blot*) pada kertas *membrane nitrocellulose*. Kelebihan metode ini adalah dapat dimanfaatkan di lapangan saat survey koleksi sampel tanpa harus membawa atau menyimpan jaringan tanaman di laboratorium.

TBIA menggunakan membran Nitropure nitrocellulose (NPN) serta bahan tanaman segar dan dijerab pada kertas membran (Lin *et al.* 1990). Teknik TBIA merupakan kombinasi teknik ELISA dan *Dot immunobinding assay* (DIBA) serta mempunyai tingkat sensitivitas yang sama, prosedur yang digunakan sangat sederhana dan dapat digunakan untuk deteksi rutin dengan jumlah sampel yang banyak (Dijkstra dan De Jager 1998).

Pendekatan berbasis asam nukleat dipakai secara ekstensif untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus pada tanaman. *Flinders Technology Associates* (FTA) *Cards* membantu untuk mengoleksi dan menyimpan asam nukleat dari tanaman untuk digunakan secara langsung maupun tidak langsung pada deteksi asam nukleat dengan *Polymerase chain reaction* (PCR). Teknik *FTA cards* efektif untuk mendeteksi RNA virus (Ndurungu *et al.* 2005). *FTA cards* dan membran NPN keduanya terbuat dari bahan yang sama, sehingga membran NPN pada metode TBIA juga dapat digunakan untuk deteksi *Reverse transcription-PCR* (RT-PCR). Namun uji serologi sampel yang dijerab pada *FTA cards* memberikan hasil deteksi yang kurang memuaskan dibandingkan pada NPN (Chang *et al.* 2011).

Dalam pengerjaannya, teknik TBIA sangat mudah dan cepat dalam mendeteksi virus, serta *spot* yang positif terdeteksi virus dapat langsung digunakan untuk identifikasi lebih lanjut dengan RT-PCR tanpa harus menyimpan sampel yang akan diuji. Selain itu sampel yang sudah di *blot* pada kertas membran dapat disimpan dalam jangka waktu panjang (Chang *et al.* 2011). Tersedianya teknik deteksi yang cepat dan mudah akan sangat membantu dalam diagnosis penyakit virus, namun perlu dilakukan optimasi untuk mendapatkan hasil deteksi yang diharapkan. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk optimasi sensitivitas TBIA dan RT-PCR langsung BCMV dari NCM.

Bahan dan Metode

Metode TBIA. Tahapan TBIA menggunakan metode yang telah dimodifikasi oleh Lin *et al.* (1990) dan Chen *et al.* (2004). Sampel daun kacang panjang sebanyak dua lembar daun digulung, diiris secara melintang dengan silet dan dijerapkan pada kertas nitrocellulose membran (NCM) (NitroPure Nitrocellulose-*GE Water & Process Technologies*). Pada tiap pengujian selalu digunakan jaringan tanaman sehat sebagai kontrol negatif kemudian kertas NCM dikeringanginkan minimal 2 jam. Untuk keseragaman, diatas kertas membran dilarikkan kertas berpola bulatan dengan ukuran yang sama.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Kertas membran yang telah kering dicuci dengan 5% Triton X-100 (*octyphenol/poly(ethyleneglycolether)*) selama 10 menit di atas *shaker* dengan kecepatan 200 rpm untuk menghilangkan sisa tanaman, dan warna hijau daun pada kertas membran.

Setelah itu kertas membran di *blocking* dengan bufer potassium phosphate saline tween (KPST) [0,02 M K_2HPO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7,4] yang di dalamnya mengandung 0,05% Tween-20, 5% susu skim, dan 0,5% bovine serum albumin (BSA)] di atas *shaker* (200 rpm) selama 20 menit.

Kertas membran kemudian direndam ke dalam bufer KPST yang mengandung kombinasi antibodi spesifik BCMV (Agdia) dan antibodi kedua (*Rabbit anti mouse IgG*, Sigma), kemudian diinkubasi selama 90 menit di atas *shaker* dengan kecepatan 200 rpm.

Tahapan selanjutnya kertas membran dicuci menggunakan Tween Tris buffer saline (TT(S)) (0,05 M Tris base, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween, pH 7,6), sebanyak dua kali masing-masing selama 10 menit, lalu selama 5 menit. Kertas membran kemudian diwarnai dengan menggunakan substrat *nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate* (NBT/BCIP, Sigma) sampai *spot* pada kertas membran berwarna ungu untuk sampel yang positif BCMV. Reaksi dihentikan dengan membuang substrat pewarna dan mencuci membran dengan air serta kemudian kertas NPN dikeringkan di atas tisu.

Optimasi Konsentrasi Antiserum. Oleh karena belum diketahui kombinasi antiserum yang optimal untuk deteksi BCMV kacang panjang, maka dilakukan pengujian beberapa kombinasi antiserum BCMV dan *universal antiserum conjugat* (antibodi kedua). Adapun konsentrasi kombinasi antiserum yang digunakan adalah 1:3.000; 1:5.000; 1:7.000; 1:10.000; 1:13.000; dan 1:15.000. Selain optimasi konsentrasi antiserum, dilakukan juga perbandingan deteksi sap dan *spot* pada konsentrasi antiserum yang optimal.

Retrieving (mendapatkan) RNA BCMV dari NCM. RNA BCMV hasil *blotting* daun yang telah dideteksi serologi ataupun yang tidak diambil 3 bulatan berdiameter 2 mm menggunakan Harris Micro-Punch dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml. NCM dapat juga diambil menggunakan silet steril. NCM diberi 200 μ l 5% Triton X-100, divorteks perlahan selama 5 detik, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 min. Triton X-100 dibuang, dan langkah diatas diulang sebanyak 2 kali. Setelah Triton X-100 dibuang, NCM diberi 200 μ l bufer TE pH 8,0, divorteks perlahan selama 5 detik dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 min. Bufer TE dibuang, dan langkah yang sama diulang sekali lagi. Membran NCM dikeringkan selama \pm 1 jam pada tempat yang bebas kontaminasi udara (dapat dikeringkan di dalam *laminar air flow*) (Chang *et al.* 2011). Sebagai pembanding RNA total dari daun tanaman terinfeksi BCMV diekstraksi menggunakan kit ekstraksi (PKT-Korea)

Sintesa cDNA. NCM yang telah dikeringkan, diberi premix transkripsi balik sebanyak 20 μ l. Premiks transkripsi balik terdiri dari 5x bufer RT (*reverse transcription*) 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, 10 mM d(T) 2 μ l, enzim RT M-MuLV (Thermo) 1 μ l (40 U/ μ l), RNase inhibitor Ribolock (Thermo) 1 μ l (200 U/ μ l), 10 mM dNTP 1 μ l

dan air bebas nuclease sampai mencapai volume total 20 µl. Reaksi Transkripsi balik dilakukan selama 1 jam pada suhu 42 °C.

Amplifikasi DNA. RT-PCR dilakukan dengan mereaksikan 2 µl cDNA ke dalam premix PCR yang terdiri dari 5 µl 10 x bufer PCR, 1 µl 10 mM dNTP, 4 µl 25 mM MgCl₂, masing-masing 2 µl primer *forward* dan *reverse* spesifik gen CP BCMV (Anggraini dan Hidayat, 2014), 0.5 µl Hot start maxima *Taq polymerase* (Thermo)(5U/µl), 5 µl 10 x Sucrose cresol (optional) dan air bebas nuclease sampai mencapai volume total 50 µl. Program PCR yang digunakan adalah denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 5 min, 35 siklus pada suhu 94 °C selama 1 min, 68°C selama 1 min, 72 °C selama 1 min dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 min. Produk PCR gen CP BCMV berukuran sekitar 860 pb (pasang basa).

Visualisasi DNA. Separasi produk PCR dilakukan pada 1% gel agarosa yang dilatiskan dalam 0.5 X TBE dan mengandung 0.01% pEQ green pada tegangan 50 volt selama 45 menit. Penanda DNA yang digunakan adalah 1 kb plus (Invitrogen).

Perunutan DNA. DNA produk PCR dirunut urutan DNANYa pada First Base Company di Singapura. Nukleotida gen CP dianalisis homologinya terhadap BCMV yang ada di GenBank dengan BLAST-N yang sebelumnya telah diedit menggunakan *software* BioEdit.

Hasil dan Pembahasan

Hasil deteksi BCMV dengan TBIA menggunakan antiserum dengan konsentrasi berbeda menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi antiserum (pengenceran rendah) yang digunakan maka pewarnaan akan semakin jelas dan waktu pewarnaan semakin singkat (Gambar 1). Penggunaan kombinasi antiserum sampai 1:10 000 memberikan hasil yang jelas antara sampel yang positif BCMV dan sampel sehat. Namun, hasil deteksi TBIA BCMV masih dapat terlihat jelas sampai pengenceran antiserum 1:15 000. Hal ini menunjukkan bahwa sensitivitas antiserum yang cukup tinggi. Namun, waktu pewarnaan yang diperlukan menjadi lebih lama (> 7 jam); lebih lama dari proses TBIA itu sendiri. Pengenceran antiserum lebih dari 10.000 kali menyebabkan hasil deteksi *false positive* pada kontrol sehat. Hal ini karena waktu pewarnaan yang sangat lama menyebabkan perubahan warna ungu pada kontrol sehat walaupun ringan (Gambar 1).

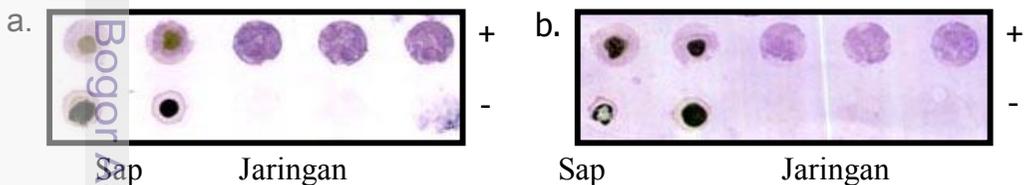
Hasil TBIA dengan menggunakan kertas membran dapat dilihat bahwa sampel positif dengan cara *blotting* langsung dari daun yang segar lebih bagus dan lebih bersih hasilnya daripada *dot spot* menggunakan sap tanaman yang digerus terlebih dahulu. Ketika proses pencucian, *blotting* langsung dari daun yang segar lebih bersih daripada *dot spot* menggunakan sap tanaman yang digerus karena sulitnya menghilangkan sisa tanaman (Gambar 2). Jika dibandingkan dengan I-ELISA dalam mendeteksi BCMV menunjukkan bahwa TBIA lebih mudah, murah, dan jauh lebih cepat dalam memberikan hasil deteksi dibandingkan I-ELISA. Dalam pengujian rutin, sering menggunakan jumlah sampel yang tidak banyak. Pada kondisi ini TBIA memberikan keleluasaan dan kemudahan dalam deteksi karena kertas membran yang

digunakan dapat disesuaikan dengan jumlah sampel. Sedangkan pada I-ELISA jumlah sampel sedikit atau banyak dalam satu plat akan membutuhkan biaya yang sama dan lebih mahal dari TBIA (Mahar 2012).

TBIA	Konsentrasi Ab	Waktu warna muncul (menit)
	1 : 3.000	10
	1 : 5.000	20
	1 : 7.000	20
	1 : 10.000	30
	1 : 13.000	420
	1 : 15.000	480

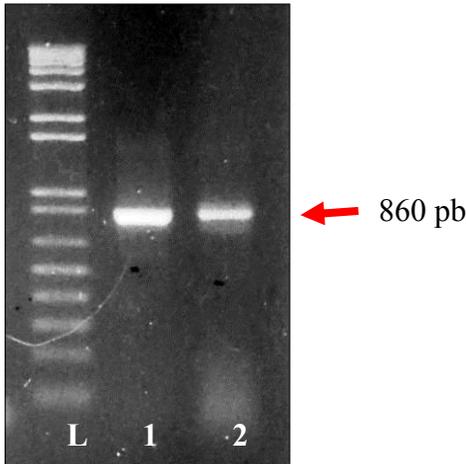
Gambar 1 Optimasi deteksi BCMV pada konsentrasi antiserum yang berbeda (+) : tanaman sakit; (-) : tanaman sehat

RT-PCR langsung RNA BCMV dari NCM berhasil teramplifikasi dengan amplicon berukuran ~860 pb *comparable* dengan RT-PCR RNA total yang diekstraksi dengan kit komersial. Intensitas DNA dari RNA yang diekstraksi dari NCM bahkan menunjukkan lebih baik dibandingkan dengan RT-PCR RNA yang diekstraksi dari kit komersial (Gambar 3). Hasil perunutan nukleotida gen CP BCMV berhasil mengkonfirmasi hasil deteksi TBIA dan RT-PCR. BCMV dari kacang panjang ini memiliki homologi nukleotida berkisar 95% sampai 98% dengan BCMV strain *black eye cowpea* (Tabel 1).



Gambar 2 TBIA BCMV kacang panjang dengan menggunakan konsentrasi antiserum. (a) ; 1:3.000; (b) ; 1:5.000; (+) : tanaman/sap terinfeksi; (-) : tanaman/sap sehat

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 3 Elektroforesis RT-PCR BCMV. RNA virus diekstraksi dari (1) NCM dan (2) diekstraksi dengan kit komersial. L, Penanda DNA 1 kb plus (Invitrogen)

Tabel 1 Homologi runutan DNA gen CP BCMV asal Dramaga Bogor terhadap BCMV dari negara lain

BCMV strain/ Isolat	% Homologi nt gen CP	Negara	No.Akresi
BCMV-BIC	98	Taiwan	AY575773.1
BCMV-BIC	98	Taiwan	AF395678.1
BCMV-PSU1	98	Thailand	FR775796.1
BCMV-BIC	98	USA	Y17823.1
BCMV-Soy	97	China	KV832501.1
BCMV-BIC	95	Vietnam	DQ925423.1

Berdasarkan hasil deteksi diatas menunjukkan kemampuan NCM menyimpan protein dan RNA virus dengan baik untuk diagnosis serologi sekaligus molekuler. NCM menawarkan cara cepat dan mudah menyimpan virus tumbuhan tanpa menyimpan jaringan tanaman. Pemanfaatan NCM akan sangat berguna saat dilakukan survei dan koleksi sampel virus yang diambil pada lokasi yang jauh dari laboratorium pengujian. Sampel dapat segera disimpan dengan menjerab gulungan daun setelah dipotes ke NCM. Aplikasi teknik TBIA dan RT-PCR langsung dilaporkan berhasil mendeteksi *Cucumber mosaic virus*, *Peanut stunt virus*, *Tobacco etch virus*, *Soybean mosaic virus* dan *Turnip mosaic virus*. Sampel virus dapat disimpan dalam NCM pada suhu ruang sampai 10 bulan (Chang *et al.* 2011).

Kesimpulan

BCMV dapat terdeteksi dengan TBIA sampai pengenceran antiserum 1:15.000. Makin tinggi pengenceran antiserum, waktu yang diperlukan untuk perubahan warna ungu menjadi lebih panjang, sehingga dapat mengakibatkan false

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

positif pada sampel sehat jika pewarnaan terlalu lama. Pengenceran antiserum paling baik dalam mendeteksi BCMV maksimal sampai pengenceran 1:10.000. TBIA jaringan tanaman langsung memberikan hasil deteksi yang paling baik dibandingkan menggunakan sap. NCM terbukti dapat menyimpan RNA virus dengan baik, sehingga teknik TBIA ini dapat mengurangi penyimpanan sampel daun segar. RT-PCR langsung RNA BCMV dari NCM memberikan hasil deteksi yang sebanding dengan RNA virus yang diekstraksi dengan kit komersial

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini terlaksana atas dana penelitian dari IPVDN IPM-CRSP Global theme tahun 2012/2013 dan 2013/2014.

Daftar Pustaka

- Anggraini S, Hidayat SH. 2014. Sensitivitas metode serologi dan *polymerase chain reaction* untuk mendeteksi *Bean common mosaic potyvirus* pada kacang panjang. *J Fitopatol Indon.*10 (1): 17-22.
- Chang Peta-Gaye S, Mclaughlin Wayne A, Tolin Sue A. 2011. Tissue blot immunoassay and direct RT-PCR of cucumoviruses and potyviruses from the same NitroPure nitrocellulose membrane. *J Virol Method.*117: 345-351.
- Chen P, Buss GR, Tolin SA. 2004. Reaction of soybean to single and double inoculation with different *Soybean mosaic virus* strains. *Crop Protection.* 23: 965-971.
- Damayanti TA, OJ Alabi, RA Naidu, Rauf A. 2009. Severe outbreak of a yellow mosaic disease on the yard long bean. In Bogor, West Java. *Hayati J Biosci.* 16: 78-82
- Dijkstra J, De Jagger. 1998. *Practical Plant Virology: Protocol and Exercise.* Boston: Springer.
- Ndurungu J, Taylor NJ, Yadav J. Aly H, Legg JP, Aveling T, Thompson G, Fauquet CM. 2005. Application of FTA technology for sampling recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. *Virology.* 2: 45, doi:10.1186/1743-422X-2-45.
- Lin NS, Hsu YH, Hsu HT. 1990. Immunological detection of plant viruses dan a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathol.* 80: 824-828.
- Mahar AW. 2012. Deteksi serologi *Bean common mosaic virus* (BCMV) dari benih kacang panjang (*Vigna sinensis* L.) komersial dan petani [skripsi]. Institut Pertanian Bogor.