

**VALIDASI METODE INDEKSING *CITRUS TRISTEZA VIRUS* (CTV) DENGAN
ELISA TEST DAN *CITRUS VEIN PHLOEM DEGENERATION* (CVPD) DENGAN
PCR TEST UNTUK MENINGKATKAN JAMINAN MUTU LABORATORIUM
PENGUJIAN BALITJESTRO**

*The Methods Validation Indexing Technique Of Citrus Tristeza Virus (CTV) By Elisa
Test And Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) With Pcr Test To Improve Quality
Assurance Of Testing Laboratories Icsfri*

Triasih, U, Agustina, D, Triwiratno, A

Balai penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No.1, Junrejo-
Kota Batu Jawa Timur 65301

Email : ununtriasih82@yahoo.com , contact person : 081233151232

Abstrak

Laboratorium Pengujian Balitjestro terakreditasi Komite Akreditasi Nasional (KAN) sesuai dengan standar ISO/IEC 17025/2005 melayani pengujian indeksing Citrus Tristeza Virus (CTV) dan Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) pada tanaman jeruk. Dalam melakukan pengujian, laboratorium mempunyai prosedur pengendalian mutu hasil pengujian untuk memastikan keabsahan prosedur dan pemenuhan standar mutu secara konsisten dan berkelanjutan. Untuk meningkatkan jaminan mutu laboratorium melaksanakan validasi metode terdiri dari verifikasi tanaman positif kontrol dan negatif kontrol, uji banding antar analis, uji banding antar laboratorium. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui apakah metode yang digunakan valid sehingga suatu metode mempunyai tingkat kepercayaan yang tinggi. Pengujian dilakukan dengan cara mengambil daun yang bergejala positif CTV, CVPD dan daun yang tidak bergejala CTV, CVPD. Tahap pertama verifikasi tanaman positif dan negatif kontrol, tahap kedua uji banding antar analis sebanyak 10 sampel dilakukan oleh dua analis, tahap ketiga uji banding antar laboratorium sebanyak 10 sampel dilakukan dengan cara mengirimkan sampel ke laboratorium yang berbeda tetapi dilakukan dengan sampel dan waktu yang sama. Semua tahap pengujian menggunakan metode yang didokumentasikan dalam instruktur kerja masing-masing. Hasil dari pengujian ini adalah dari ketiga tahapan menunjukkan hasil yang sama sehingga dapat disimpulkan metode yang digunakan valid dan mempunyai tingkat kepercayaan yang tinggi untuk persyaratan pengujian serta memberikan jaminan mutu hasil pengujian yang baik.

Kata Kunci: Indeksing, CTV, CVPD

Abstract

The ICSFRI testing laboratories accredited by National Accreditation Committee (KAN) in accordance with the standard ISO/IEC 17025/2005 serves indexing testing on Citrus Tristeza Virus (CTV) and Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) on Citrus plants. When testing, the laboratory has a quality control procedures to ensure the validity of the procedure and the fulfilment of quality standards consistently and sustainably. To improve the quality assurances laboratory to carry out validation methods consists of positive and negative plant control verification, comparison test between analyst, comparison test between testing Laboratories. The purpose of this test was to determine whether the method used is valid to ensure reliable result. The test was done by taking positive CTV and CVPD symptomed leaves as well as the ones without symptom. The first phase is verification of positive and negative control plants; the second phase is comparison test using 10 samples done by 2 analyst; the third phase is comparison test using 10 samples by sending the some samples to other laboratories. All phases used documented methods

within each working instructor. The result showed similar result of test from those 3 phases which then confirmed that the methods used were valid and have high accuracy which are necessary for testing requirement and test result quality guarantee.

Key words: Indeksing, CTV, CVPD

PENDAHULUAN

Pada era globalisasi ini, jaminan mutu suatu hasil pengujian sudah merupakan tuntutan pasar. Penyajian data pengukuran yang akurat merupakan salah satu syarat bagi laboratorium pengujian untuk mendapatkan pengakuan dari pelanggan maupun lembaga yang menerbitkan sertifikat. Jaminan mutu merupakan suatu kegiatan yang diterapkan dalam pengujian memenuhi persyaratan mutu sehingga data yang dihasilkan dari pengujian dapat diterima oleh pengguna atau pelanggan.

Di masa sekarang ini laboratorium yang kompeten harus terakreditasi oleh lembaga KAN sesuai dengan persyaratan standar nasional/internasional ISO/IEC 17025/2005, sehingga apabila laboratorium sudah terakreditasi bisa memberikan jaminan bahwa hasil pengujian yang dilaksanakan mempunyai data yang bisa dipercaya kebenarannya.

Akreditasi merupakan serangkaian kegiatan yang dilaksanakan untuk mendapatkan suatu pengakuan secara formal dari lembaga yang telah ditunjuk untuk menerbitkan sertifikat. Laboratorium yang telah terakreditasi harus menerapkan semua persyaratan yang ada pada ISO/IEC 17025/2005, salah satunya adalah evaluasi jaminan mutu hasil pengujian yang dilakukan secara rutin sesuai dengan prosedur yang telah ditetapkan oleh laboratorium (Supriyanto C, *et al* 2007).

Verifikasi pengujian dan validasi sangat penting dilakukan laboratorium untuk memastikan bahwa pengujian yang dilakukan hasilnya seperti diharapkan oleh penggunanya. Analisis awal hasil uji yang dihasilkan melalui verifikasi merupakan proses untuk mengkonfirmasi karakteristik kinerja pengujian diharapkan. Jenis verifikasi tergantung pada jenis uji yang diverifikasi dan dapat berkisar dari perbandingan agak sederhana untuk analisis yang jauh lebih kompleks. Sebaliknya, tes validasi, adalah proses yang berkelanjutan untuk memantau dan memastikan bahwa uji terus melakukan seperti yang diharapkan dan biasanya dicapai melalui rencana laboratorium jaminan kualitas (Robert J. Tibbets, 2015).

Jaminan mutu hasil pengujian mempunyai prosedur pengendalian mutu untuk memantau keabsahan pengujian yang dilakukan, data yang dihasilkan harus direkam sedemikian rupa sehingga semua kecenderungan kesalahan dapat dideteksi (ISO/IEC 17025:2005) . Laboratorium Pengujian Balitjestro pada saat ini sudah menerapkan standar nasional/internasional ISO/IEC 17025:2005. Dalam ISO/IEC 17025:2005, untuk mengetahui unjuk kerja metode dengan cara melaksanakan verifikasi metode atau validasi metode. Beberapa tahapan verifikasi antara lain adalah uji verifikasi melaksanakan verifikasi tanaman positif dan negatif kontrol, uji homogenitas, uji banding antar analisis dan uji banding antar laboratorium (ISO/IEC, 2005).

Ruang lingkup dari laboratorium pengujian Balitjestro adalah indeksing Citrus Tristeza Virus (CTV) dan Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD). Kedua penyakit kelompok *viruses* tersebut merupakan penyakit penting pada tanaman jeruk yang sangat

merugikan dan menurunkan produktifitas tanaman. CVPD merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman jeruk yang disebabkan oleh bakteri *liberibacter asiaticus* yang mempunyai gejala khas belang-belang kuning(bloothching) tidak merata mulai berkembang pada ujung tanaman ,pada daun yang ketuaannya sempurna. Sedangkan CTV merupakan penyakit tanaman jeruk yang mempunyai gejala *vein clearing* (pemucatan pada tulang daun), *vein cupping* (tepi daun melengkung keatas) dan *vein crocking* (Dwiastuti ME,*et al*, 2011). Kinerja hasil uji laboratorium pengujian sangat menentukan status kelayakan tanaman jeruk, terutama tanaman pohon induk jeruk bebas penyakit, baik Blok Fondasi maupun Blok Penggandaan Mata Tempel apakah bisa digunakan sebagai bahan perbanyakan atau tidak.

Verifikasi metode uji adalah konfirmasi ulang dengan cara menguji suatu metode dengan melengkapi bukti-bukti yang obyektif (ISO/IEC 17025 :2005). Jika pengujian tersebut mempunyai hasil yang sama berarti metode yang digunakan valid dan layak digunakan untuk pengujian. Verifikasi juga mewajibkan uji banding antar laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui unjuk kerja suatu metode analisis merupakan suatu metode baku yang dapat dilaksanakan oleh laboratorium lain dengan hasil uji yang sama, sehingga dapat digunakan dan dikembangkan oleh suatu laboratorium pengujian. Demikian juga dengan bahan pembanding yaitu tanaman kontrol positif dan negatif yang digunakan dalam setiap pengujian, harus diverifikasi bahwa tanaman tersebut betul-betul sehat sebagai kontrol negatif dan betul-betul terinfeksi CTV atau CVPD yang digunakan sebagai kontrol positif. Data yang diperoleh dari hasil verifikasi bisa untuk membuktikan bahwa laboratorium yang bersangkutan mampu melakukan pengujian dengan metode tersebut dan mempunyai hasil yang valid (Riyanto, 2014).

Tujuan dari kegiatan pengujian ini adalah untuk mengetahui apakah metode yang digunakan untuk indeksing CTV dan CVPD valid dan mempunyai jaminan mutu yang tinggi tingkat kepercayaannya.

Manfaat dari kegiatan ini adalah dengan meningkatnya kompetensi laboratorium dalam melakukan pengujian yang sesuai dengan metode yang telah divalidasi, maka tingkat kerugian petani akibat infeksi CTV dan CVPD dapat dikurangi karena hasil uji indeksing cepatnya dapat dipercaya.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanan pada bulan Agustus sampai dengan bulan Desember 2014 di laboratorium pengujian Balitjestro dan khusus untuk uji banding antar laboratorium dilakukan di laboratorium pengujian Balitjestro dengan Balithi untuk CTV dan Universitas Negeri Malang untuk pengujian CVPD.

Kedua metode pengujian indeksing yang divalidasi adalah metode uji ELISA (*Enzyme- Lynked Immunosorben Assay*) untuk CTV dan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk CVPD. Keduanya merupakan metode pengujian kualitatif yaitu hasil ujinya. menyatakan positif dan negatif dengan atau tidak disertai oleh angka kuantitatif. Metode tersebut mengacu pada instruksi kerja metode CVPD (IKM 01) dan (IKM 02) instruksi kerja metode CTV (Balitjestro, 2014).

Metode yang digunakan dalam kegiatan pengujian ini adalah metode pengujian kualitatif. Metode pengujian kualitatif merupakan suatu pengujian yang hanya dapat

menyatakan positif dan negatif. Metode yang digunakan mengacu pada instruksi kerja metode CVPD (IKM 01) dengan ekstraksi DNA dari daun jeruk. Setelah mendapatkan DNA, kemudian DNA di PCR dengan menggunakan alat Thermal Cycler. Komposisi yang digunakan kit PCR, primer Forward (OI1) dan primer reverse (OI2C) . Siklus PCR yang digunakan adalah Pre-treatment : 94° C, 3 menit (1 siklus), 40 siklus, Denaturasi 94° C 1 menit, Annealing 55° C 1 menit, Extension 72° C 2 menit, Post extension 72° C 10 menit. (Zubaidah.S, 2006). Setelah proses PCR selesai dilakukan pembacaan dengan running di elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 1 % 100 volt selama 60 menit. Visualisasi hasil elektroforesis dibaca di Biodoc analysis (BDA) untuk mengetahui sampel positif atau tidak bakteri penyebab penyakit CVPD.

Untuk pengujian CTV dilakukan dengan menggunakan instruksi kerja metode CTV (IKM 02) laboratorium pengujian Balitjestro. Pengujian dilakukan dengan ekstraksi tulang daun dari tanaman jeruk dengan buffer ekstrak. Setelah sampel diekstrak ,sampel sebanyak 100 µl dimasukkan dalam lubang plate yang telah dilapisi larutan antibodi dan conjugate, untuk proses terakhir pada plate Elisa dimasukkan larutan substrat ditambah dengan tablet PNP. Diinkubasi selama 30 menit dan diamati hasil reaksi secara visual terhadap perubahan warna kuning, bandingkan dengan warna kuning pada kontrol positif dan warna putih pada kontrol negatif, pembacaan diperkuat secara kuantitatif dengan pengukuran nilai absorbansi menggunakan elisa reader pada filter 405 nm. Ada beberapa persiapan sampel yang harus dilaksanakan antara lain :

1. Uji verifikasi kontrol positif dan negatif

Pengujian CTV dan CVPD menggunakan sampel daun yang masih segar, mempunyai tingkat ketuaan sedang dan bukan tunas muda. Verifikasi tanaman kontrol positif dan kontrol negatif dilaksanakan setiap 1 tahun sekali dengan cara mengambil sampel daun tanaman jeruk yang ada di screen house. Jumlah sampel yang digunakan untuk pengujian kontrol negatif CTV dan CVPD sebanyak 18 sampel sedangkan untuk pengujian tanaman kontrol positif, untuk CTV sebanyak 5 sampel dan untuk CVPD sebanyak 3 sampel. Pengujian dilakukan oleh analis laboratorium pengujian Balitjestro, parameter hasil uji yang diamati adalah sampel positif atau negatif CTV dan CVPD.

2. Uji banding antar analis

Uji banding antar analis untuk pengujian CTV dan CVPD dilaksanakan 1 tahun sekali dengan menggunakan sampel sebanyak 10 sampel untuk masing-masing pengujian. Pengujian dilakukan oleh dua orang analis yang ada di laboratorium pengujian Balitjestro dengan menggunakan sampel, bahan dan metode yang sama. Hasil pengujian untuk kedua analisa yang diamati adalah apakah analis 1 dan analis 2 memperoleh hasil yang sama untuk sampel yang dinyatakan positif dan negatif.

3. Uji banding antar laboratorium

Uji banding antar laboratorium dilaksanakan dengan menguji sampel yang bergejala CTV dan CVPD serta sampel tanaman yang tidak bergejala CTV dan CVPD. Pengujian ini dilaksanakan dengan mengirimkan sampel tulang daun jeruk ke laboratorium Balithestro untuk CTV dan ke laboratorium Biologi Universitas Negeri Malang untuk CVPD. Sampel yang digunakan sebanyak 10 sampel untuk masing-masing pengujian, dimana sampel dikemas dengan silica gel serta diberi kode

sebelum dikirim ke laboratorium pembandingan, dilampiri petunjuk metode pelaksanaan pengujian. Setelah itu sampel dan petunjuk teknis pelaksanaan pengujian didistribusikan ke laboratorium yang dituju dengan rapi, aman dan kode alamat yang jelas.

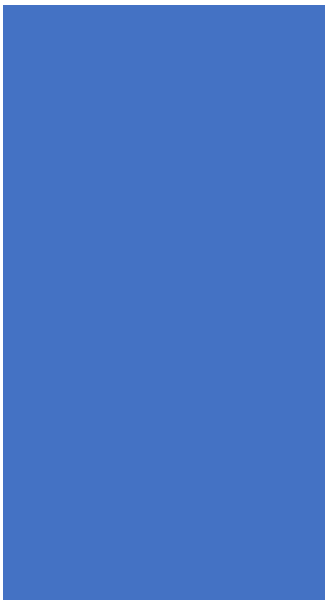
HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Uji Verifikasi Tanaman Kontrol Positif Dan Kontrol Negatif

1.1. Verifikasi tanaman kontrol positif dan negatif CVPD dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

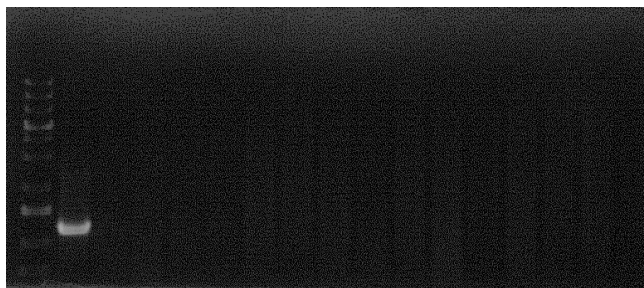
Hasil uji verifikasi tanaman kontrol menunjukkan bahwa 18 tanaman kontrol negatif semuanya menunjukkan hasil negatif tidak mengandung, dan 3 tanaman kontrol positif CVPD semuanya menunjukkan hasil positif (tabel 1)

Tabel 1. Hasil uji verifikasi pada tanaman kontrol negatif dan positif untuk pengujian dengan metode PCR

No sampel	Hasil pengujian	
	Kontrol positif	kontrol negatif
NC	-	-
PC	+	+
1	+	-
2	+	-
3	+	-
4		-
5		-
6		-
7		-
8		-
9		-
10		-
11		-
12		-
13		-
14		-
15		-
16		-
17		-
18		-

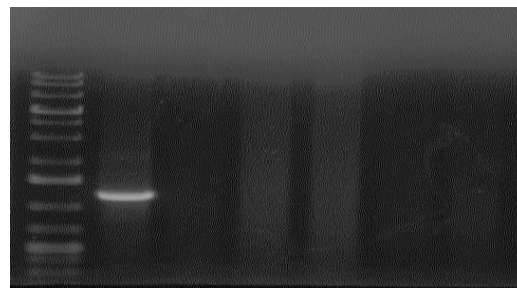
Keterangan : NC : negatif kontrol ; PC : positif kontrol

- + = Hasil uji positif berdasarkan uji PCR dengan primer OI1 dan OI2C, berarti tanaman terinfeksi CVPD dan band berada pada ukuran 1160 bp
- = Hasil uji negatif berdasarkan uji PCR dengan primer OI1 dan OI2C dan tidak ada band pada 1160 bp berarti tanaman sehat, tidak ada infeksi CVPD



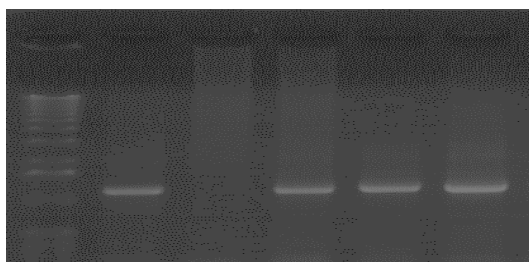
L PC NC 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Gambar 1. Gel hasil verifikasi kontrol negatif



L PC NC 15 16 17 18

Gambar 2. Gel hasil verifikasi kontrol negatif



L PC NC 1 2 3

Gambar 3. Gel hasil verifikasi kontrol positif

Hasil amplifikasi PCR terhadap DNA yang diisolasi dari sampel daun tanaman jeruk tidak bergejala (tanaman kontrol negatif) dan yang bergejala penyakit CVPD (tanaman kontrol positif) dapat dilihat pada gambar gel di atas. Hasil elektroforesis gel 1 % menunjukkan bahwa adanya pita DNA dengan ukuran 1160 bp yakni 3 sampel yang diuji (Gambar 3), hal itu berarti tiga sampel tersebut mengandung bakteri *Liberobacter* dimana patogen penyebab penyakit CVPD adalah bakteri *L. asiaticum* karena keberadaan bakteri ini terdeteksi dengan primer 16S rDNA. Hasil amplifikasi sampel kontrol negatif dari 18 sampel (gambar 1 dan 2) yang diuji menunjukkan hasil tidak ada pita DNA pada ukuran 1160 berarti sampel negatif CVPD dan tidak mengandung bakteri *L. asiaticum*.

Pada pengujian CVPD menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*), dimana teknik ini merupakan suatu teknik biologi molekuler yang digunakan untuk memperbanyak DNA spesifik hingga menjadi jutaan kali semula. Alat yang digunakan adalah *Thermal Cycler*, alat ini bisa mengatur suhu sesuai dengan urutan dan waktu yang diinginkan. Saat melakukan metode PCR harus ada kontrol positif untuk mengetahui reaksi PCR berjalan baik atau tidak, selain itu juga harus ada kontrol negatif untuk mencegah kontaminasi pada PCR (Handoyo & Rudiretna 2000:28). Untuk mendapatkan kontrol positif dan kontrol negatif maka laboratorium pengujian Balitjestro melakukan verifikasi tanaman positif dan negatif kontrol.

1.2. Verifikasi tanaman kontrol positif dan kontrol negatif CTV dengan metode DAS Elisa.

Pengujian CTV menggunakan teknik ELISA (*Enzyme- Lynked Immunosorben Assay*), dimana teknik ini mendeteksi adanya antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Pada pengujian ini menggunakan antibodi spesifik CTV untuk mengetahui adanya antigen pada sampel. Hasil dari proses ELISA terdiri dari dua bentuk yaitu kualitatif dan kuantitatif. Hasil kualitatif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada well plate

,apabila berwarna kuning maka sampel positif CTV, jika tidak berwarna maka sampel negatif. Perubahan warna dihasilkan oleh reaksi antara substrat dengan enzim yang ada di antibodi. Hasil secara kuantitatif adalah nilai absorbansi pada sampel yang diukur dengan menggunakan alat ELISA Leader (Crowther 2001: 10 dalam Mifa Nurfadilah,2015).

Verifikasi tanaman kontrol negatif dilakukan dengan mengambil daun dari 18 tanaman sehat dan 5 tanaman yang bergejala CTV yang ada di screen house. Kemudian dilakukan uji CTV berdasarkan metode yang ada pada IKM 02. Hasil verifikasi negatif dan kontrol positif dapat dilihat dibawah ini:

Tabel 2. Hasil pengujian verifikasi tanaman negatif kontrol dan positif kontrol uji CTV

No sampel	Hasil pengujian			
	Absorbansi	Kontrol positif	Absorbansi	kontrol negatif
NC	0.001	-	0.011	-
PC	0.103	+	0.103	+
1	0.109	+	0.018	-
2	0.103	+	0.020	-
3	0.121	+	0.010	-
4	0.114	+	0.012	-
5	0.107	+	0.020	-
6			0.011	-
7			0.018	-
8			0.020	-
9			0.011	-
10			0.018	-
11			0.020	-
12			0.020	-
13			0.018	-
14			0.018	-
15			0.019	-
16			0.019	-
17			0.020	-
18			0.017	-

Keterangan : NC : negatif kontrol ; PC : positif kontrol

(+) = Reaksi positif (kuning), Hasil uji positif berdasarkan uji ELISA dikatakan + apabila sampel > 2 NC berarti tanaman terinfeksi CTV

(-) = Reaksi negatif (bening), Hasil uji negatif berdasarkan uji ELISA dikatakan - apabila sampel ≤ NC berarti tanaman sehat, tidak ada infeksi CTV

Hasil pengujian CTV untuk verifikasi tanaman kontrol negatif menunjukkan bahwa tanaman negatif kontrol sebanyak 18 tanaman berwarna bening dan nilai absorbansi dibawah nilai absorbansi 2x NC yaitu dibawah 0.022, hal ini menunjukkan hasil negatif CTV berarti 18 tanaman kontrol negatif layak dijadikan sebagai kontrol untuk pengujian CTV. Hasil uji verifikasi untuk tanaman kontrol positif CTV sebanyak 5 tanaman menunjukkan bahwa nilai absorbansi sampel dua kali nilai absorbansi negatif kontrol, nilai tertinggi ada pada sampel no 3 yaitu 0.121 dimana semakin tinggi nilai absorbasni berarti

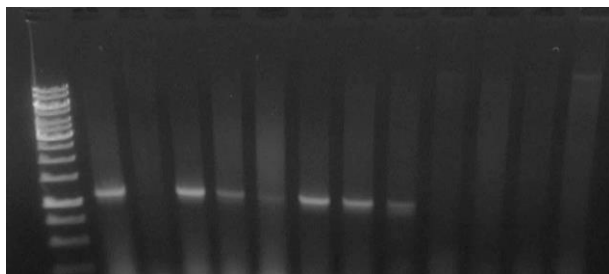
semakin tinggi virus yang terdapat dalam tanaman dan tanaman layak digunakan sebagai kontrol positif pengujian CTV yang disimpan sebagai bank virus.

2. Uji Banding Antar Analisis.

2.1. Uji CVPD dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

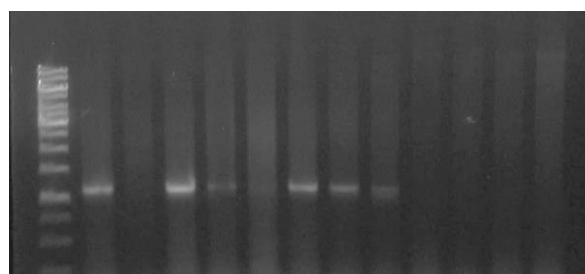
Uji banding antar analisis dilakukan dengan menggunakan contoh tanaman yang diambil dari lapang dan dari screen house sebanyak 10 sampel. Nilai positif ditunjukkan pada pita gel dengan ukuran 1160 bp. Pada contoh yang menunjukkan kemunculan band dengan ukuran pita yang sama dengan positif kontrol, maka contoh tersebut positif CVPD dan terinfeksi bakteri *L. asiaticum*. Uji banding analisa CVPD dilakukan antar 2 (dua) analisis. Analisis 1 dan analisis 2, sampel yang digunakan adalah dari tanaman yang sama. Hasil uji banding menunjukkan hasil yang sama, dapat dilihat pada gambar di bawah ini :

Analisis I



Gambar 4. Gel hasil uji analisis 1

Analisis 2



Gambar 5. Gel hasil uji analisis 2

Sekuen spesifik CVPD pada 16 Sr DNA dari hasil PCR sampel tanaman menggunakan primer spesifik CVPD untuk strain Asia akan mengamplifikasi pada 1160 bp (Jagoux *et al.*, 1994 dalam Einstivina *et al.*). Hasil pengujian yang dilaksanakan oleh dua orang analisis secara terpisah menghasilkan data analisa yang sama, berdasarkan hasil pembacaan pada Biodoc analisis menunjukkan bahwa pita DNA yang berhasil teramplifikasi berukuran 1160 bp adalah sampel no 1, 2, 3, 4, 5, 6 , hasil positif terinfeksi bakteri *Liberobacter asiaticum*. Dengan menggunakan metoda dan bahan yang sama maka analisa CVPD dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) bisa dilaksanakan oleh analisis yang berbeda.

Tabel 3. Hasil analisa CVPD oleh dua orang analisis

NO	NOMOR CONTOH	HASIL CVPD	
		Analisis 1	Analisis 2
1	Kontrol positif	+	+
2	Kontrol negative	-	-
3	Contoh No.1	+	+
4	Contoh No.2	+	+
5	Contoh No.3	+	+
6	Contoh No.4	+	+
7	Contoh No.5	+	+
8	Contoh No.6	+	+
9	Contoh No.7	-	-
10	Contoh No.8	-	-
11	Contoh No.9	-	-
12	Contoh No.10	-	-

Keterangan : NC : negatif kontrol ; PC : positif kontrol

- + = Hasil uji positif berdasarkan uji PCR dengan primer OI1 dan OI2C, berarti tanaman terinfeksi CVPD dan band berada pada ukuran 1160 bp
- = Hasil uji negatif berdasarkan uji PCR dengan primer OI1 dan OI2C dan tidak ada band pada 1160 bp berarti tanaman sehat, tidak ada infeksi CVPD

2.2. Analisa CTV dengan metode DAS Elisa.

Uji banding antar analis dilakukan menggunakan contoh tanaman yang diambil dari lapang dan dari screen house sebanyak 10 sampel. Nilai positif ditunjukkan pada contoh yang mempunyai nilai absorbansi lebih besar 2 kali nilai absorbansi negatif kontrol (2x NC), maka contoh tersebut dinyatakan positif CTV. Uji banding analisa CTV dilakukan antar 2 (dua) analis, analis 1 dan analis 2 menguji sampel tanaman yang sama dan dikerjakan pada waktu yang sama. Dari hasil uji banding menunjukkan hasil yang sama, dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4 . Hasil analisa CTV oleh analis 1 dan analis 2.

NO	NOMOR CONTOH	Hasil CTV			
		Analisis 1		Analisis 2	
		Hasil	Absorbansi	Hasil	Absorbansi
1	Kontrol positif	+	1.123	+	1.123
2	Kontrol negatif	-	0.003	-	0.003
3	Contoh No.1	+	0.117	+	0.117
4	Contoh No.2	-	0.002	-	0.000
5	Contoh No.3	-	0.001	-	0.003
6	Contoh No.4	+	0.111	+	0.111
7	Contoh No.5	+	0.101	+	0.101
8	Contoh No.6	-	0.003	-	0.003
9	Contoh No.7	+	0.112	+	0.112
10	Contoh No.8	-	0.003	-	0.003
11	Contoh No.9	-	0.000	-	0.001
12	Contoh No.10	-	0.000	-	0.000

Keterangan : NC : negatif kontrol ; PC : positif kontrol

- (+) = Reaksi positif (kuning), Hasil uji positif berdasarkan uji ELISA dikatakan + apabila sampel > 2 NC berarti tanaman terinfeksi CTV
- (-) = Reaksi negatif (bening), Hasil uji negatif berdasarkan uji ELISA dikatakan - apabila sampel ≤ NC berarti tanaman sehat, tidak ada infeksi CTV

Pembacaan hasil pengujian yang dilaksanakan oleh dua orang analis secara terpisah menghasilkan analisa yang sama, ditunjukkan oleh contoh positif terinfeksi patogen *Citrus Tristeza Virus* (CTV) penyebab penyakit Tristeza apabila nilai absorbansi 2 kali nilai NC (negatif kontrol) ada pada contoh no 1, 4, 5, 7, nilai absorbansi sampel lebih dari 0.006 dan nilai absorbansi tertinggi pada sampel no 7 yaitu 0.112. Nilai ini menandakan tingkat aktivitas enzim fosfat yang menunjukkan antibodi pendeteksi dapat bereaksi dengan partikel virus tristeza. Menggunakan metoda dan bahan yang sama sesuai prosedur, maka hasil uji CTV mempunyai tingkat akurasi yang tinggi sehingga metode ELISA bisa dilaksanakan oleh analis yang berbeda.

3. Uji Banding Antar Laboratorium

3.1. Uji CVPD dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Uji banding dilaksanakan pada tanggal 7-8 Desember 2014 antara dua laboratorium, yaitu Laboratorium Pengujian Balitjestro, dan laboratorium jurusan Biologi FMIPA-Universitas Negeri Malang. Jumlah contoh yang dianalisa sebanyak 10 contoh, dengan contoh berupa daun tanaman jeruk yang bergejala CVPD. Analisa dilakukan dengan metode yang sama yaitu PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan pembacaan dengan elektroforesis dan BDA. Hasil pengujian antar dua laboratorium dapat dilihat pada tabel dibawah ini ;

Tabel 6. Hasil pengujian CVPD antar laboratorium

NO	NOMOR CONTOH	HASIL PENGUJIAN CVPD	
		BALITJESTRO	UNIVERSITAS NEGRI MALANG
1	Kontrol positif	+	+
2	Kontrol negative	-	-
3	Contoh No.1	-	-
4	Contoh No.2	-	-
5	Contoh No.3	-	-
6	Contoh No.4	-	-
7	Contoh No.5	-	-
8	Contoh No.6	-	-
9	Contoh No.7	+	+
10	Contoh No.8	+	+
11	Contoh No.9	-	-
12	Contoh No.10	+	+

Keterangan : NC : negatif kontrol ; PC : positif kontrol

+ = Hasil uji positif berdasarkan uji PCR dengan primer OI1 dan OI2C, berarti tanaman terinfeksi CVPD dan band berada pada ukuran 1160 bp

- = Hasil uji negatif berdasarkan uji PCR dengan primer OI1 dan OI2C dan tidak ada band pada 1160 bp berarti tanaman sehat, tidak ada infeksi CVPD

Hasil uji banding antara dua laboratorium menunjukkan bahwa dengan menggunakan bahan dan metode yang sama, dilaksanakan pada waktu bersamaan pada dua laboratorium berbeda diperoleh hasil yang sama. Hasil amplifikasi PCR sampel ada 3 sampel yang mempunyai pita DNA sejajar ukuran 1160 bp yaitu kontrol positif dan sampel nomer 7, 8, dan 10 menunjukkan adanya infeksi patogen bakteri *Liberibacter asiaticus* penyebab penyakit CVPD. Sampel yang tidak ada pita DNA nya pada ukuran 1160 bp ada 7 sampel berarti sampel negatif CVPD dan tidak terinfeksi patogen bakteri *Liberibacter asiaticus*.

Pelaksanaan uji banding antara dua laboratorium berbeda menggunakan bahan dan metode yang sama telah menunjukkan hasil yang tidak berbeda diantara keduanya. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode pengujian terjadinya infeksi patogen bakteri *Liberibacter asiaticus* penyebab penyakit CVPD yang digunakan sudah valid.

1.2. Analisa CTV dengan metode DAS Elisa.

Uji banding dilaksanakan pada tanggal 12-13 November 2014, antara dua laboratorium, yaitu Laboratorium Pengujian Balitjestro, Laboratorium Balithi. Jumlah contoh yang dianalisa sebanyak 10 contoh, dengan contoh yang di gunakan adalah daun

jeruk. Analisa dilakukan dengan menggunakan metode *Enzyme- Lynked Immunosorben Assay* (Elisa). Hasil pengujian antar dua laboratorium dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 7. Hasil pengujian CTV antar dua laboratorium

No sampel	Hasil pengujian			
	Balitjestro		Balithi	
	Absorbansi	Hasil	Absorbansi	Hasil
NC	0.004	-	0.000	-
PC	0.120	+	0.800	+
1	0.119	+	1.863	+
2	0.091	+	0.132	+
3	0.104	+	0.456	+
4	0.093	+	0.174	+
5	0.005	-	0.004	-
6	0.006	-	0.000	-
7	0.001	-	0.000	-
8	0.001	-	0.000	-
9	0.004	-	0.000	-
10	0.001	-	0.000	-

Keterangan : NC : negatif kontrol ; PC : positif kontrol

(+) = Reaksi positif (kuning), Hasil uji positif berdasarkan uji ELISA dikatakan + apabila sampel > 2 NC berarti tanaman terinfeksi CTV

(-) = Reaksi negatif (bening), Hasil uji negatif berdasarkan uji ELISA dikatakan - apabila sampel ≤ NC berarti tanaman sehat, tidak ada infeksi CTV

Pembacaan nilai absorbansi sampel pada 405 nm pada 10 sampel yang diuji menunjukkan nilai absorben yang bervariasi, sampel no 1 di laboratorium Balitjestro nilai absorbannya 0.119 sedangkan di laboratorium Balithi nilai absorbannya 0.186. Variasi nilai ini menunjukkan perbedaan konsentrasi antigen (virus tristeza) yang terdeteksi pada masing-masing sampel maka makin tinggi nilai absorben sampel semakin tinggi konsentrasi antigen (Dwi Wahyuni Ardiana,2008).

Hasil uji banding antara kedua laboratorium menunjukkan bahwa menggunakan bahan dan metode yang sama, dilaksanakan pada waktu bersamaan pada dua laboratorium berbeda diperoleh hasil yang sama yaitu kontrol positif dan sampel nomer 1,2,3, dan 4 menunjukkan terjadinya infeksi patogen *Citrus Tristeza Virus* (CTV) penyebab penyakit Tristeza. Pelaksanaan uji banding antara dua laboratorium berbeda menggunakan bahan dan metode yang sama telah menunjukkan hasil yang tidak berbeda diantara dua laboratorium tersebut. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode pengujian terjadinya infeksi patogen *Citrus Tristeza Virus* (CTV) penyebab penyakit Tristeza. yang digunakan sudah valid.

Dari tiga tahapan yang dilakukan yang pertama tahap verifikasi tanaman positif dan negatif kontrol menunjukkan hasil yang sesuai yaitu tanaman yang digunakan sebagai positif kontrol indeksing CTV dan CVPD menunjukkan hasil yang pengujian positif . Untuk tahap kedua yaitu uji banding antar analis juga menunjukkan hasil bahwa dari 10 sampel yang diuji hasilnya sama dari kedua analis. Dan tahap uji banding antar laboratorium merupakan salah satu hasil akurasi menunjukkan hasil dari kedua

laboratorium yang melaksanakan pengujian dengan metode yang sama menunjukkan hasil yang sama untuk sampel yang positif dan yang negatif. Dari tahapan tersebut berarti metode yang digunakan untuk pengujian indeksing CTV dan CVPD yang ada di laboratorium Balitjestro mempunyai hasil yang akurat dan valid serta mempunyai tingkat kepercayaan yang tinggi sehingga bisa meningkatkan jaminan mutu hasil pengujian baik CTV maupun CVPD.

PENUTUP

Kesimpulan

1. Untuk membuktikan bahwa laboratorium pengujian telah menerapkan ISO/IEC 17025/2005 maka laboratorium harus tetap menjaga keabsahan suatu hasil pengujian. Ada beberapa cara yang harus dilaksanakan antara lain verifikasi tanaman kontrol negatif dan positif, uji banding antar analis dan uji banding antar laboratorium yang rutin dilaksanakan setiap tahun. Dari hasil beberapa pengujian yang telah dilaksanakan menunjukkan hasil untuk verifikasi tanaman kontrol negatif dan positif, tanaman layak digunakan sebagai kontrol dalam pengujian.
2. Untuk uji banding antar analis dan antar laboratorium menggunakan metode dan sampel yang sama untuk pengujian CTV dan CVPD menunjukkan hasil yang sama tingkat akurasi.
3. Metode yang digunakan untuk pengujian CTV dan CVPD di laboratorium Balitjestro valid dan layak digunakan serta mempunyai tingkat kepercayaan yang tinggi untuk meningkatkan jaminan mutu hasil pengujian.

Saran

Validasi Metode Laboratorium pengujian sesuai ISO/IEC 17025 harus dilakukan setiap tahun untuk menjaga kepercayaan pelanggan agar mendapatkan hasil uji yang valid dan mempunyai tingkat kepercayaan yang tinggi sehingga bisa meningkatkan jaminan mutu hasil pengujian CTV dan CVPD.

DAFTAR PUSTAKA

- Balitjestro, 2014. Instruksi Kerja Metode. Laboratorium Pengujian ISO/IEC 17025 Nomer Akreditasi 509 IDN. 15 hal.
- Dwiasuti ME, Triwiratno, A, Endarto O, Wuryantini S, Yunimar. 2011. Panduan Teknis Pengenalan dan Pengendalian Hama dan Penyakit Tanaman Jeruk. Cetakan ke-3 96 hal. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Kementrian Pertanian.
- Dwi Wahyuni Ardiana. 2008. Teknik Deteksi *Citrus Tristeza Virus* Strain Indonesia Pada Kultivar Jeruk Dengan Metode *Das-Compound Direct Elisa*. Buletin Teknik Pertanian Vol. 13 No. 2
- Einstivina Nuryandani, Sumarno. 2012. Deteksi Penyakit Sistemik *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) Menggunakan Teknik Pcr Pada Calon Indukan Jeruk Keprok Tawangmangu (*Citrus Reticulata* Blanco Ssp Tawangmangu). 21 hal. Universitas Terbuka.
- Handoyo, D. & Rudiretna, A. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. *Universitas Surabaya*. 9: 17-29.

- Mifa Nurfadilah. 2015. Praktikum Elisa. mifa-s.blogspot.co.id. diakses tanggal 2 Maret 2016.
- Riyanto.2014.Validasi&Verifikasi Metode Uji Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi Edisi 1 Cetak 1,Yogyakarta: Deepublish, Juni 2014, 139 hlm, ISBN 978.
- Robert J.Tibetts. 2015. Verification And Validation of Test Used In The Clinical Microbiology Laboratory. Clinical Microbiology Newsletter, Volume 37, Issue 19, 1 October 2015, Pages 153-160
- SNI ISO/IEC 17025:2005. Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi. 2005.
- Supriyanto. C, Samin, 2007, Unjuk Kerja Metode Flame Atomic Sorption Spectrometry (F-AAS) Pasca Akreditasi, Prosiding PPI - PDiptn Pustek Akselerator dan Proses Bahan - BATAN Yogyakarta, 10 Juli 2007, ISSN 0216 – 3128 .
- Zubaidah, S. 2006. Pelatihan dan Workshop Identifikasi DNA dengan Aplikasi PCR. Balai Penelitian Tanaman Jerk dan Buah Subtropika. Balitbangtan.