

## **Penghitungan bakteria baja-bio dengan teknik *colony immunoblotting* (CIB)**

[Counting of biofertiliser bacteria with colony immunoblotting technique (CIB)]

Ganisan Krishnen

### **Pengenalan**

Kawalan kualiti dalam penghasilan dan penstoran sehingga digunakan di lapangan adalah satu prasyarat yang menentukan kejayaan aplikasi baja-bio. Namun, kawalan kualiti bagi sebahagian produk baja-bio tempatan dan import dilihat gagal dilaksanakan dalam rangkaian penghasilan produk sehingga aplikasi di lapangan. Ini disebabkan kurangnya kesedaran tentang keperluan jaminan kualiti minimum yang diperlukan bagi memastikan baja-bio yang dihasilkan adalah berkesan bagi kegunaan pengusaha dan petani. Di negara seperti Australia, New Zealand dan Afrika Selatan, syarikat penghasil baja-bio mengamalkan kawalan kualiti yang tegas walaupun tiada undang-undang yang mewajibkannya. Pengamalan kawalan kualiti ini adalah penting untuk memberi jaminan kepada pengguna bahawa produk baja-bio yang dihasilkan adalah berkualiti tinggi.

Beberapa parameter digunakan sebagai asas kawalan kualiti terutamanya penghitungan bakteria hidup (*viable count*) di dalam baja-bio. Parameter ini penting untuk menentukan kadar aplikasi di ladang dan penentuan jangka hayat baja-bio. Setiap produk baja-bio perlu mengandungi bilangan minimum bakteria hidup yang tertentu. Jika penurunan bilangan bakteria berlaku, maka jangka hayat produk berkenaan dianggap telah luput. Justeru, teknik penghitungan bakteria hidup yang efisien adalah sesuatu yang perlu dilaksanakan bagi memastikan kejayaan dalam kawalan kualiti.

Terdapat pelbagai teknik penghitungan yang digunakan untuk menghitung strain baja-bio, tetapi setiap teknik mempunyai kelebihan dan kekurangannya tersendiri. Walaupun banyak teknik yang ada boleh menghitung bakteria hidup, tetapi tidak kesemua teknik ini dapat membezakan bakteria sasaran dengan spesies lain dalam produk multi-strain, strain pencemar (yang mengganggu kualiti dan prestasi baja-bio) atau bakteria tanah. Satu teknik yang dapat memenuhi kedua-dua keperluan yang disebutkan di atas adalah teknik *colony immunoblotting* (CIB). Teknik CIB adalah gabungan antara teknik pencairan piring dengan medium pertumbuhan dan *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA) yang berpotensi untuk mengesan dan menghitung bakteria bermanfaat dalam kedua-dua produk baja-bio dan tanah.

Teknik CIB ini dapat menghitung dan membezakan bakteria sasaran dengan spesies bakteria lain sama ada dalam produk baja-bio atau di dalam tanah. Teknik ini juga boleh digunakan untuk menentukan ketulenan produk baja-bio (tanpa pencemaran)

jika terdapat antibodi yang spesifik terhadap strain baja-bio dalam sesuatu produk atau formulasi. Penghitungan baja-bio menggunakan teknik CIB mampu mengesahkan kualiti produk semasa penghasilan dan penstoran, justeru mampu memberi keyakinan kepada pengguna terhadap produk yang dipasarkan. Teknik CIB menggunakan membran nilon adalah satu teknik piawai yang digunakan oleh pihak berkuasa Kanada dalam penentuan kualiti baja-bio.

### **Bahan, reagen dan peralatan bagi asai CIB**

Penghitungan strain baja-bio boleh dilaksanakan dengan menggunakan gabungan teknik pemiringan bersiri sampel baja-bio atau tanah, penghasilan replika koloni daripada piring medium ke atas membran nilon dan diikuti dengan asai CIB. Proses keseluruhan teknik penghitungan ini adalah seperti dalam *Gambar rajah 1*.

Bahan, penimbal dan reagen yang diperlukan untuk CIB adalah seperti yang berikut:

- i. Membran nilon 82 mm (Roche)
- ii. 10 mM salina penimbal-fosfat (*phosphate-buffered saline* (PBS), pH 7.4)
- iii. Larutan basuhan (*washing solution*) – 0.2% Tween 20 dalam PBS
- iv. Larutan sekatan (*blocking solution*) – 5% susu skim (*skim milk*) dalam larutan basuhan
- v. Antibodi primer spesifik terhadap bakteria baja-bio
- vi. Konjugat antibodi sekunder yang mengandungi enzim *Horse Radish Peroxidase* (HRP)
- vii. Gabungan larutan substrat A – kromogen

Di mana:

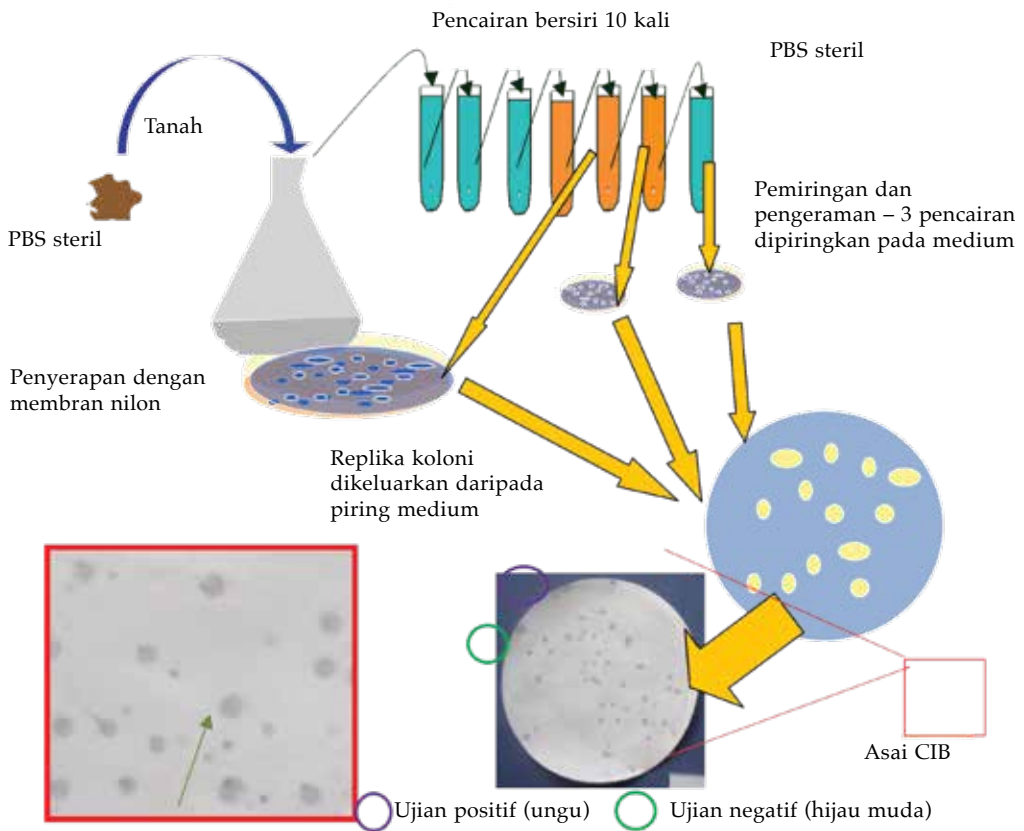
- Substrat A mengandungi: 0.25%  $\beta$ -cyclodextrin dan urea hidrogen peroksida (43 mg dalam 100 mL) di dalam penimbal sodium asetat, pH 5.0
- Larutan kromogen mengandungi: 0.01% 3,3',5,5' tetrametilbenzidin (TMB) dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO)

viii. 1 M asid sulfurik ( $H_2SO_4$ )

ix. Alat goncangan (*shaker*)

### **Pengenalpastian dan penghitungan strain baja-bio (produk cecair atau pepejal) dan tanah**

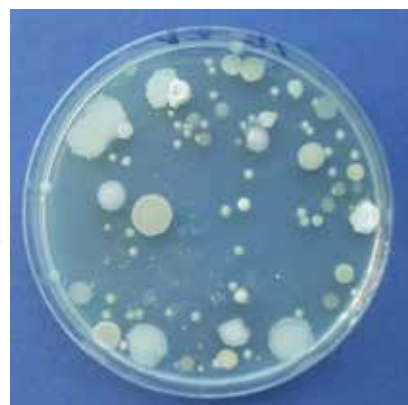
Sampel baja-bio sama ada cecair atau pepejal dicairkan secara pencairan bersiri sebanyak 10 kali dalam larutan PBS. Bagi sampel baja-bio cecair, 10 mL cecair baja-bio dicairkan dalam 90 mL PBS steril dan seterusnya dilakukan pencairan bersiri (10 kali). Manakala, bagi sampel baja-bio pepejal, 10 g produk baja-bio dicairkan dalam 100 mL PBS steril dan disusuli dengan pencairan bersiri (10 kali) sepertimana produk baja-bio cecair. Teknik yang sama seperti baja-bio pepejal diterima pakai untuk sampel tanah.



Gambar rajah 1. Skema asai CIB menggunakan membran nilon

### ***Pemiringan baja-bio yang dicairkan***

Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  sampel baja-bio yang dicairkan disebarkan di atas medium agar nutrien dan dieramkan di dalam inkubator pada 28 – 30  $^{\circ}\text{C}$ . Piring-piring berkenaan dieramkan selama 24 – 48 jam bergantung kepada masa yang diperlukan untuk menghasilkan koloni bersaiz sekurang-kurangnya 0.5 mm (Gambar 1). Bilangan koloni di dalam piring dikira dan direkodkan. Gambar bagi setiap piring medium yang ditumbuhi koloni bakteria diambil untuk tujuan perbandingan selepas asai CIB selesai.



Gambar 1. Pelbagai jenis bakteria termasuk strain baja-bio tumbuh dalam piring agar medium selepas 48 jam penderaman

***Penghasilan replika koloni daripada piring medium yang ditumbuhi bakteria baja-bio melalui proses penekapan (blotting)***

Piring medium yang telah dikira bilangan koloni dan diambil gambar, dilapik dengan sehelai membran nilon (diameter = 82 mm) di atas permukaan medium yang ada pertumbuhan koloni dan ditekap dengan satu pemberat silinder (diameter = 82 mm) selama lima minit. Sekiranya tiada pemberat silinder, membran berkenaan boleh ditekan dengan menggunakan forsep dari bahagian atas dan dibiarkan selama lima minit untuk membolehkan kesemua koloni bakteria daripada piring medium dipindahkan kepada permukaan membran nilon dan menghasilkan replika. Selepas itu, membran berkenaan dipindahkan daripada piring medium ke piring kaca menggunakan forsep dengan membiarkan bahagian yang ditekap (replika) menghala ke atas dan dikeringkan pada suhu 80 °C selama 30 minit. Seterusnya replika ini boleh digunakan untuk asai CIB atau disimpan di dalam satu bekas kedap udara atau beg *sealable* supaya dapat digunakan apabila perlu.

***Asai CIB***

Replika nilon diletakkan di dalam satu piring petri plastik, diisikan dengan 5 mL larutan sekatan dan digoncang pada 85 rpm selama satu jam. Selepas itu, larutan sekatan disingkirkan dan diisi semula dengan 4 mL larutan sekatan yang mengandungi antibodi primer yang spesifik terhadap bakteria sasaran dan digoncang semula selama 1 jam. Kepekatan antibodi primer yang digunakan ialah 1 µL antibodi primer yang dilarutkan di dalam 4 mL larutan sekatan (pencairan 1:4000). Kepekatan antibodi primer yang digunakan bergantung kepada kepekatan antibodi immunoglobulin G (IgG) yang terdapat pada serum darah yang diaruhkan dengan antigen bakteria baja-bio yang disasarkan. Selepas satu jam, larutan sekatan yang mengandungi antibodi disingkirkan dan membran dibasuh dengan larutan sekatan (tanpa antibodi) sebanyak tiga kali dengan goncangan 85 rpm selama lima minit setiap kali, sebanyak tiga kali untuk penyingkiran keseluruhan antibodi primer.

Seterusnya, 4 mL larutan sekatan yang mengandungi 3 µL konjugat antibodi sekunder (konjugat antibodi dan enzim *horse radish peroxidase*) yang spesifik terhadap antibodi primer dimasukkan dan digoncang pada 85 rpm. Konjugat antibodi sekunder yang mengandungi enzim *horse radish peroxidase* ini akan mengikat pada antibodi primer. Selepas satu jam, larutan sekatan yang mengandungi konjugat antibodi sekunder disingkirkan dan membran dibasuh dengan larutan sekatan (tanpa antibodi) sebanyak tiga kali dengan goncangan 85 rpm selama lima minit setiap kali, untuk penyingkiran saki-baki konjugat antibodi sekunder.

Langkah di atas disusuli dengan pembasuhan replika nilon dengan larutan basuhan sebanyak dua kali (85 rpm untuk lima menit). Selepas itu, 3 mL larutan campuran substrat A-kromogen (2.85 mL substrat A dicampur dengan 0.15 mL kromogen TMB) dimasukkan ke dalam piring plastik yang mengandungi replika nilon dan disimpan di dalam keadaan statik selama lima minit. Campuran larutan yang terbentuk bertukar ke warna hijau dan replika koloni berwarna hijau mula kelihatan (*Gambar 2*). Selepas lima minit, aktiviti enzim *horse radish peroxidase* dan substrat dihentikan dengan memasukkan 0.5 mL asid sulfurik (1M) dan digoncang perlahan-lahan sehingga larutan hijau bertukar kuning. Seterusnya, replika nilon dibilas dengan air suling sebanyak tiga kali dan dikeringkan di atas kertas tisu pada suhu bilik. Ujian positif bagi bakteria baja-bio yang disasarkan (yang spesifik terhadap antibodi primer) adalah diperhatikan dengan kehadiran replika koloni yang berwarna ungu. Sebaliknya, untuk ujian negatif (bukan bakteria baja-bio yang disasarkan), replika koloni hijau muda akan dihasilkan. Kadang-kadang, bagi ujian negatif tiada apa-apa replika koloni dapat diperhatikan.

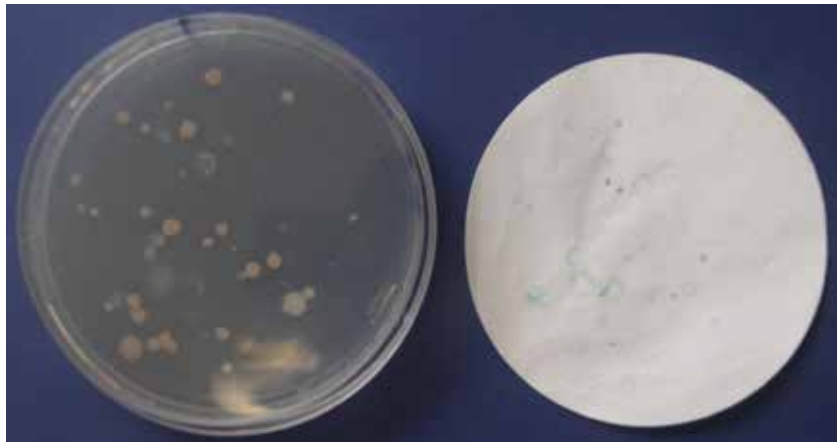


*Gambar 2. Campuran substrat A-kromogen dan replika koloni yang bertukar warna ke hijau akibat tindak balas enzim dan substrat*

### ***Pengiraan bakteria baja-bio daripada sampel baja bio dan tanah***

Bakteria baja-bio yang disasarkan boleh dihitung dengan mengira bilangan replika koloni yang positif (ungu) di atas membran nilon CIB. Contohnya, terdapat sebanyak 49 koloni pada piring medium yang disebar dengan 0.1 mL sampel tanah yang dicairkan sebanyak  $10^5$  (*Gambar 3*). Manakala, bagi membran nilon CIB pula, sebanyak dua replika koloni baja-bio (yang disasarkan - warna ungu) diperhatikan. Justeru, pengiraan populasi bakteria tanah dan baja-bio adalah seperti yang berikut:

Bilangan populasi bakteria	= (Bilangan koloni/0.1 mL) x faktor pencairan x (isi padu keseluruhan 10 g sampel tanah yang dicairkan)
Bilangan populasi bakteria dalam tanah	= $(49/0.1) \times 10^5 \times 100$ = $4.9 \times 10^9$ cfu dalam 10 g sampel tanah = $4.9 \times 10^8$ cfu/g sampel tanah
Bilangan populasi bakteria dalam baja-bio	= $(2/0.1) \times 10^5 \times 100$ = $2 \times 10^8$ cfu dalam 10 g sampel tanah $2 \times 10^7$ cfu/g sampel tanah



*Gambar 3. Piring medium yang ditumbuhi campuran koloni bakteri tanah dan baja-bio (kiri) dan membran nilon CIB (kanan) yang menunjukkan ujian positif untuk bakteri baja-bio (replika koloni ungu) dan bakteri tanah (replika koloni hijau)*

### ***Peranan komposisi bakteri tanah dan strain baja-bio pada tanah yang diinokulasi baja-bio***

Selalunya, komposisi berlainan bakteria baja-bio pada sesuatu produk baja-bio multi-strain tidak mempengaruhi keefisienan pengenalpastian dan penghitungan strain baja-bio. Keefisienan pengenalpastian dan penghitungan sangat dipengaruhi oleh kespesifikan antibodi terhadap bakteria baja-bio yang disasarkan. Tindak balas silang sesuatu antibodi terhadap bakteria baja-bio, khususnya spesies atau strain yang sangat rapat akan memberi ujian positif palsu dan mempengaruhi keputusan penghitungan. Justeru, penggunaan antibodi yang spesifik terhadap sesuatu spesies atau strain bakteria baja-bio adalah satu kemestian agar pengenalpastian dan penghitungan dapat dilaksanakan dengan jayanya.

Walau bagaimanapun, situasinya sangat berbeza jika ingin menghitung bakteria baja-bio di dalam tanah yang menggunakan baja-bio sebagai input. Selain daripada antibodi yang spesifik, selalunya nisbah bakteria baja-bio: bakteria tanah turut mempengaruhi keefisienan pengesanan dan penghitungan strain baja-bio. Selalunya, nisbah 1:100 bagi bakteria baja-bio: bakteria tanah adalah nisbah terendah untuk pengenalpastian dan penghitungan bakteria baja-bio sasaran di dalam tanah. Walau bagaimanapun, keefisienan pengesanan dan penghitungan ini meningkat apabila bahagian bakteria baja-bio meningkat, iaitu nisbah 1:10 dan 1:1.

## Kelebihan dan kekurangan teknik CIB

Teknik CIB mempunyai kelebihan dan kekurangannya tersendiri (Jadual 1). Walaupun terdapat beberapa kekurangan, teknik ini adalah satu teknik yang sangat jitu dan boleh diharapkan dari segi penghitungan bakteria baja-bio di dalam produk baja-bio dan tanah. Penggunaan peralatan yang biasa terdapat di makmal adalah satu kelebihan untuk menggunakan teknik ini. Teknik ini terbukti berkesan untuk memantau kemandirian dan dinamik populasi bakteria baja-bio yang digunakan pada tanaman padi bagi satu pusingan penanaman di lapangan terbuka.

Jadual 1. Kelebihan dan kekurangan teknik CIB

Kelebihan teknik CIB	Kekurangan teknik CIB
1. Pengkhususan ( <i>specificity</i> ) yang tinggi Pengesanan spesifik terhadap bakteria baja-bio, sekurang-kurangnya ke tahap genus. Ia juga boleh capai ke tahap strain sekiranya menggunakan antibodi monoklonal dengan strain spesifik.	1. Kesukaran perolehan antibodi yang spesifik Adalah sukar untuk mendapat antibodi yang spesifik bagi bakteria baja-bio yang digunakan. Justeru, antibodi perlu dihasilkan sendiri. Ada juga makmal yang boleh menghasilkan dan menjual antibodi yang spesifik terhadap bakteria baja-bio sasaran mengikut kehendak pelanggan.
2. Penghitungan hidup Menghitung hanya bakteria baja-bio hidup sahaja. Hitungan hidup adalah lebih tepat berbanding dengan menggunakan hitungan menyeluruh ( <i>total count</i> ).	2. Membran yang mahal Membran komersial seperti membran nilon, nitroselulosa dan poliviniliden fluorida adalah mahal sehingga membataskan penggunaan asai CIB untuk penghitungan bakteria baja-bio. Berdasarkan pengalaman penulis, kos membran nilon untuk asai CIB ialah 87% daripada kos keseluruhan asai.
3. Tahap penghitungan Sekurang-kurangnya $10^1$ cfu bagi produk baja-bio cecair dan $10^3$ cfu bagi produk baja-bio pepejal dan tanah.	3. Tahap kerumitan Teknik ini memerlukan juruteknik yang berkemahiran.
4. Keperluan peralatan Peralatan yang diperlukan untuk asai ini adalah penggoncang ( <i>shaker</i> ) sahaja. Alat ini biasanya terdapat di kebanyakan makmal.	

## Kesimpulan

Teknik asai CIB ini adalah gabungan antara pemiringan pencairan dan asai ELISA. Teknik ini telah dicuba untuk menghitung bakteria baja-bio daripada produk baja-bio dan tanah. Teknik ini mampu menghitung bakteria baja-bio daripada produk baja-bio dan tanah masing-masing pada tahap  $10^1$  cfu dan  $10^3$  cfu. Teknik ini adalah satu teknik yang mampu membezakan bakteria baja-bio sasaran daripada bakteria lain sama ada dalam produk baja-bio multi-strain atau tanah. Nisbah bakteria baja-bio: bakteria tanah terendah untuk pengenalpastian dan penghitungan strain baja-bio sasaran ialah 1:100. Walau bagaimanapun, keberkesanan pengesanan dan penghitungan ini meningkat apabila bahagian bakteria baja-bio meningkat, iaitu pada nisbah 1:10 dan 1:1. Justeru, teknik CIB adalah satu teknik yang sangat diperlukan di Malaysia untuk kawalan kualiti produk dan pemantauan kualiti oleh pihak berkuasa akreditasi dan kawalan baja-bio di negara ini.

## Bibliografi

- Crowther, J.R. (2009). *The ELISA Guidebook* (2nd ed). New York: Humana Press. m.s. 566
- Deaker, R., Kecskes, M.L., Rose, M.T., Amprayn, K., Krishnen, G., Tran, T.K.C., Vu, T.N., Phan, T.C., Ngyuen, T.H. dan Kennedy, I.R. (2011). *Practical methods for the quality control of Inoculant biofertilisers*. ACIAR Monograph No. 147. m.s. 101
- Deaker, R., Mijajlovic, G., Casteriano, A., Rose, M.T., Krishnen, G., Kecskés, M.L. dan Kennedy, I.R. (2008). Quality control of biofertilisers: Enumeration of individual species in multi-strain biofertilisers and application to plants. Dalam: *Proceedings of The 12<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology*, 17 – 22 August 2008, Cairns, Australia
- Duez, H., Pelletier, C., Cools, S, Aissi, E., Cayuela, C., Gavini, F., Bouquelet, S., Neut, C. dan Mengaud, J. (2000). A colony immunoblotting method for quantitative detection of a *Bifidobacterium animalis* probiotic strain in human faeces. *Journal of Applied Microbiology* 88: 1,019 – 1,027
- Kecskes, M.L., Rose, M.T., Michel, E., Lauby, B., Rakotondrainibe, M., Casteriano, A., Palagyi, A., Moutouvirin, A., Elter, S., Guillas, R., Krishnen, G. dan Kennedy, I.R. (2009). Rapid immuno-monitoring of inoculant plant growth-promoting microorganisms. *Engineering in Life Sciences* 9: 1 – 6
- Krishnen, G. (2012). Molecular Interactions Between Plant Growth Promoting Organisms and rice, PhD thesis, University of Sydney, m.s. 249
- Krishnen, G., Kecskés, M.L., Rose, M.T., Small, P.G., Amprayn, K., Pereg, L. dan Kennedy, I. (2011). Colony immunoblotting based field monitoring of plant growth promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 57: 914 – 922
- Krishnen, G., Kecskés, M.L., Rose, M.T., Flament, J., Amprayn, K., Pereg-Gerk, L. dan Kennedy, I.R. (2008). Economical membrane based colony immunoblotting validated by real time PCR for tracing plant growth promoting rhizobacteria. In *Proceedings of 11<sup>th</sup> International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes*, 30 September – 1 November 2008, Ghent, Belgium



### **Ringkasan**

Penghitungan populasi hidup bakteria baja-bio sama ada di dalam formulasi produk baja-bio atau tanah yang digunakan dengan produk ini sangat penting untuk kawalan kualiti dan penentuan keberkesanan baja-bio. Pengenalpastian dan penghitungan bakteria baja-bio adalah satu proses yang mencabar khususnya apabila melibatkan produk baja-bio multi-strain dan populasinya di dalam tanah. Justeru, satu teknik yang boleh mengenal pasti sesuatu strain bakteria dan juga memudahkan penghitungan sangat diperlukan. Teknik *colony immunoblotting* (CIB) adalah satu teknik penghitungan hidup yang menggabungkan kedua-dua ciri pengenalpastian dan penghitungan bakteria baja-bio. Teknik ini melibatkan pemiringan sebaran, penghasilan replika koloni dengan membran nilon dan asai CIB. Teknik ini diguna pakai untuk pengenalpastian dan penghitungan bakteria baja-bio daripada produk baja-bio cecair dan pepejal serta daripada tanah pertanian yang telah diinokulasi dengan input pertanian ini.

### **Summary**

Viable counting of bacterial population in the biofertiliser formulations and soil applied with this product is crucial for quality assurance and efficacy determination. Detection and counting of the biofertiliser bacteria in the multi-strain biofertiliser product and soils is very challenging. Therefore, a technique that can identify the targeted bacterial strain which will assist the counting is needed. The colony immunoblotting (CIB) is a technique that encompasses both the features mentioned above. This technique involved spread plate plating, colony replica production and CIB assay. This technique has been used for detection and counting of biofertiliser bacteria from both liquid and solid biofertiliser products and agricultural soils that were inoculated with this agricultural input.

### **Pengarang**

Ganisan Krishnen (Dr.)  
Pusat Penyelidikan Sains Tanah, Air dan Baja, Ibu Pejabat MARDI  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor  
E-mel: ganisan@mardi.gov.my