

Kaedah pengesanan pantas dan mudah untuk penyakit darah pisang (BDB)

[A new rapid molecular diagnostic method for the detection of banana blood disease (BDB)]

Lau Han Yih, Mohamad Noor Hadi Nordin, Norliza Abu Bakar, Mohammad Malek Faizal Azizi, Sohana Romeli, Muhammad Fairuz Mohd Yusof, Rafidah Badrun dan Nur Sulastri Jaffar

Pengenalan

Pisang (*Musa* spp.) merupakan tanaman buah penting yang menyediakan sumber makanan utama bagi jutaan penduduk di negara membangun. Asia merupakan pengeluar pisang terbesar di dunia dengan hasil pengeluaran tahunan sebanyak 64,730.74 juta tan metrik diikuti oleh Afrika, Amerika Selatan, Amerika Tengah, Karibia, Oceania, Eropah dan Amerika Utara pada tahun 2020. Pengeluaran pisang telah menjadi sumber pendapatan bagi petani-petani kecil dan menjadi komoditi global yang penting. Walaupun pisang merupakan salah satu buah utama di Afrika, Asia dan Amerika Latin, tetapi hanya 13% daripada jumlah hasil pisang dieksport ke pasaran antarabangsa yang menunjukkan kepentingan buah ini untuk pasaran tempatan.

Walaupun bagaimanapun, penyakit layu bakteria pisang yang dianggap sebagai halangan utama terhadap pengeluaran pisang telah menyebabkan penurunan hasil dan produktiviti komoditi ini. Pada awal abad ke-20, penyakit darah pisang (BDB) yang disebabkan oleh *Ralstonia syzygii* subspesies *celebesensis* pertama kali dijumpai di Pulau Salayar, Sulawesi, Indonesia. Penyakit ini telah merebak ke industri buah pisang tempatan, bermula di Sulawesi Selatan yang sebelumnya dikenali sebagai Celebes pada tahun 1920 dan seterusnya ke seluruh pulau sehingga ke Jawa pada akhir tahun 1980-an. Di Malaysia, BDB ditemui di negeri Perak dan di kawasan Selangor, *Ralstonia syzygii* subspesies *celebesensis* biasanya terdapat dalam tanah dan boleh disebarkan secara tidak langsung oleh serangga-serangga daripada bunga pisang yang sudah dijangkiti kepada bunga pisang yang sihat. Transmisi tempatan BDB kemungkinan berlaku melalui peralatan yang tercemar, bahan tanaman yang terinfeksi (anak pokok dan buah), tanah yang terkontaminasi, air, kelawar dan burung. Transmisi jarak jauh bagi penyakit ini juga disebabkan oleh aktiviti manusia. Patogen BDB iaitu *R. syzygii*, berkait rapat dengan *Ralstonia solanacearum* dan termasuk dalam filotip IV dalam kumpulan *R. solanacearum* yang paling mirip dengan strain *R. solanacearum* dari Indonesia.

BDB menunjukkan simptom yang mirip seperti penyakit pisang Moko yang disebabkan oleh *R. solanacearum* yang berasal dari Amerika Tengah (filotip IIA-6, IIB-3 dan IIB-4 sebelum ini dikenali sebagai Race 2). Namun, berbeza dengan *R. solanacearum* yang menyebabkan penyakit Moko/Bugtok, BDB tidak bersifat

patogenik terhadap *Heliconia* spp. atau hos Solanaceae. Seiring dengan perkembangan penyakit, simptom-simptom termasuk tanaman layu, kuning dan nekrosis pada daun, warna merah atau coklat di tengah-tengah batang dan tangkai bunga serta kerosakan buah yang bertukar warna coklat kemerahan.

Para saintis telah membangunkan pelbagai kaedah diagnostik molekul yang berasaskan DNA kerana kebolehpercayaan, ketepatan dan lebih sensitif dalam pengesanan patogen tumbuhan. Pada masa kini, tindak balas rantaian polimerase [*polymerase chain reaction* (PCR)] merupakan teknik molekul yang paling popular dan boleh dipercayai untuk pengesanan BDB. Namun, prosedur PCR mengambil masa yang lama dan agak sukar untuk melakukan ujian di luar makmal disebabkan oleh limitasi kajian yang menggunakan peralatan-peralatan berat yang diperlukan untuk mengawal suhu secara tepat. Oleh itu, teknik bersesuaian untuk dijalankan di kawasan lapangan iaitu amplifikasi isothermal berlingkar atau *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) merupakan alternatif kepada PCR yang menggunakan enzim pembaikan DNA sebagai gantian kepada pemanasan suhu yang tinggi terhadap DNA. Ini membolehkan amplifikasi DNA secara pantas pada suhu rendah (60 – 65 °C) dengan kepekaan yang setara dengan teknik PCR yang menjadikannya sesuai untuk aplikasi di lapangan. Blok pemanasan mudah alih yang digunakan untuk menjalankan ujian LAMP mengekalkan suhu yang diperlukan dan sangat sesuai untuk ujian di lapangan. Pengesanan tanpa peralatan selepas proses amplifikasi adalah diperlukan untuk mengesan hasil dengan mata kasar tanpa keperluan peranti atau alat khusus.

Teknik yang biasa digunakan untuk menganalisis hasil amplifikasi di makmal adalah elektroforesis gel agarosa dengan pewarna seperti ethidium bromida, diikuti oleh visualisasi di bawah cahaya ultralembayung. Namun, teknik ini tidak sesuai untuk pengesanan di lapangan. Oleh itu, teknik analisis hasil amplifikasi DNA yang sesuai digunakan di lapangan perlu dibangunkan.

Teknik penggumpalan merupakan fenomena yang telah lama dikenali dalam bidang kimia koloid dan digunakan dalam pelbagai proses pemisahan koloid, sebagai contoh untuk membersihkan udara yang tercemar. Pada tahun 1950-an, Ruehrwein dan Ward pertama kali menggambarkan fenomena ini. Penerangan lanjut diberikan pada tahun 1960-an oleh Healy dan La Mer yang menjelaskan bahawa fenomena ini berlaku akibat daripada penyerapan polimer yang mencukupi untuk menyambung beberapa partikel bersama dan seterusnya menyebabkan penggumpalan partikel dalam larutan. Dalam kajian ini, penggumpalan partikel karbon dimanfaatkan bersama dengan pembangunan kit diagnostik LAMP bagi tujuan pengesanan penyakit BDB di lapangan. Pendekatan ini digunakan bagi pengesanan kualitatif (Ya/Tidak) penyakit BDB secara pantas dan praktikal. Sampel DNA positif dalam ujian LAMP dan mempunyai

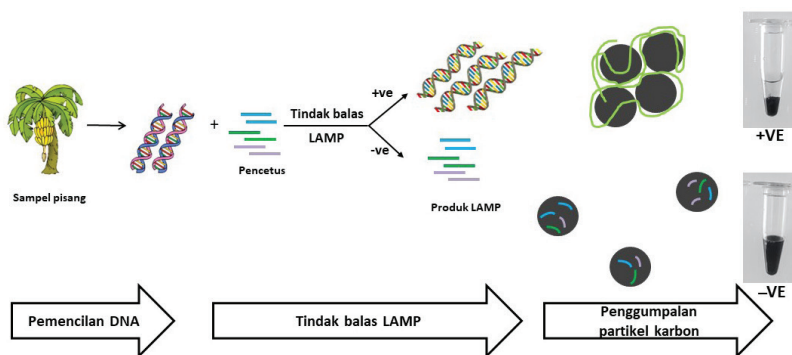
rantai DNA panjang dijangka akan menyebabkan penggumpalan partikel karbon di mana dapat diperhatikan melalui mata kasar (Gambar rajah 1). Gabungan ujian ini berpotensi memberikan sumbangan yang signifikan kepada industri tanaman pisang sebagai teknik pengesanan untuk diagnosis awal penyakit BDB.

Strain patogen dan cara pengkulturan

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (FocTR4) dan *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* (Rsc) (Nombor GenBank CP019911.1) diperolehi daripada Pusat Penyelidikan Hortikultur, Institut Penyelidikan dan Pembangunan Pertanian Malaysia (MARDI), manakala Strain *Ralstonia solanacearum* (Rs) PS107 diperolehi daripada Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran, MARDI. Kedua-dua isolasi bakteria dikultur semula pada medium agar garam tetrazolium klorida Kelman (Kelman's TZC) (Merck KGaA, Darmstadt, Jerman) dan dieramkan selama tiga hari pada suhu 28 °C. Kemudian, *Foc* dikultur semula di atas agar dekstrosa kentang (PDA) (Thermo Scientific™ Oxoid™, Basingstoke, England) dan dieramkan selama seminggu pada suhu bilik.

Satu atau dua koloni *Rsc/Rs* diinokulasi dalam 50 mL medium Luria-Bertani (LB) (Thermo Scientific™ Oxoid™, Basingstoke, England) dan kultur tersebut dibiarkan tumbuh dalam inkubator bergoncang pada suhu 28 °C dengan goncangan 200 rpm semalaman. Kultur semalaman tersebut diemparkan pada 6000 × g selama 5 minit dan kemudian supernatannya dibuang. Pelet disimpan untuk pengekstrakan DNA.

Sekeping agar kecil yang mengandungi hifa *Foc* diletakkan pada piring Petri PDA dan dieramkan selama tujuh hari pada suhu bilik sehingga piring penuh dengan hifa. Hifa *Foc* pada permukaan medium kemudian dikikis keluar dan disimpan dalam tiub pengempar 2 mL untuk pengekstrakan DNA. DNA yang diekstrak daripada *Foc* dan *Rs* digunakan dalam kajian kepekaan ujian LAMP. *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* (Rsc) (Nombor GenBank CP019911.1) digunakan sebagai kawalan positif untuk semua ujian dalam kajian ini.



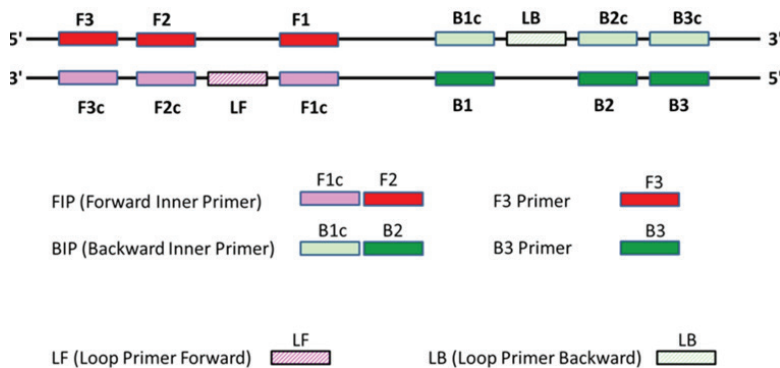
Gambar rajah 1. Skema ujian LAMP-penggumpalan partikel karbon

Pengekstrakan DNA

Kedua-dua jenis bakteria *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* (Rsc) (Nombor GenBank CP019911.1) dan *Ralstonia solanacearum* (Rs) strain PS107 telah dikultur dalam medium TZC selama 16 – 18 jam pada suhu 37 °C. Kaedah pengekstrakan DNA yang berasaskan partikel magnetik telah digunakan untuk mengekstrak DNA daripada semua strain bakteria. Bagi sampel daun pisang, sebanyak 300 mg sampel telah digunakan untuk pengekstrakan DNA daripada tisu tumbuhan dengan menambahkan 200 µL larutan lisis. Tisu tumbuhan kemudian dihancurkan dalam tiub 1.5 mL dengan penumbuk plastik. DNA kemudian diekstrak menggunakan protokol *Solid-phase reversable immobilization* (SPRI) terubah suai yang disediakan oleh pengeluar. Sebanyak 10 µL larutan yang jernih ditambahkan dengan 1.8 kali ganda partikel magnetik SPRI ke dalam penimbal pengikat (*binding buffer*) dan dibiarkan selama lima minit pada suhu bilik. Penarik magnet digunakan untuk memisahkan partikel magnetik-DNA daripada larutan dan dibasuh sekali dengan 100% isopropanol dan dua kali dengan 80% etanol sebelum DNA dielusikan dalam 10 µL air. Semua bahan kimia diperolehi dari Merck KGaA, Darmstadt, Jerman kecuali dinyatakan sebaliknya.

Reka bentuk Primer LAMP

Enam primer LAMP telah direka berdasarkan jujukan kromosom A2-HR *R. syzygii* subsp. *celebesensis* (Nombor GenBank CP019911.1) dari MARDI iaitu F3, B3, FIP, BIP, LF dan LB. Jujukan primer LAMP yang digunakan dalam kajian ini ditunjukkan seperti dalam *Gambar rajah 2* dari hujung 5'-seperti F3, F2, F1 dan B3, B2, B1. Primer dalaman ke hadapan (FIP) terdiri daripada F2 dan F1c (jujukan komplementari F1) dan primer dalaman ke belakang (BIP) adalah gabungan B3 dan B1c (jujukan komplementari B1) (*Gambar rajah 2*). Selain itu, primer loop ke hadapan (LF) direka berdasarkan jujukan komplementari antara F1 dan F2, manakala primer loop ke belakang (LB) direka berdasarkan jujukan komplementari antara B1 dan B2. Jujukan primer LAMP ditunjukkan seperti dalam *Jadual 1*.



Gambar rajah 2. Rajah skematik reka bentuk primer LAMP yang digunakan dalam kajian ini

Tindak balas LAMP

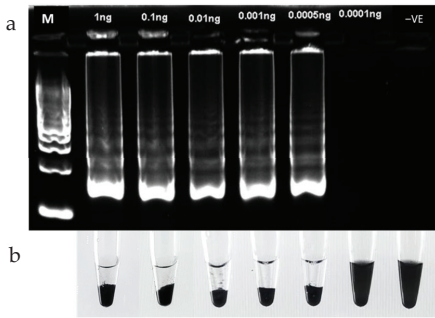
Primer LAMP disediakan dengan menggabungkan semua enam primer (*Jadual 1*) ke dalam larutan yang mengandungi 40 μ M FIP, 40 μ M BIP, 5 μ M F3, 5 μ M B3, 10 μ M LF dan 10 μ M LB. Asid nukleik yang diekstrak digunakan untuk menjalankan tindak balas LAMP yang mempunyai jumlah isi padu sebanyak 25 μ L (1X ThermoPol Buffer, 6 mM MgSO₄, 1.4 mM setiap dNTP, 8U *Bst* DNA polymerase, 3 μ L campuran primer) (New England BioLab, Ipswich, MA, USA) pada suhu 65 °C selama 40 minit (kepekatan gDNA bergantung pada reka bentuk eksperimen) dengan menggunakan inkubator blok terma. Kepekaan ujian LAMP dinilai menggunakan kepekatan gDNA BDB daripada 0.0001 – 10 ng. Ujian spesifisiti dilakukan menggunakan gDNA daripada *R. solanacearum* dan *Foc*. Selepas amplifikasi, pengesanan tindak balas LAMP dijalankan dengan menggunakan elektroforesis gel (1.5% gel agarosa) (Merck KGaA, Darmstadt, Jerman) yang mengandungi pewarna FloroSafe DNA (1st Base, Singapura) dalam 1X penimbal sodium borate (Merck KGaA, Darmstadt, Jerman). Gel kemudian diperiksa menggunakan sistem pengimejan gel (Alpha Innotech) untuk visualisasi amplifikasi DNA.

Analisis produk LAMP menggunakan teknik penggumpalan partikel karbon

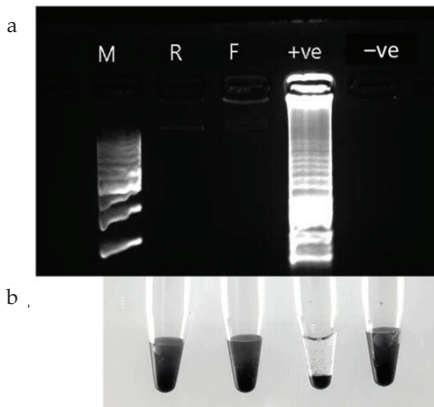
Larutan penggumpalan mengandungi karbon teraktif dengan saiz 100 – 400 *mesh* (Sigma, St. Louis, MO, USA) dan tanah diatom berbentuk serbuk. Karbon teraktif dan tanah diatom dicampur dalam 50 mL larutan [50 mM Tris (pH 8), 10 mM spermina dan 1% (w/v) PEG8000] dengan 400 mg karbon teraktif dan 600 mg tanah diatom. Sebanyak 20 μ L larutan penggumpalan kemudian ditambahkan ke sekurang-kurangnya 20 μ L tindak balas LAMP dan tiub tersebut digoncangkan perlahan untuk mencampurkan larutan tersebut. Sampel positif yang mengandungi DNA panjang dalam LAMP menunjukkan partikel tergumpal dan terperangkap di bahagian bawah tiub dalam masa 20 saat. Walau bagaimanapun, untuk sampel LAMP yang tiada amplifikasi iaitu sampel negatif dengan oligonukleotida pendek akan kekal dalam larutan hitam.

Jadual 1. Jujukan primer LAMP dan PCR yang digunakan dalam kajian ini

Primer	Jujukan Primer (5'-3')
F3	AACTGGAGTGCTTGAAGC
B3	CTCTGTGGCGATTGTCTAC
FIP	GGACCTGTCACTCGAACCATGCTGCGGACTCCACATTAC
BIP	GCTCGTCCGTCTCGTTGAGGGTTGCTTACCTTAGAGACTC
LF	GGCGTTACACCACATCCA
LB	GGTAATAGCCTCGCTCCG



Gambar 1. (a) Kajian sensitiviti dan asai penggumpalan partikel karbon (b). Tindak balas LAMP menggunakan 0.0001 – 10 ng DNA sasaran yang dipencilkan daripada BDB. Jumlah templat DNA adalah seperti berikut: jalur 1: penanda DNA 100 bp; jalur 2: 1 ng; jalur 3: 0.1 ng; jalur 4: 0.01 ng; jalur 5: 0.001; jalur 6: 0.0005 ng; jalur 7: 0.0001 ng; jalur 8: kawalan negatif. Setiap gambar mewakili tiga ulangan eksperimen



Gambar 2. Penilaian kajian spesifisiti LAMP untuk DNA genomik *Ralstonia solanacearum* dengan visualisasi pada gel agarosa (a) dan asai penggumpalan partikel karbon (b) R = *Ralstonia solanacearum*; F = *Fusarium oxysporum cubense*; +ve = kawalan positif (*R. solanacearum*); -ve = kawalan negatif (tanpa templat DNA); M = penanda DNA 100 bp. Gambar ini mewakili sekurang-kurangnya tiga ulangan eksperimen

Kajian sensitiviti

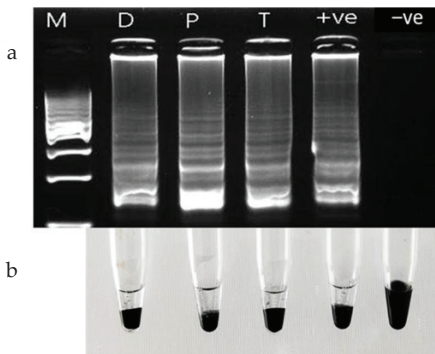
Kajian sensitiviti dijalankan dengan menggunakan 0.0001 – 10 ng DNA genomik BDB. Produk tindak balas LAMP kemudian digunakan dalam elektroforesis (gel agarosa 1%) untuk mengesahkan amplifikasi (Gambar 1). Berdasarkan keputusan, sensitiviti ujian LAMP ialah 0.0005 ng.

Kajian spesifisiti

Kajian spesifisiti LAMP telah dijalankan dengan menggunakan gDNA yang berbeza daripada *R. solanacearum* dan *Foc* (Gambar 2). Hasil menunjukkan bahawa amplifikasi boleh diperhatikan pada sampel BDB, tetapi tidak pada dua patogen lain. Oleh itu, ujian LAMP ini mempunyai spesifisiti tinggi terhadap BDB. Karbon aktif tergumpal dan terkumpul di bahagian bawah tiub dalam sampel positif (BDB), ini menunjukkan bahawa primer LAMP yang direka khas kepada BDB. Walau bagaimanapun, dalam sampel *R. solanacearum*, *Foc* dan kawalan negatif, larutan kekal hitam yang menunjukkan tindak balas adalah negatif.

Kajian sampel aruhan BDB

Tindak balas LAMP dan ujian penggumpalan karbon dilakukan pada sampel daun, urat daun dan tangkai lima hari selepas inokulasi. Produk LAMP daripada daun (D), urat daun (P), tangkai (T) dan kawalan positif (*R. solanacearum* subsp. *celesensis*, GenBank No. CP019911.1) dijalankan elektroforesis gel untuk pengesahan amplifikasi DNA dalam tindak balas LAMP yang positif (Gambar 3). Walau bagaimanapun, tidak ada amplifikasi yang diperhatikan dalam kawalan negatif. Begitu juga, asai penggumpalan karbon menunjukkan bahawa partikel karbon tergumpal dan terkumpul pada bahagian bawah tiub untuk sampel daripada D, P, T dan kawalan positif selepas 20 saat. Walau bagaimanapun, karbon dalam tiub kawalan negatif kekal dalam warna hitam, menunjukkan amplifikasi DNA tidak berlaku dalam tindak balas LAMP.



Gambar 3. (a) Analisis produk amplifikasi LAMP dengan elektroforesis gel dan (b) Asai penggumpalan karbon M = penanda DNA 100 bp; D = daun; P = urat daun; dan T = tangkai; +ve = kawalan positif menggunakan *R. syzygii* subsp. *celebesensis* (GenBank No. CP019911.1); -ve = kawalan negatif tanpa templat DNA. Gambar ini mewakili sekurang-kurangnya tiga ulangan eksperimen

Kesimpulan

Pembangunan alat diagnostik yang sesuai untuk digunakan di lapangan oleh fasiliti diagnostik dengan sumber yang terhad adalah penting bagi perkhidmatan sokongan pertanian. Teknik LAMP dengan penggumpalan partikel karbon adalah kaedah diagnostik yang berkesan untuk kawasan dengan sumber terhad. Dengan kaedah pengesanan yang mudah, proses pengesanan penyakit BDB pada pisang yang mesra pengguna dan praktikal dapat dijalankan. Selain itu, teknik yang dibangunkan ini tidak memerlukan makmal yang canggih dan alat termal blok yang digunakan untuk menjalankan tindak balas LAMP adalah lebih kos efektif daripada mesin PCR. Tambahan pula, pengesanan dapat dijalankan dengan menggunakan bateri, ini menjadikannya sesuai digunakan di kawasan terpencil dengan akses elektrik yang terhad. Ia juga mempunyai masa pemprosesan sampel yang pantas dan melibatkan latihan kurang daripada diagnostik berasaskan teknik PCR di mana PCR mengambil masa sekurang-kurangnya dua jam. Gabungan LAMP dan ujian penggumpalan partikel karbon terbukti berkesan dalam pengesanan BDB dan kaedah ini boleh dilaksanakan dengan mana-mana teknologi amplifikasi selagi saiz amplicon mencukupi untuk menginduksi mekanisme penggumpalan. Oleh kerana tindak balas penggumpalan partikel karbon adalah sangat stabil, ia sesuai untuk pelaksanaan di lapangan. Yang paling utama, kaedah ini senang dilaksanakan oleh pengguna-pengguna kurang terlatih atau sumber teknikal yang minimum dan dapat digabungkan dengan platform diagnostik yang sedia ada untuk pengesanan penyakit tumbuhan lain.

Penghargaan

Kajian ini dibiayai oleh projek PRB 405, Dana Pembangunan MARDI.

Bibliografi

- Azizi, M.M.F., Mardhiah, N.H., & Lau, H.Y. (2022). Current and emerging molecular technologies for the diagnosis of plant diseases – An overview. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 10: 2, 294–305.
- Blomme, G., Dita, M., Jacobsen, K.S., Vicente, L.P., Molina, A., Ocimati, W., Poussier, S., & Prior, P. (2017). Bacterial diseases of bananas and enset: current state of knowledge and integrated approaches toward sustainable management. *Front. Plant Sci.* 8, 1290.
- Buddenhagen, I. (2009). Blood bacterial wilt of banana: history, field biology and solution. *Acta Hortic.* 828, 57–68.
- Eden-Green, S.J. (1994). Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria in south asia: new direction of moko disease. In bacterial disease and its causative agent *Pseudomonas solanacearum*.
- Hayward, A.C., Hartman, G.L., Eds.; CAB International: Wellington, New Zealand m.s. 25–34.
- Gäumann, E. (1921). Onderzoekingen over de bloedziekte der bananen op celebes, I. Meded. Inst. *Plantenziekten* 50, 1–47.
- Healy, T.W., & La Mer, V.K. (1964). The energetics of flocculation and redispersion by polymers. *J. Colloid Sci.* 19, 323–332.
- Ivanov, A.V., Safenkova, I.V., Zherdev, A.V., & Dzantiev, B.B. (2021). The potential use of isothermal amplification assays for in-field diagnostics of plant pathogens. *Plants* 10, 2424.
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44, 693–695.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63.
- Ploetz, R.C., Kema, G.H.J., & Ma, L.J. (2015). Impact of diseases on export and smallholder production of banana. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 269–288.
- Shahbandeh, M. World production of bananas in 2020 by region (2020). Diperoleh dari <https://www.statista.com/statistics/264003/production-of-bananas-worldwide-by-region/> pada 30.3.2022.
- Stover, R.H., & Espinoza, A. (1992). Blood disease of bananas in Sulawesi. *Fruits* 47, 611–613.
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L.I., & Fegan, M. (1996). Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16s rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 10–15.
- Teng, S.K., Aziz, N.A.A., Mustafa, M., Laboh, R., Ismail, I.S., Sulaiman, S.R., Azizan, A.A., & Devi, S. (2016). The occurrence of blood disease of banana in Selangor, Malaysia. *Int. J. Agric. Biol.* 18, 92–97.

- Thwaites, R., Eden-Green, S.J., & Black, R. (2000). Diseases caused by bacteria. In diseases of banana. Abacá and Enset; Jones, D.R., Ed.; CAB International: Wallingford, New Zealand. m.s. 213–239.
- Remenant, B., de Cambiaire, J.C., Cellier, G., Jacobs, J.M., Mangenot, S., Barbe, V., Lajus, A., Vallenet, D., Medigue, C., & Fegan, M. (2011). *Ralstonia Syzygii*, the blood disease bacterium and some Asian, *R. Solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. PLoS ONE 6, e24356.
- Sahetapy, B., Maryana, N., Manuwoto, S., Mutaqin, K.H., & Latumahina, F. (2020). Test of blood disease bacterium (BDB) transmission by potential insect vectors. *J. Hama dan penyakit Tumbuh. Trop.* 20, 71–77.
- Ruehrwein, R.A., & Ward, D.W. (1952). Mechanism of clay aggregation by polyelectrolytes. *Soil Sci.* 73, 485–492.

Ringkasan

Pisang merupakan salah satu tanaman buah-buahan yang paling penting di seluruh dunia dan memberikan kepentingan yang signifikan terhadap keselamatan makanan bagi negara-negara yang sedang membangun. Namun, penyakit darah pisang yang disebabkan oleh *Ralstonia syzygii* subspecies *celebensensis* telah menjadi satu ancaman terhadap pengeluaran dan penghasilan buah pisang. Pengesanan awal dan tepat bagi penyakit darah pisang (BDB) dalam industri ini sangat penting agar strategi bagi pengendalian penyakit dapat dikawal secara efektif. Kajian ini membangunkan kaedah LAMP dengan primer khusus yang menyasarkan patogen BDB dan diikuti dengan kaedah penggumpalan untuk menentukan amplifikasi positif dalam ujian LAMP. Sensitiviti kaedah ini ialah 0.5 pg. Kajian LAMP yang menggunakan gDNA BDB menunjukkan penggumpalan partikel karbon, manakala negatif pada sampel *Fusarium oxysporum cubense* dan *Ralstonia solanacearum*. Ini telah membuktikan spesifisitas kaedah tersebut. Teknik yang baru dibangunkan ini adalah spesifik dalam mengesan BDB pada peringkat awal boleh dijadikan langkah pengawalan dan pencegahan yang lebih berkesan.

Summary

Bananas are one of the most important fruit crops in the world and contribute significant impact on food security in developing countries. However, *Ralstonia syzygii* subspecies *celebesensis* which causes blood disease in bananas is now a threat to banana production. Rapid and accurate diagnosis of BDB for on-site detection is pivotal at an early stage for an effective disease control strategy. This study developed LAMP with specific primers targeting BDB and followed by a flocculation assay for visualising positive amplification in the LAMP assay. The assay could detect gDNA of pathogen BDB at picogram levels (0.5 pg). The LAMP test on BDB gDNA showed flocculation, while negative results on *Fusarium oxysporum cubense* and *Ralstonia solanacearum* confirming the specificity of the assays. This newly developed technique is highly specific and sensitive for the early detection of BDB to adopt precautionary control measures.

Pengarang

Lau Han Yih (Dr.)

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: hylau@mardi.gov.my

Mohamad Noor Hadi Nordin, Norliza Abu Bakar (Dr.), Sohana Romeli,

Muhammad Fairuz Mohd Yusof dan Rafidah Badrun

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Mohammad Malek Faizal Azizi

Bahagian Agroteknologi dan Biosains, Agensi Nuklear Malaysia
43000 Kajang, Selangor

Nur Sulastri Jaffar

Pusat Penyelidikan Hortikultur

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor