

TEKNIK SEROLOGI UNTUK DETEKSI DINI PENYAKIT JAMUR AKAR PUTIH (*Rigidoporus microporus*) MENGGUNAKAN METODE DOTBLOT

*Serology Technique for Early Detection of White Fungal Disease (*Rigidoporus microporus*) using Dot-Blot Method*

Cici Indriani Dalimunthe¹, Sri Wahyuni² dan Radite Tistama¹

¹Balai Penelitian Sungei Putih, PO. BOX. 1415 Medan 20001

²Balai Besar Karantina Belawan, Jl. Sulawesi II Belawan

Email : cc_dalimunthe@yahoo.com

Diterima 7 November 2019 / Direvisi 17 Desember 2019 / Disetujui 31 Desember 2019

Abstrak

Teknik serologi dengan memanfaatkan antibodi di dalam serum dapat mendeteksi mikroorganisme tertentu. Hasil penelitian sebelumnya telah diperoleh antibodi yang dapat mengenali antigen JAP baik itu dari *fruiting body* maupun miselium. Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh informasi stadium serangan JAP melalui deteksi dini pada daun dan tanah menggunakan antibodi JAP dan mendeteksi sebaran miselium JAP di dalam tanah areal perkebunan karet. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengujian antibodi menggunakan metode *dot-blot* dapat mendeteksi adanya serangan JAP baik di daun maupun di akar tanaman karet. Secara visual reaksi antigen antibodi memberikan lingkaran warna coklat. Semakin gelap warna lingkaran membran berarti semakin tinggi tingkat reaksi antigen-antibodi. Pembacaan dengan perangkat lunak Corel Draw pada *dot-blot* antigen daun/tanah tanaman sehat memiliki nilai intensitas RGB lebih tinggi dibandingkan tanaman yang terinfeksi JAP. Semakin parah tanaman terserang JAP maka intensitas RGB semakin menurun. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan menjadi paket teknologi berupa kit yang dapat mendeteksi gejala serangan dini JAP pada tanaman karet. Kepraktisan atau kemudahan dalam mengidentifikasi merupakan salah satu syarat dalam mengembangkan teknologi ini untuk penerapan *early warning system* terhadap serangan JAP kedepannya

Kata kunci: *Hevea brasiliensis*, Antibodi, antigen, JAP deteksi dini, *dot-blot*.

Abstract

Serology technique using antibodies in the serum can be used to detect certain microorganisms. The antibodies that can recognize WRD antigens both from the fruiting body and mycelium have been obtained from previous study. The objectives of this study were to investigate infection stages of WRD through early detection of WRD antibodies on leaves, bark, root and soil and to detect WRD mycelium distribution in the soil of rubber planted areas. The result showed that antibody test using the dot-blot on the leaves and roots could detect WRD infection. The reaction of antigen-antibody had been visually observed as a brown circle on a membrane. The darker of the colour means that the reaction level of antigen-antibody is higher. The reading with Corel Draw software on dot-blot methods showed that leaf/soil antigens of healthy plants had a higher RGB intensity than WRD infected plants. The more severe of the WRD infected plant corresponded to the decrease of the RGB intensity. Result of this research is expected to be developed into a WRD early detection kit on rubber. Practicality or ease of use in WRD identification is one of the requirements to develop an effective early warning system for WRD in the future.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, antibodies, antigen, WRD, early detection, dot-blot

Pendahuluan

Penyakit jamur akar putih yang disebabkan oleh *R. microporus* mengakibatkan kerugian mencapai 40% pada kasus serangan berat yang pada umumnya terjadi pada tanaman karet muda berumur 3-5 tahun (Sujatno & Pawirosoemardjo, 2001). Serangan JAP di Propinsi Kalimantan Barat pada tahun 2000-2006 cenderung mengalami peningkatan dari luas serangan 14.335 Ha menjadi seluas 26.981 Ha. Kerugian finansial akibat kematian tanaman adalah sekitar Rp 1,8 triliun (sekitar US\$ 200 juta) setiap tahunnya (Situmorang *et al.*, 2007). Penyakit ini dapat ditemukan hampir di semua stadia pertumbuhan karet mulai dari pembibitan, TBM bahkan TM. Sampai saat ini belum bisa dipastikan adanya tanaman karet dari suatu klon yang bersifat resisten atau tahan terhadap penyakit ini (Fairuzah *et al.*, 2012). Luas serangan JAP di Sumatera Utara Kabupaten Asahan tahun 2014 sebesar 361,17 ha dan taksasi kehilangan hasil per tiga bulan pada luasan 216,7 ha mencapai Rp 1.159.671.750,00 dengan persentase kerugian mencapai 8,53% (Rahayu *et al.*, 2017).

Upaya pencegahan (*preventif*) penyakit JAP lebih baik dilakukan dibanding dengan pengobatan (*kuratif*) sehingga biaya pengendalian dapat efisien (Setyawan *et al.*, 2013). Metode deteksi JAP selama ini menggunakan sistem konvensional yaitu melalui penampakan visual warna daun dan pengorekan leher akar pada satu per satu tanaman. Deteksi JAP dengan visualisasi warna daun sulit dilakukan karena perubahan warna daun menunjukkan serangan patogen sudah sampai pada tahap lanjut (stadia berat). Lambatnya deteksi dini penyakit jamur akar putih disebabkan karena tidak semua ahli tepat dalam hal monitoring JAP. Untuk mempermudah deteksi JAP perlu adanya teknologi yang dapat dengan mudah diadopsi oleh para pekebun. Melalui berbagai inovasi, perlu adanya teknologi yang mampu mendeteksi dini serangan JAP pada tanaman karet baik itu pada tanaman yang tampak sehat, terserang stadium ringan, medium maupun berat (Dalimunthe *et al.*, 2016). Proses

untuk menemukan atau mendeteksi adanya antigen dan antibodi suatu penyakit dikenal dengan pemeriksaan serologi. Teknik serologi ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi JAP dan penemuan spesifik antibodi sangat penting untuk membantu diagnosa.

Dalimunthe *et al.* (2016) telah berhasil mendapatkan antibodi yang dapat mengenali antigen JAP baik itu dari *fruiting body* maupun miselium. Antibodi dari *Fruiting body* (AbF) menunjukkan hasil yang positif hanya jika bertemu dengan Antigen dari *Fruiting body* (AgF). Kompatibilitas AbF tertinggi terjadi jika bertemu dengan AgF yang ditunjukkan dengan absorbansi yang lebih tinggi dari yang lainnya. Uji lanjutan menunjukkan bahwa Antibodi Miselium (AbM) memiliki spesifikasi pengenalan terhadap antigen yang mengandung ekstrak miselium termasuk miselium di dalam tanah. Sedangkan Antibodi *fruiting body* (AbF) memiliki spesifikasi mengenali eksudat protein yang dilepaskan oleh JAP ke dalam jaringan daun melalui xylem. Artinya telah diperoleh antibodi yang dapat mengenali jamur akar putih dan konfirmasi mengenai efektivitas AbF dalam mengenali tingkat serangan JAP dengan menggunakan antigen daun terinfeksi JAP perlu diteliti lebih lanjut. Tulisan ini menjelaskan tahapan lanjutan untuk memperoleh paket teknologi berupa kit deteksi dini penyakit jamur akar putih pada tanaman karet.

Bahan dan Metode

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – Desember 2018 di Laboratorium Proteksi Balai Penelitian Sungei Putih, Pusat Penelitian Karet. Pengambilan sampel daun dan tanah sebagai sumber antigen diperoleh dari perkebunan karet di Aceh (Kebun Karang Inong), Deli Serdang (Kebun Percobaan Sungei Putih), Rantau Prapat (Kebun Mambang Muda dan Merbau Selatan). Sumber sampel berasal dari tanah bebas JAP, tanah terinfeksi JAP, daun sehat dan daun terinfeksi JAP dengan tujuan untuk menguji antigen secara luas. Selanjutnya adalah penetapan konsentrasi antibodi terpilih yang

Teknik serologi untuk deteksi dini penyakit jamur akar putih (*rigidoporus microporus*) menggunakan metode Dotblot



Gambar 1. Telur yang dihasilkan dari ayam yang telah diimunisasi dengan Antigen JAP (kiri) dan hasil ekstraksi antibodi yang telah diperoleh (kanan)

diperoleh dari tahun sebelumnya dan tahapan terakhir adalah uji antibodi-antigen menggunakan metode *dot-blot*.

Persiapan Antigen

Sumber antigen yang bersumber dari tanah yang bebas JAP, tanah yang terinfeksi JAP, daun sehat, daun terinfeksi JAP diekstraksi secara sederhana dengan tujuan untuk membandingkan dan mempermudah kerja di lapangan. Prosedur kerja: Antigen digerus dengan ekstrak buffer hingga dihasilkan sap tanaman dan direaksikan dengan antibodi terpilih menggunakan metode *dot-blot*.

Konsentrasi Antibodi pada Telur Ayam

Penetapan konsentrasi antibodi terpilih ditentukan secara fotometris ($1 = 595 \text{ nM}$) menggunakan metode Bradford (Wilson & Walker, 2000).

Reaksi Antigen-Antibody : Metode *dot-blot*

Sample antigen (daun dan tanah sekitar perakaran tanaman karet) masing-masing ditimbang 100 mg dan diekstrak dengan larutan buffer. Setelah itu, larutan ekstrak digerus dengan spatula dan dihomogenisasi. Larutan ekstrak diambil 20 mikro dan diteteskan pada membran nitroselulosa⁺. Selanjutnya pencucian dengan PBS-T selama kurang lebih 3 kali masing-masing 5 menit. Diinkubasi dengan antibodi terpilih selama 1 jam dan dicuci kembali dengan PBST, lalu diinkubasi dengan *conjugate* selama 2 jam setelah dicuci kembali dengan PBST. Tahapan akhir adalah penambahan substrat dan

dibiarkan 15 menit sampai terjadi perubahan warna kemudian reaksi dihentikan dengan menggunakan larutan NaOH. Visualisasi reaksi menggunakan perwarnaan DAB yang ditambahkan H_2O_2 . Intensitas warna hasil kesesuaian reaksi antigen-antibodi anti JAP pada membran dibaca dengan menggunakan Corel Draw pada warna merah (red), hijau (green), dan biru (blue) yang disingkat dengan RGB.

Hasil dan Pembahasan

Deteksi dini penyakit JAP menggunakan antibodi telah dilakukan pada tahun sebelumnya menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). ELISA merupakan suatu teknik imunologi untuk menentukan atau mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Keberadaan antibodi diukur melalui kenaikan titer antibodi spesifik dalam serum sampel. Antigen mula-mula diikat dengan antibodi spesifik, lalu ditambahkan lagi antibodi yang berlabel enzim, seperti peroksidase dan fosfatase. Substrat kromogenik selanjutnya ditambahkan, yang bila bereaksi dengan enzim dapat menimbulkan perubahan warna. Perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan sesuai pula dengan kadar antibodi yang dicari (Baratawidjaja, 2006). Tujuan penelitian ini sama dengan penelitian sebelumnya yakni mendeteksi dini JAP menggunakan antibodi terpilih namun metode yang digunakan berbeda yakni metode *dot-blot*.

Deteksi serangan JAP di daun dengan teknik *dot-blot* memperlihatkan gradasi warna antar skala serangan infeksi JAP (Gambar 2).



Gambar 2. Intensitas RGB pada berbagai skala infeksi JAP .

Secara visual reaksi antigen-antibodi memberikan lingkaran warna coklat (Gambar 3). Semakin gelap warna lingkaran membran berarti semakin tinggi tingkat reaksi antigen-antibodi. Pembacaan dengan perangkat *Corel Draw* pada *dot-blot* antigen daun tanaman sehat memiliki nilai intensitas RGB lebih tinggi dibandingkan tanaman yang terinfeksi JAP. Semakin parah tanaman terserang JAP maka intensitas RGB semakin menurun.

Tanaman yang terserang JAP diduga menghasilkan senyawa protein tertentu di dalam daun. Sintesis protein tersebut semakin tinggi seiring meningkatnya infeksi JAP. Warna coklat pada membran yang sangat intensif diduga karena protein-protein lain yang mirip dengan protein JAP (Gambar 3). Seperti telah diketahui bahwa antibodi terpilih dikembangkan melalui imunisasi ayam dengan ekstrak badan buah/*fruiting body* JAP. Antibodi merupakan immunoglobulin yang disintesis oleh hewan sebagai respon terhadap

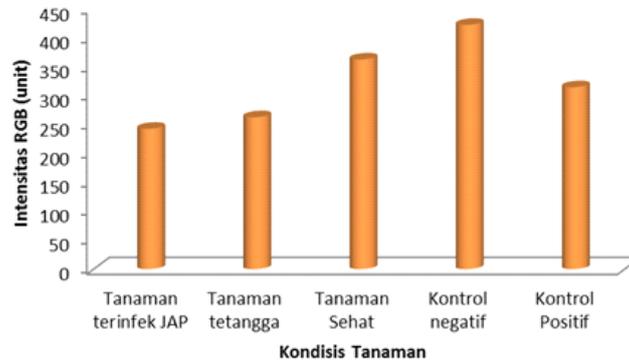
substansi asing yang masuk ke dalam tubuh (Holifah, 2012).

Konsisten kerja teknik *dot-blot* ini diuji kembali menggunakan sampel daun tanaman karet yang sehat, dengan tanaman tetangga terdekat (dalam dan luar barisan) dengan tanaman terinfeksi dan tanaman sehat klon PB 260 dari berbagai perkebunan karet yang memiliki agroklimat yang berbeda. Tanaman yang diambil sebagai contoh adalah tanaman karet terinfeksi pada skala 3. Hasil *dot-blot* yang diperoleh konsisten pada pengujian ini. Intensitas RGB pada tanaman sehat lebih tinggi dibandingkan tanaman yang terinfeksi. Tanaman tetangga memiliki intensitas yang lebih tinggi dibandingkan tanaman sakit meskipun masih lebih rendah dibandingkan tanaman sehat (Gambar 4). Berdasarkan intensitas RGB dapat diduga tanaman tetangga ini sudah terinfeksi oleh JAP. Penularan JAP ke tanaman tetangga terdekat sangat mungkin terjadi mengingat skala infeksi



Gambar 3. Hasil pengujian dengan menggunakan metode *dot-blot* pada berbagai jenis Antigen JAP

Teknik serologi untuk deteksi dini penyakit jamur akar putih (*rigidoporus microporus*) menggunakan metode Dotblot



Gambar 4. Intensitas RGB pada berbagai jenis Antigen JAP

tanaman sakit sudah mencapai skala 3. Pada skala tersebut JAP sudah menyerang jaringan dalam tanaman karet dan mampu menyebar dari akar akar tanaman yang satu ke akar tanaman yang lain.

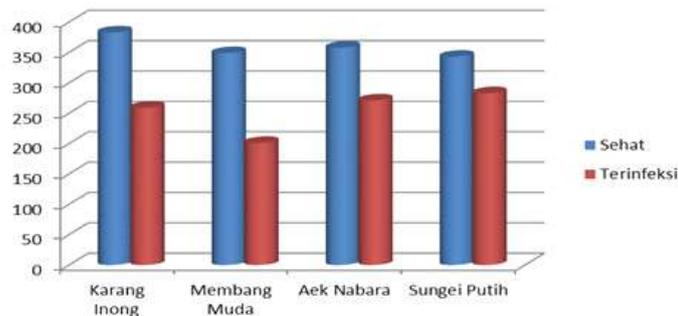
Hasil yang kurang konsisten terjadi pada analisis *dot-blot* menggunakan antigen dari ekstrak tanah. Tanah diambil di daerah rizhosfer. Intensitas RGB tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antar skala infeksi. Inkonsistensi ini diduga dikarenakan penyebaran miselium di dalam tanah tidak merata dan luasan penyebarannya tidak selalu mengikuti kondisi tanaman yang terinfeksi. Penyebaran miselium di dalam tanah tidak secepat perkembangannya di dalam jaringan perakaran dan hal ini tergantung juga dengan jenis tanahnya (Dalimunthe *et al.*, 2017).

Kompetisi antar mikroba tanah bisa menjadi penghalang penyebaran tersebut. Selain itu adanya faktor luar (kontaminasi) dalam proses purifikasi yang kurang murni, sehingga masih terdapat protein-protein lain selain protein JAP yang dapat mengganggu intensitas reaksi. Dalam penelitian ini yang

diperoleh adalah antibodi poliklonal, hal ini disebabkan karena di dalam tubuh ayam merespon antigen JAP yang mengandung berbagai jenis protein (antibodi poliklonal). Sehingga saat proses *dot-blot* antibodi lainnya yang mirip dengan protein JAP akan bereaksi dengan protein-protein selain JAP. Akibatnya intensitas warna *dot blot* jadi lebih kuat dan menjadi non-spesifik (Hutami, 2011). Dibandingkan dengan antibodi poliklonal virus, inkonsistensi antibodi poliklonal jamur lebih tinggi, mengingat banyak protein jamur yang mirip JAP.

Bagaimana tanaman tetangga (dalam dan luar barisan) bisa tertular oleh tanaman yang terinfeksi? Kemungkinan besar tidak melalui penyebaran miselium di dalam tanah. Penyebaran yang lebih cepat adalah melalui kontak akar antara akar sehat dengan akar yang terinfeksi JAP. Pada skala tiga diduga JAP sudah menyebar di seluruh bagian akar tanaman karet.

Penggunaan antibodi dapat diimplementasikan dalam identifikasi serangan JAP di perkebunan karet. Pengujian



Gambar 5. pengujian antibodi di beberapa perkebunan karet di Sumatera Utara

di beberapa perkebunan menunjukkan bahwa antibodi dapat secara nyata mendeteksi tanaman yang sehat dan tanaman terinfeksi. Hasil deteksi pada beberapa kebun karet menggunakan sampel daun menunjukkan hasil yang konsisten. Tanaman yang terinfeksi memiliki RGB bervariasi dengan kisaran 200 – 290, sedangkan RGB pada tanaman sehat relatif seragam di kisaran 350 (Gambar 5).

Kesimpulan

Antibodi yang diperoleh dapat mendeteksi serangan JAP baik di daun maupun tanah di sekitar perakaran tanaman karet menggunakan metode *dot-blot*. Serangan JAP dapat dideteksi menggunakan antigen dari ekstrak daun dan tidak konsisten jika menggunakan antigen dari tanah sehingga perlu dilakukan pengujian ulang secara lebih detail termasuk dalam hal pengambilan sampel tanah pada tanaman karet. Selain itu perlu penelitian lebih lanjut terkait dengan penggunaan antibodi monoklonal sehingga tingkat sensitifitasnya terhadap antigen JAP lebih tinggi bila dibandingkan dengan antibodi poliklonal yang diperoleh. Dengan adanya informasi ini diharapkan kedepannya akan ada paket teknologi berupa kit yang dapat mendeteksi gejala serangan dini JAP pada tanaman karet.

Daftar Pustaka

- Baratawidjaja, K.G. (2006). *Imunologi dasar*. Edisi ke-7. Balai Penerbit FK UI, Jakarta, 572 hlm
- Dalimunthe, C.I., Tistama, R & Wahyuni, S. (2016). Pengembangan teknik serologi untuk deteksi dini penyakit jamur akar putih (*Rigidoporus microporus*) pada tanaman karet. Laporan akhir tahun InSinan.
- Dalimunthe, C.I., Tistama, R & Wahyuni, S. (2017). *Detection of White Root Disease (Rigidoporus Microporus) in Various Soil Types in the Rubber Plantations Based on The Serological Reaction*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 97 (1), 012043.
- Fairuzah, Z., Dalimunthe, C.I., Karyudi, Suryaman, S & W.E. Widhayati. (2012). Efektivitas Endohevea dalam mengendalikan Penyakit Jamur Akar Putih pada Tanaman Karet. *Pros. Konferensi Nasional Karet*. Yogyakarta, 19-20 September 2012: 259-268.
- Holifah, N. (2012). Pembuatan antibodi poliklonal protein sucrose transporter menggunakan antigen protein rekombinan SUT1 dari tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.). Skripsi. Universitas Jember.
- Hutami, R. (2011). Pembentukan antibodi poliklonal matriks 1 virus influenza A H1N1 2009. Skripsi. Universitas Indonesia.
- Rahayu, M.S., Lubis, L, & Oemry, S. (2017). Distribusi Peta Awal Serangan Penyakit Jamur Akar Putih (*Rigidoporus microporus* (Swartz: Fr)) pada Beberapa Perkebunan Karet Rakyat di Kabupaten Asahan. *J. Agroekoteknologi FP USU* 5(1). Januari 2017 (17): 131-137
- Setyawan, B, Pawirosoemardjo, S & Hadi, H. (2013). *Trichoderma*-based biofungicide “TRIKO COMBI” as a control method against white root disease on hevea rubber. *Warta Per karetan* 2013. 32(2): 83 – 94.
- Situmorang, A., Suryaningtyas, H & Pawirosoemardjo, S. (2007). Current status of White Root Disease (*Rigidoporus microporus*) and the disease control management in Rubber Plantation of Indonesia. *Proceedings. International Workshop on White root Disease of Hevea rubber*. Salatiga, 28th – 29th November. *International Rubber Research Development Board*: 27-33.
- Sujatno & Pawirosoemardjo, S. (2001). Pengenalan dan Teknik Pengendalian Penyakit Jamur Akar Putih pada tanaman karet secara terpadu. *Warta Pusat Penelitian Karet*, 20(1-3): 64-75.
- Wilson, K., & Walker, J. (2000). *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Edisi ke-7. United Kingdom. Cambridge University.