

PENGEMBANGAN TEKNIK SEROLOGI UNTUK DETEKSI DINI PENYAKIT JAMUR AKAR PUTIH (*RIGIDOPORUS MICROPORUS*) PADA TANAMAN KARET

*Development of Serology Technique for Early Detection of White Root Disease
(Rigidoporus microporus) in Rubber Plants*

Cici Indriani DALIMUNTHER¹, Radite TISTAMA¹,
Sri WAHYUNI² dan Hilda Syafitri DARWIS³

¹Balai Penelitian Sungei Putih, Pusat Penelitian Karet
PO BOX 1415 Medan 20001
Email: cc_dalimunthe@yahoo.com

²Balai Besar Karantina Belawan
Jl. Sulawesi II Belawan

³Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BBPPTP) Medan
Jalan Asrama No 124 Medan 20126 Sumatera Utara

Diterima : 18 Agustus 2017 / Disetujui : 24 Januari 2018

Abstract

White Root Disease (*Rigidoporus microporus*, WRD) is one of the most important diseases in rubber plant. The disease causes the raise of economical losses since the attack resulted plant death and high additional cost for the control program. Therefore, preventive effort through early detection will be more effective and economically viable than curative approach. Early detection of WRD disease symptoms by conventional method is still difficult to be done, and it is known when the pathogen attack has already reached to the heavy stage. Effort to accelerate the detection require practical and adoptable technology by farmers. Serological reaction is one of the promising devices to be developed for detection the presence of plant pathogens. The purpose of this research was to develop serology technique for detecting early symptoms of WRD. The results showed that the production of antibodies to detect WRD could be obtained by two times immunizing of laying hens with crude extract of fruiting body (AgF) or mycelium (AgM) with three-day intervals. Antibody produced by injecting of fruiting body extract (AbF) and mycelium extract (AbM) could recognized AgM and AgF with a level of different reaction. AbM could not specifically detect the presence of WRD infection through the leaves and was less sensitive to detect the mycelium of *R. microporus* in the soil. On the other hand, AbF

*could detect infected WRD plants through the leaves and *R. microporus* mycelium in the soil.*

Keywords: Antibody, antigen, early detection, root disease, rubber plant

Abstrak

Penyakit Jamur Akar Putih (JAP) yang disebabkan oleh *Rigidoporus microporus* merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman karet. Penyakit ini dapat menimbulkan kerugian besar karena mengakibatkan kematian tanaman dan tambahan biaya yang cukup tinggi untuk pengendalian penyakit tersebut. Oleh karena itu, usaha pencegahan melalui deteksi dini akan lebih efektif dan ekonomis daripada pendekatan kuratif. Deteksi dini gejala penyakit JAP secara konvensional masih sulit dilakukan, dan baru diketahui secara pasti ketika serangan patogen sudah sampai pada tahap lanjut (stadia berat). Upaya mempercepat deteksi ini membutuhkan teknologi yang praktis dan mudah diadopsi oleh para pekebun. Perangkat teknologi untuk mendeteksi adanya materi protein dapat dilakukan melalui pemeriksaan antibodi yang berada di dalam serum. Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan teknik serologis untuk mendeteksi gejala serangan dini

penyakit jamur akar putih. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi antibodi untuk mendeteksi JAP dapat diperoleh dengan mengimunisasi ayam petelur dengan ekstrak kasar *fruiting body* (AgF) atau miselium (AgM) sebanyak dua kali dengan interval 3 hari. Antibodi hasil reaksi inokulasi ekstrak badan buah (AbF) dan ekstrak miselium (AbM) dapat mengenali AgM dan AgF dengan tingkat reaksi yang berbeda. AbM tidak dapat secara spesifik mendeteksi adanya infeksi JAP melalui daun dan kurang sensitif mendeteksi miselium di tanah. Sebaliknya AbF dapat mendeteksi tanaman terserang JAP melalui daun dan dapat mendeteksi miselium di dalam tanah.

Kata kunci: deteksi dini; ELISA; *Hevea brasiliensis*; Jamur Akar Putih; teknik serologi;

PENDAHULUAN

Salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya produktivitas tanaman karet di Indonesia adalah serangan penyakit. Pada perkebunan karet terdapat beberapa jenis penyakit yang sering menyebabkan kerusakan seperti penyakit akar, batang/cabang dan daun. Di antara 22 jenis penyakit di perkebunan karet, terdapat sebelas jenis penyakit penting yang mengakibatkan kerugian besar. Penyakit jamur akar putih (*Rigidoporus microporus*, JAP) menempati urutan pertama penyebab kerusakan tanaman karet dan diikuti oleh penyakit gugur daun *Corynespora* (*Corynespora cassiicola*), *Colletotrichum* (*Colletotrichum gloeosporioides*) dan *Oidium* (*Oidium heveae*), serta penyakit cabang/batang yakni penyakit lapuk batang/cabang (*Fusarium* sp.) dan penyakit jamur upas (*Corticium salmonicolor*) (Dalimunthe, Fairuzah, Aidi-Daslin, 2012). Penyakit JAP menyerang tanaman karet hampir di semua stadia pertumbuhan mulai dari pembibitan, tanaman belum menghasilkan (TBM) bahkan tanaman menghasilkan (TM). Sampai saat ini belum dapat dipastikan adanya tanaman karet dari suatu klon yang bersifat resisten atau tahan terhadap serangan penyakit ini (Fairuzah, Dalimunthe, Karyudi, Suryaman, & Widhayati, 2012). Upaya pencegahan lebih baik dilakukan dibanding dengan pengobatan sehingga biaya pengendalian dapat menjadi lebih efisien.

Penyakit jamur akar putih dapat 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 yang cukup luas ditemukan di Provinsi Jambi, Kalimantan Barat, Kalimantan Selatan, Bengkulu, Sumatera Barat, Sumatera Utara dan Nangroe Aceh Darussalam (Natawijaya, 2007). Kerugian finansial akibat kematian tanaman adalah sekitar IDR 1,8 triliun (sekitar USD 200 juta) setiap tahunnya (Situmorang, Suryaningtyas, & Pamirosoemardjo, 2007).

Metode deteksi JAP selama ini menggunakan cara konvensional melalui penampakan visual setelah tanaman menunjukkan gejala terserang berat atau pengorekan leher akar pada satu per satu tanaman. Cara ini membutuhkan waktu yang cukup lama dan serangan penyakit jamur akar putih sulit terdeteksi dini. Akibatnya, gejala serangan baru dapat diketahui pada saat tanaman sakit sudah dalam stadium berat dan tinggal menunggu kematian tanaman. Masalah monitoring ini perlu dipecahkan dengan teknologi yang mampu mendeteksi dini serangan JAP pada tanaman karet baik itu pada tanaman yang tampak sehat, terserang stadium ringan, medium maupun berat. Teknologi ini bermanfaat untuk *early warning system* sehingga mempercepat tindakan preventif dan kuratif yang dibutuhkan untuk mengendalikan dan menghambat serangan JAP tersebut.

Serologi adalah ilmu yang mempelajari prosedur-prosedur diagnostik dan eksperimental yang berhubungan dengan imunologi dan menyangkut reaksi serum. Uji serologi ini memanfaatkan antibodi di dalam serum dan dapat mendeteksi mikroorganisme tertentu (Fang & Ramasamy, 2015). Penemuan spesifik antibodi untuk target penyakit adalah penting sekali untuk mempermudah diagnosa. Salah satu uji serologi menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yang merupakan suatu teknik biokimia dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antigen berupa protein di dalam suatu sampel (Garcia *et al.*, 1998). Metode ini telah digunakan sebagai alat mempercepat diagnostik seperti di bidang medis (Gourinat *et al.*, 2015), patologi tumbuhan (Sevik &

Kose-Tohumcu, 2011) dan juga berbagai bidang industri makanan (Weng, Gaur, & Neethirajan, 2016).

Penggunaan tes serologi untuk menguji infeksi virus pada tanaman tomat telah banyak dilaporkan (El-gheid *et al.*, 2008; Sevik & Kose-Tohumcu, 2011), bakteri patogen (Lopez *et al.*, 2010), dan fungi patogen. Teknologi serologi selain dapat mendeteksi patogen juga menambah pemahaman mengenai ekologi dan epidemiologinya (Martin, James, & Levesque, 2000). Pengembangan teknologi serologi sangat penting dalam deteksi JAP untuk perkebunan karet mengingat luasnya areal perkebunan karet dan kerusakan diakibatkannya sangat tinggi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan teknik serologi untuk mendeteksi gejala serangan dini penyakit jamur akar putih.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini terdiri dari tiga kegiatan yang dilakukan secara paralel dan terkait satu sama lain dan dilaksanakan pada bulan Maret – November 2016. Kegiatan penelitian meliputi persiapan antigen, produksi antibodi, dan analisis serologi. Lingkup kegiatan penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Proteksi Balai Penelitian Sungei Putih dan Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BBPPTP) Medan. Pembacaan absorbansi ELISA dilaksanakan di Balai Besar Karantina Belawan.

Persiapan Antigen

Bahan yang digunakan sebagai sumber antigen pada penelitian ini berupa ekstrak badan buah (*fruiting body* atau AgF), ekstrak miselium (AgM) dan eksudat jamur Akar Putih (*R. microporus*). Badan buah diambil dari Kebun Percobaan Sungei Putih Sumatera Utara dan Sikijang Riau. Kultur JAP dalam media PDA cair yang diinkubasikan selama 7 hari di atas mesin kocok berkecepatan 100 rpm pada suhu kamar dipanen blastosporanya dengan cara filtrasi. Massa blastospora dan badan buah masing-masing 1 g dicuci dengan salin bufer fosfat (PBS) pH 7,3, kemudian masing-masing digerus dalam nitrogen cair dengan penambahan 100 mg *polivinil pirilidon* (PVP). Ekstrak disentrifugasi pada 11.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Ekstrak protein total yang ada dalam supernatan

dipakai sebagai sumber antigen dengan cara mensuspensikan masing-masing ekstrak protein ke dalam 10 ml garam fisiologis (NaCl 0,85%), kemudian difiksasi dengan menambahkan 10 ml formalin 0,6%. Campuran tersebut diinkubasi 2 hari pada suhu kamar, dan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 30 menit dan endapannya disuspensikan dalam 10 mL formalin 0,3% dalam garam fisiologis (NaCl 0,85%). Eksudat miselium disiapkan dari cairan sisa media kultur miselium berumur 2 minggu, kemudian disaring menggunakan milipore 0,02 µm. Semua antigen disimpan pada suhu 4°C sebelum diimunisasikan pada ayam.

Imunisasi Ayam

Ayam yang diimunisasi adalah ayam jenis broiler umur 10 bulan. Antigen yang diimunisasikan adalah tubuh buah (AgF), miselium (AgM), dan kontrol (PBS) masing-masing sebanyak 1 ml. Eksudat JAP tidak digunakan sebagai antigen untuk imunisasi ayam tetapi hanya untuk pengujian antibodi. Imunisasi dilakukan tiga kali dengan jarak 3 hari melalui otot bagian dada ayam. Telur ayam dikumpulkan dari mulai hari ke 0 (kontrol) hingga 30 hari setelah imunisasi.

Pemanenan Antibodi dari Kuning Telur Ayam

Telur yang diperoleh dari ayam dikumpulkan dan diberi kode sesuai dengan perlakuan. Dari banyak telur yang dihasilkan dipilih telur dengan interval berumur ± 3 hari setelah imunisasi (HSI). Kuning telur dipisahkan dari putih telurnya menggunakan saringan teh, kemudian dicuci dengan bufer PBS. Lima puluh mililiter kuning telur dimasukkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan 25 ml bufer sodium fosfat 100 mM, pH 7,6 dan diaduk perlahan. Setelah homogen, kuning telur dicampur dengan 20 ml kloroform sehingga membentuk pasta. Pasta disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C dan supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambahkan 12% (w/v) polietilen glikol (PEG). Campuran disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, dan supernatan dibuang. Pelet diresuspensikan dengan 2 ml bufer fosfat dan dua tetes 0,1% *Na-azide*, kemudian disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan untuk uji selanjutnya (Camenisch *et al.*, 1999).

Analisis ELISA

Bahan yang akan dianalisis serologi adalah *fruiting body*, miselium, rizosfer yang bebas dan terinfeksi oleh JAP, dan daun tanaman yang bebas (tidak terserang) JAP dan daun yang terinfeksi JAP. Keenam bahan tersebut diekstrak dengan *General Extract Buffer* (GEB) pH 7,4. Masing-masing antigen yang diperoleh diencerkan 10 kali dengan GEB. Sampel sebanyak 100 µL dimasukkan ke dalam sumur *Well 96* dan diinkubasikan pada suhu 4°C selama 12 jam. Antibodi disiapkan dengan cara mengencerkan 100 kali dengan *carbonat coating buffer*. *Well 96* dicuci dengan PBST tiga kali, kemudian dikeringkan dengan kertas tisu. Antibodi sebanyak 100 µL dimasukkan ke *Well 96* dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 jam. Setelah dicuci dengan PBST, 100 µL konjugat dimasukkan ke *Well 96*, dan diinkubasi selama 2 jam. Konjugat disiapkan dengan mengencerkan 200 kali konsentrasi awal dengan konjugat/ECI Buffer yang mengandung 0,2% *bovine* serum albumin, 2% PVP dan 0,02% *Na-azide* dalam PBST. *Well 96* dicuci kembali lalu dimasukkan substrat dan diinkubasikan selama 10 – 30 menit. Substrat diencerkan 8 kali konsentrasi awal dengan PBST. Reaksi ELISA dibaca dengan alat *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan ANOVA menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan dua faktor dan tiga ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Antibodi

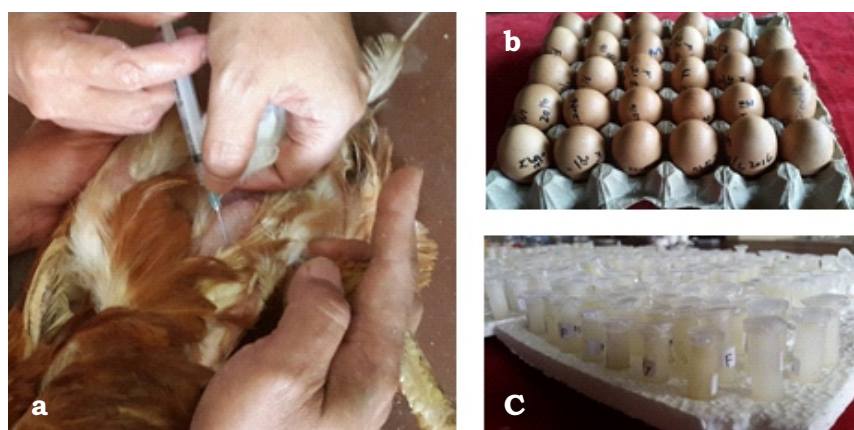
Antibodi di dalam kuning telur dapat diproduksi dengan cara mengimunitasi ayam petelur dengan antigen dari berbagai stadia *Rigidoporus microporus* melalui vena axilaris (Gambar 1a). Antibodi merupakan protein hasil respon terhadap keberadaan antigen yang bereaksi secara spesifik dengan antigen tersebut secara *in vivo* atau *in vitro*. Antibodi terdiri atas glikoprotein plasma tiga dimensi yang membentuk struktur spesifik dengan determinan antigenik (Sarantopoulos, 2014). Imunitasi diulang tiga kali dengan interval satu minggu dimaksudkan untuk meningkatkan jumlah antibodi di dalam telur. Antibodi akan ditransfer ke dalam kuning telur sebagai respon kekebalan yang diperoleh dari induk

(kekebalan maternal) untuk anaknya. Antibodi dalam telur tersebut spesifik terhadap jenis antigen yang disuntikan. Telur yang dihasilkan dikumpulkan sejak ayam diimunitasi hingga 30 hari setelah imunitasi pertama (Gambar 1b). Antibodi dalam kuning telur selanjutnya diisolasi dengan kloroform dan dipresipitasi dengan PEG (Gambar 1c). Antibodi yang diperoleh relatif banyak yaitu rata-rata 10 ml/telur. Reaksi ELISA memerlukan konsentrasi antibodi rendah dengan cara pengenceran antibodi 100 – 200 kali agar diperoleh reaksi yang lebih spesifik. Pengenceran dari total antibodi dari tiap-tiap telur dapat digunakan untuk 10.000 – 20.000 reaksi ELISA. Jumlah antibodi telur jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah antibodi dari serum darah biasanya hanya mendapatkan 1-2 ml antibodi atau setara dengan 2.000 – 4.000 reaksi ELISA. Selain lebih banyak pemanen antibodi melalui telur juga lebih mudah dan reaksinya terhadap antigen juga tinggi.

Penggunaan antibodi kuning telur untuk keperluan diagnosis protein spesifik pernah dilakukan oleh Siswanto (1998) untuk deteksi protein penanda kekeringan alur sadap pada tanaman karet. Suharyanto dan Sudarmadji (1995) juga melaporkan penggunaan antibodi kuning telur ini untuk mendeteksi keragaman jamur *Beauveria bassiana*. Selain itu, antibodi dapat digunakan untuk mendeteksi adanya penyakit jamur di dalam jaringan tanaman (Fang & Ramasamy, 2015).

Aktivitas Antibodi *Fruiting Body* (AbF) dan Antibodi Miselium (AbM) Menggunakan Metode ELISA

Berdasarkan aktivitasnya, antibodi kuning telur ayam sebelum imunitasi lebih tinggi pada kisaran absorbansi 0,0000 yang berarti belum dapat bereaksi baik dengan AgM dan AgF. Aktivitas antibodi miselium (AbM) meningkat menjadi 0,0233 terhadap AgF pada tiga hari setelah imunitasi (HSI) pertama dan mencapai puncaknya pada imunitasi kedua menjadi 0,0333 (Tabel 1). Setelah imunitasi ketiga, reaksi AbM terhadap AgF menurun menjadi 0,0133. Sementara reaksi AbM terhadap AgM baru menunjukkan peningkatan aktivitas pada imunitasi kedua. Reaksi antibodi mulai menurun setelah hari ke-21 imunitasi pertama. Namun demikian reaksi AbM menunjukkan pola peningkatan berulang



Gambar 1. Proses imunisasi ayam petelur dengan antigen JAP (a), telur yang dihasilkan setelah imunisasi ayam (b) dan antibodi dalam telur yang telah diisolasi (c)
 Figure 1. The immunization process of laying hens with antigen of white root disease (a), the eggs produced after immunization of chicken (b) and antibodies in eggs that had been isolated (c)

Tabel 1. Selisih absorbansi kontrol (pra-imunisasi) dengan absorbansi beberapa AbM untuk mengenali antigen miselium (AgM) dan antigen tubuh buah (AgF).
 Table 1. The difference in absorbance of control (pre-immunization) with the absorbance of some AbM to recognize the mycelium antigen (AgM) and fruiting body antigen (AgF).

Perlakuan Treatments	Pembacaan absorbansi panjang gelombang 405 nm Absorbance readings at wave length of 405 nm	
	Antigen F (AgF) Antigen F (AgF)	Antigen M (AgM) Antigen M (AgM)
Pra-imunisasi	0,0000d	0,0000e
3 HSI	0,0233b	0,0000e
6 HSI	0,0333a	0,0248a
9 HSI	0,0133c	0,0127b
12 HSI	0,0217b	0,0031c
15 HSI	0,0143c	0,0008d
18 HSI	0,0000d	0,0226a
21 HSI	0,0000d	0,0000e

Catatan: HSI (hari setelah imunisasi); Note: DAI (day after immunization)
 Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata pada Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5%
 Figures followed by different letter in the same column were significantly different based on Duncan multiple range test at 5% significant level

pada hari ke-18 hari setelah imunisasi pertama.

Aktivitas antibodi dari tubuh buah (AbF) terhadap AgF mulai meningkat pada tiga hari imunisasi pertama dan relatif stabil hingga hari ke-21 imunisasi pertama (Tabel 2). Aktivitas reaksi AbF terhadap AgM juga meningkat setelah imunisasi pertama dan mempunyai puncak aktivitas pada hari ketiga dan keenam setelah imunisasi pertama. Hal yang menarik dari hasil uji ini adalah reaksi AbF terhadap AgM lebih tinggi dibandingkan terhadap AgF.

Secara umum, pengujian AbF dan AbM meningkat setelah 3 hari dari waktu imunisasi dan mencapai puncaknya 6 hari setelah imunisasi kedua. Dengan demikian, produksi antibodi melalui kuning telur cukup dua kali imunisasi dan dipanen pada seminggu setelah imunisasi. Cooper dan Paterson (1995) melaporkan bahwa antibodi dapat dipanen dua minggu setelah imunisasi pertama, dan idealnya adalah 19 hari setelah imunisasi pertama. Produksi antibodi pada penelitian ini menunjukkan hasil yang lebih cepat dari penelitian sebelumnya yang memerlukan waktu 2

Tabel 2. Selisih absorbansi kontrol (pra imunisasi) dengan absorbansi beberapa AbF untuk mengenali antigen miselium (AgM) dan antigen tubuh buah (AgF)
 Table 2. The difference in absorbance of control (pre-immunization) with the absorbance of some AbF to recognize the mycelium antigen (AgM) and fruiting body antigen (AgF).

Perlakuan Treatments	Pembacaan absorbansi panjang gelombang 405 nm Absorbance readings at wave length as 405 nm	
	Antigen F (AgF) Antigen F (AgF)	Antigen M (AgM) Antigen M (AgM)
Pra-imunisasi	0,0000f	0,0000e
3 HSI	0,2248c	0,2470c
6 HSI	0,1212d	0,5490b
9 HSI	0,0758e	0,5597b
12 HSI	0,2682b	0,1933d
15 HSI	0,2012c	0,5120b
18 HSI	0,2365c	0,8173a
21 HSI	0,3172a	0,6057b

Catatan: HSI (hari setelah imunisasi); Note: DAI (day after immunization)

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata pada Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5%

Figures followed by different letter in the same column were significantly different based on Duncan multiple range test at 5% significant level

minggu (Suharyanto & Sudarmadji, 1995). Produksi yang lebih cepat secara praktis akan lebih menguntungkan dan lebih rendah peluangnya untuk terkontaminasi oleh protein lain.

Aktivitas antibodi meningkat sebagai respon tubuh dalam menetralisasi protein asing yang masuk ke dalam tubuh seperti imunisasi atau vaksin. Antibodi yang ditimbulkan sesuai dengan jenis-jenis protein yang diberikan ke dalam tubuh (Hutami, 2011). Ekstrak kasar dari koloni tunggal bakteri sudah berhasil digunakan mendeteksi beberapa penyakit pada ruminan (Shin, Lee, Elizabeth, Manning, & Collins, 2009). Ekstrak miselium yang berupa glikoprotein digunakan untuk mendeteksi adanya *Aspegillus oryzae* (Kamaraj, Sivaraji, & Govarthana, 2012). Penelitian ini menggunakan antigen berupa ekstrak kasar dari jaringan tubuh buah (*fruiting body*) atau miselium sehingga protein yang diimunisasikan juga terdiri dari berbagai jenis dan ukuran. Reaksi antibodi yang ditimbulkan juga bervariasi sehingga disebut sebagai antibodi poliklonal (*polyclonal antibody*). Untuk mendapatkan antibodi yang lebih spesifik, maka sumber protein antigen perlu difraksinasi terlebih dahulu sesuai dengan struktur dan berat molekulnya. Salah satu contoh produksi protein lebih spesifik adalah dengan

mengimunisasikan protein neuraminidase yang berperan untuk untuk pelepasan virus dari sel inang ke dalam tubuh kelinci (Rahmadewi, 2012).

Uji Diagnosis Jamur Akar Putih (JAP)

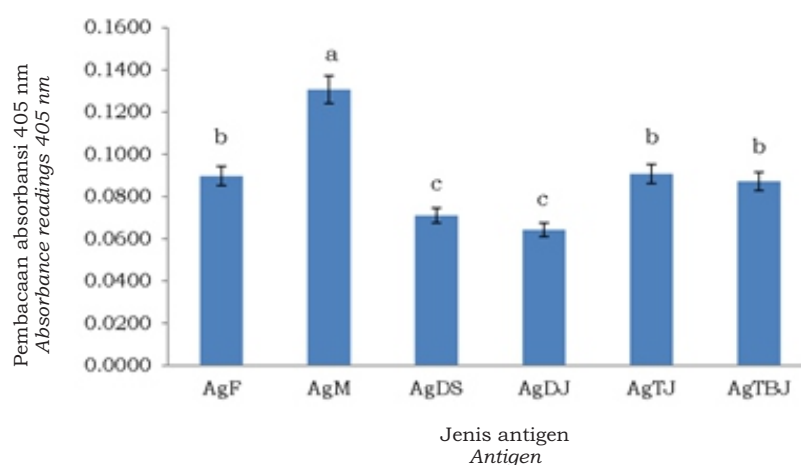
Penggunaan antibodi khususnya untuk mendeteksi penyakit di dalam jaringan tanaman memerlukan sampel yang mudah diperoleh dan mudah diekstrak. Jamur akar putih umumnya hidup di daerah rizosfer dan menjalar di perakaran dan dengan mudah menular melalui tanah. JAP akan menginfestasi permukaan akar tanpa menimbulkan gejala. Percobaan berikutnya ini dimaksudkan untuk mendeteksi keberadaan miselium atau eksudat yang dikeluarkan oleh JAP di daerah perakaran (rizosfer), jaringan akar dan daun. Sampel yang diuji adalah ekstraksi tanah yang terinfestasi JAP dibandingkan dengan tanah yang bebas JAP, dan daun tanaman sehat dibandingkan dengan tanaman yang terinfestasi JAP. Tanah yang terinfestasi JAP mengandung miselium yang tercampur dengan bahan-bahan organik lainnya. Sedangkan perubahan daun yang kusam diduga mengandung eksudat protein dari yang dilepaskan oleh JAP dan didistribusikan melalui silem ke daun. Sebagai kontrol positif digunakan ekstrak tubuh buah (*fruiting body*) dan ekstrak miselium.

Antibodi anti miselium (AbM) dapat mengenali *fruiting body* antigen dan antigen miselium dengan absorbansi berturut-turut 0,0897 dan 0,1307 (Gambar 2). Tingginya absorbansi pada reaksi AbM-AgM dibandingkan AbM-AgF menunjukkan bahwa AbM lebih spesifik terhadap AgM dibandingkan terhadap AgF. Reaksi pengenalan AbM terhadap ekstrak daun yang terinfeksi (AgDJ) dan daun sehat (AgDS) tidak berbeda nyata. Kedua sumber antigen mempunyai absorbansi hampir sama dengan absorbansi AgF. Diduga sebagian protein di dalam ekstrak daun mempunyai kemiripan dengan protein di dalam *fruiting body*. Namun demikian baik daun tanaman yang sakit maupun yang sehat tidak terdapat protein spesifik yang membedakan antara keduanya. Dengan demikian pengenalan tanaman yang terinfeksi tidak dapat diketahui menggunakan ekstrak daun jika menggunakan AbM. Penggunaan ekstrak miselium untuk memproduksi poliklonal dan monoklonal antibodi telah dilaporkan dan dapat mendeteksi jenis-jenis mikoriza (Gobel, Hanh, & Hock, 1995) dan mendeteksi adanya penyakit yang disebabkan oleh *Candida famata* (Pisa, Ramos, Molina, & Carrasco, 2007).

Pada pengamatan ekstrak tanah, baik yang terinvestasi oleh JAP (AgTJ) maupun yang bebas JAP (AgTBJ),

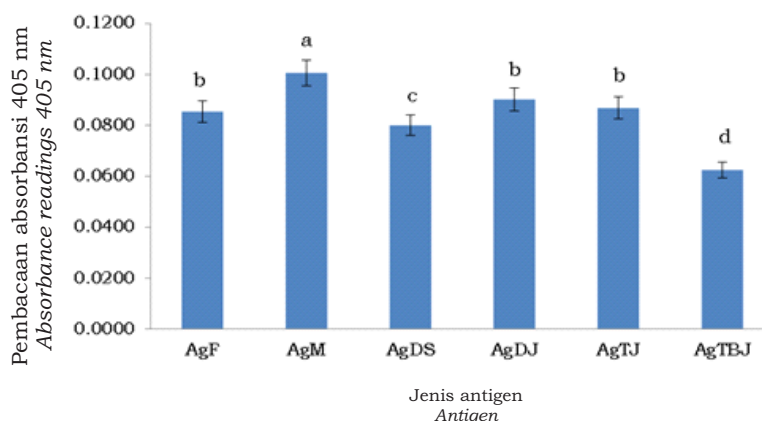
menunjukkan tingkat absorbansi hampir sama dengan AgF. Antigen tanah yang bebas JAP tidak berbeda nyata absorbansinya dibandingkan tanah yang terinvestasi oleh JAP. Populasi miselium di dalam sampel tanah yang sangat rendah diduga salah satu penyebab mengapa ekstrak tanah terinvestasi JAP tidak terdeteksi oleh AbM. Nomiya, Osaki, Sasaya, dan Ishikawa (2013) melaporkan bahwa poliklonal antibodi memiliki keterbatasan dalam pengenalan penyakit, misalnya spora *Oplidium virulentus* yang menyerang akar ketimun dapat dideteksi minimal 200 spora/100 μ L. Tingginya absorbansi pada AgTJ dan AgTBJ, menyebabkan AbM kurang spesifik dikembangkan untuk mendeteksi propagul miselium JAP yang tersebar di dalam tanah.

Antibodi *fruiting body* (AbF) mengenali AgF dan AgM, dan pengenalan AbF terhadap AbM lebih tinggi dibandingkan terhadap AgF. AbF juga mengenali adanya serangan JAP melalui ekstrak daun (Gambar 3). Hal tersebut ditunjukkan dari nilai absorbansi daun tanaman yang terinfeksi JAP memiliki angka yang lebih tinggi dibandingkan absorbansi dari antigen daun tanaman sehat. Diduga, jamur akar putih pada tingkat perkembangan tertentu mengeluarkan senyawa eksudat yang dilepaskan ke dalam silem dan didistribusikan sampai ke daun. Antibodi



Gambar 2. Pengenalan antibodi miselium (AbM) terhadap beberapa jenis antigen: AgF (antigen *fruiting body*), AgM (antigen miselium), Ag DS (antigen daun sehat), AgDJ (antigen daun terkena JAP), AgTJ (tanah terinfeksi JAP), AgTBJ (tanah bebas JAP).

Figure 2. An introduction of antibodies mycelium (AbM) against certain types of antigens: AgF (*fruiting body antigen*), AgM (*mycelium antigen*), AgDS (*healthy leaves antigen*), AgDJ (*exposed leaves WRFD antigen*), AgTJ (*soil infested WRFD*), AgTBJ (*free land of WRFD*).



Gambar 3. Pengenalan antibodi tubuh buah (AbF) terhadap beberapa jenis antigen: AgF (antigen *fruiting body*), AgM (antigen miselium), AgDS (antigen daun sehat), AgDJ (antigen daun terkena JAP), AgTJ (tanah terinvestasi JAP), AgTBJ (tanah bebas JAP).

Figure 3. An introduction of antibodies fruiting body (AbF) against certain types of antigens: AgF (*fruiting body antigen*), AgM (*mycelium antigen*), AgDS (*healthy leaves antigen*), AgDJ (*exposed leaves WRFD antigen*), AgTJ (*soil infested WRFD*), AgTBJ (*free land of WRFD*).

anti *fucose* (jenis *mucilage*) dapat digunakan untuk mendeteksi eksudat yang dihasilkan oleh akar tanaman dan sekaligus mengetahui posisi eksudat di dalam sel-sel akar (Roy *et al.*, 2002). Holifah (2012) melaporkan bahwa antibodi dapat dibuat untuk mengenali protein yang berperan dalam transport sukrosa dari daun ke jaringan lainnya.

Reaksi AbF dengan antigen tanah terinvestasi JAP (AgTJ) lebih tinggi dibandingkan dengan antigen tanah bebas JAP (AgBJ). Reaksi AbF-AgTJ yang lebih tinggi tersebut menunjukkan adanya miselium, eksudat atau spora JAP di dalam tanah yang terdeteksi oleh AbF. Dengan demikian AbF dapat mengenali baik eksudat yang dilepas oleh JAP yang kemudian ditransport dari akar menuju ke daun maupun JAP yang tumbuh di dalam tanah. Pemilihan sampel tergantung kepraktisan pengambilan sampel di lapangan dan tergantung pada umur tanaman. Pada umur tanaman kurang dari 18 bulan dengan tinggi tanaman kurang lebih 2 m maka sampel daun lebih mudah diambil. Sedangkan pada umur tanaman lebih dari 18 bulan, tanaman sudah tinggi lebih dari 2 m sehingga sulit diambil daunnya, maka sampel tanah di perakaran tanaman lebih mudah digunakan.

Beberapa hal yang perlu dikembangkan dalam penelitian ini adalah ketepatan dalam pendeteksian beberapa

jenis tanah di areal perkebunan karet. Selain itu untuk mengetahui tingkatan serangan JAP dari daun dengan menggunakan teknik serologi. Kepraktisan dan kemudahan dalam mengidentifikasi merupakan salah syarat dalam mengembang teknologi serologi untuk *early warning system* serangan JAP.

KESIMPULAN

Produksi antibodi untuk mengenali JAP dapat dilakukan dengan mengimunisasi ayam petelur dengan ekstrak kasar *fruiting body* atau miselium sebanyak dua kali dengan interval 3 hari. Antibodi dapat dipanen dari kuning telur ayam seminggu setelah imunisasi pertama. AbF dan AbM dapat bereaksi baik AgM maupun AgF dengan tingkat reaksi yang berbeda. Pada uji lanjutan, AbM tidak dapat membedakan tanaman yang sehat dengan tanaman yang terinfeksi infeksi JAP melalui analisis ekstrak daun. Selain itu AbM juga kurang sensitif untuk mendeteksi adanya miselium di tanah dalam jumlah rendah. Sedangkan AbF memiliki spesifikasi mendeteksi JAP melalui ekstrak daun karena bereaksi dengan eksudat protein yang dilepaskan oleh JAP ke dalam jaringan daun melalui silem, dan dapat mendeteksi miselium di dalam tanah pada konsentrasi di mana AbM tidak dapat mendekteksi miselium tersebut. Konfirmasi mengenai efektivitas AbF dalam mengenali tingkat serangan JAP dengan menggunakan antigen daun terinfeksi JAP

perlu dilakukan pada tahun berikutnya sehingga nantinya akan diperoleh informasi stadium serangan JAP melalui deteksi melalui daun. AbM juga perlu diuji untuk mengetahui efektivitasnya dalam mendeteksi tingkat investasi JAP dan sebaran miselium JAP di areal perkebun karet dan pemetaan potensi serangan JAP dengan mengukur intensitas dan sebaran JAP di dalam tanah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi melalui Program Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional (InSinan) Tahun Anggaran 2016 yang telah mengalokasikan dana kegiatan penelitian pada Balai Penelitian Sungei Putih, Pusat Penelitian karet dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian No. 293/SP2H/LT/DRPM/III/2016 pada tanggal 10 Maret 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Camenisch, G., Tini, M., Chilov, D., Kvietikova, I., Srinivas, V., Caro, J., Spielmann, P., Wenger, R. H., & Gassmann, M. (1999). General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 α . *The Federation of American Societies Experimental Biology*, 13(1), 81-88.
- Cooper, H.M., & Paterson, Y. (1995). *Production of Antibodies. In Current Protocol in Immunology*. New York, USA: John & Wiley Sons.
- Dalimunthe, C.I., Fairuzah, Z., & Aidi-Daslin. (2012). Pemanfaatan mikroorganisme antagonis untuk mengendalikan penyakit penting pada tanaman. *Prosiding Semnas Mikologi 2012 dan Pembentukan Perhimpunan Mikologi Indonesia* (p. 482-488). Purwokerto, Indonesia: Universitas Jendral Soedirman.
- El-gheid, L.F., Salam, M.I., Salem, A.M., Eldeen, A.F.N., & Abdallah, N.A. (2008). Molecular and serological studies on a plant virus affecting strawberry. *Arab J. Biotech.*, 11(2), 303-314.
- Fang Y., & Ramasamy, R.P. (2015). Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensor*, 5(3), 537-561. Doi: 10.3390/bios5030537
- Fairuzah, Z., Dalimunthe, C.I., Karyudi., Suryaman, S., & Widhayati, W.E. (2012). Efektivitas Endohevea dalam mengendalikan penyakit jamur akar putih pada tanaman karet. *Prosiding Konferensi Nasional Karet* (p. 259-268). Yogyakarta, Indonesia: Pusat Penelitian Karet.
- Garcia, H.H., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E., Montenegro, T., Martinez, S.M., Tsang, V.C.W., & Gilman, R.H. (1998). A specific antigene-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92(4), 411 – 414.
- Gobel, H., Hahn, A., & Hock, B. (1995). Production of polyclonal and monoclonal antibodies against hyphae from arbuscular mycorrhizal fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15(3-4), 293 – 304. Doi : 10.3109/07388559509147415.
- Gourinat A. C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases*, 21(1), 84 – 86. Doi: 10.3201/eid2101.140894.
- Holifah, N. (2012). Pembuatan antibodi poliklonal protein sucrose transporter menggunakan antigen rekombinan SUT1dari tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) (Skripsi), Universitas Jember, Indonesia.
- Hutami, R. (2011). *Pembentukan antibodi poliklonal matrik 1 virus influenza H1N1 2009* (Skripsi), Universitas Indonesia, Indonesia.

- Kamaraj, M., Sivaraji, R., & Govarthanana, M. (2012). Raising of polyclonal antibody against the *Aspergillus oryzae* proteins in albino rat. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(2), 342–348.
- Lopez, M.M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M.T., Liop, P., Penyalver, R., & Cambra, M. (2010). Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *Int. Microbiol.*, 6(4), 233-243. Doi: 10.1007/s10123-003-0143-y.
- Martin, R.R., James, D., & Lévesque, C.A. (2000). Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 207-239. Doi: 10.1146/annurev.phyto.38.1.207.
- Natawijaya, H. (2007). Government policy on the control of white root disease *Rigidoporus lignosus* of rubber. *Proc. Int. Work. White Root Dis. Hevea Rubb. Salatiga, Indonesia:IRRI*
- Nomiyama, K., Osaki, H., Sasaya, T., & Ishikawa, K. (2013). Preparation and characterization of polyclonal antibody against resting spores of *Olpidium virulentus*, fungal vector of lettuce big-vein disease. *Journal of General Plant Pathology*, 79(1), 64 – 68. Doi: 10.1007/s10327-012-0424-4.
- Pisa D., Ramos, M., Molina, S., Garcia, P., & Carrasco, L. (2007). Evolution of antibody response and fungal antigens in the serum of a patient infected with *Candida famata*. *J. of Medical Microbiology*, 56, 571–578. Doi: 10.1099/jmm.0.47042-0.
- Rahmadewi, F. (2012). *Pembentukan antibodi poliklonal glubular head neuraminidase virus Influenza H5N1* (Skripsi), Universitas Indonesia, Indonesia.
- Roy, S.S., Mitra, B., Sharma, S., Das, T.K., & Babu, C.R. (2002). Detection of root mucilage using an anti-fucose antibody. *Annals. of Botany*, 89, 293 – 299. Doi: 10.1093/aob/mcf040.
- Sarantopoulos, S. (2014). Antibody Production by the Immune System. In Edward A. Greenfield *Antibodies A Laboratory. Manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-9
- Semangun, H. (2000). *Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia.* Yogyakarta, Indonesia: Gadjah Mada University Press.
- Sevik, M.A., & Kose-Tohumcu, E. (2011). The ELISA analysis results in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed health testing for Tobacco mosaic virus. *Zemdirbyste Agriculture*, 98(3), 301-306.
- Shin, S.J., Lee, S.S., Elizabeth, J., Manning, B., & Collins, M.T. (2009). Production of and applications for a polyclonal IgY diagnostic reagent specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *The Microbiological Society of Korea*, 47(5), 1-12. Doi: 10.1007/s12275-009-0052-7.
- Siswanto. (1998). Hen egg-yolk antibody for detection of protein markers of tapping panel dryness in rubber trees. *Menara Perkebunan*, 66(1), 20-28.
- 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* (p. 27-33). Salatiga, Indonesia: IRRDB-IRRI.
- Suharyanto., & Sudarmadji, D. (1995). Pemilihan antibodi poliklonal yang spesifik terhadap *Beauveria bassiana*. *Menara Perkebunan*, 63(3), 80-87.
- 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.
- Weng, X., Gaur, G., & Neethirajan, S. (2016). Rapid detection of food allergens by microfluidics ELISA-based optical sensor. *Biosensors*, 6(24), 1–10. Doi: 10.3390/bios6020024