

Karakteristik antibodi anti *Ganoderma* sp. Yang dihasilkan dari jenis dan sumber antigen yang berbeda

Characteristic of antibodies against Ganoderma sp produced from different types and sources of antigens

Irma KRESNAWATY ^{1*)}, Kholis A. AUDAH ²⁾, Hasim MUNAWAR ³⁾ & Happy WIDIASTUTI ¹⁾

1) Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl Taman kencana No 1 Bogor 16128, Indonesia

2) Universitas Swiss Jerman, The Prominence Tower, Jalan Jalur Sutera Barat Kav 15, Alam Sutera, Panunggan Tim., Pinang, Tangerang, Banten 15143

3) Balai Besar Veteriner, Jl. R.E Martadinata No.30 Bogor 16114

Diterima tgl 18 Januari 2017 / disetujui tgl 28 Maret 2017

Abstract

Basal stem rot (BSR) disease caused by Ganoderma sp. Is the most important disease in oil palm plantations. The effectivity of BSR control depends on early detection of this disease. The earlier the disease is diagnosed, the severity of damage could be prevented. Therefore, technology for early detection of Ganoderma infection is very important. Immunochromatographic techniques based on the reaction of antigens and antibodies can be developed for detection of Ganoderma sp infection. The objective of the study was to produce antibodies using different Ganoderma sp because it is known to have genetic variations. In this study, immunoglobulin Y (IgY) against Ganoderma sp produced in chicken eggs was used as the source of antibodies. The 21 weeks laying hens were immunized with several types of Ganoderma sp.. The source of Ganoderma sp. Isolates were mycelium and exudates. The antibodies derived from the mycelium showed more consistent results compared with those derived from the exudates. In addition, the antibodies derived from Ganoderma sp of Location 2 and 3 showed higher reactivity with some of the antigens compared to those of Location 1. The characteristics and the protein profiles of antibodies produced using Location 1, 2 and 3 isolates were vary in term of, sensitivity and amino acid compositions.

[Key words : *Ganoderma*, early detection, antibody IgY, micellium and exudates]

Abstrak

Penyakit busuk pangkal batang (BPB) kelapa sawit yang disebabkan oleh *Ganoderma* sp. Merupakan penyakit yang paling penting pada tanaman kelapa sawit. Keberhasilan pengendalian penyakit BPB kelapa sawit sangat dipengaruhi oleh deteksi dini dari serangan *Ganoderma* sp. Oleh karena itu teknologi yang dapat mendeteksi serangan dini *Ganoderma* sp. Sangat diperlukan. Teknik deteksi secara imunokromatografik yang berdasarkan reaksi antigen dan ntramus dapat dikembangkan untuk mendeteksi infeksi *Ganoderma* sp.. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan ntramus dengan menggunakan beberapa *Ganoderma* sp yang berbeda karena diketahui *Ganoderma* sp memiliki variasi yang beragam. Pada penelitian ini digunakan ntramus ntramuscular Y (IgY) spesifik terhadap *Ganoderma* sp yang berasal dari telur ayam yang diimunisasi dengan *Ganoderma* sp. Ayam petelur usia 21 minggu diimunisasi dengan beberapa *Ganoderma* sp dari beberapa lokasi yang digunakan sebagai sumber antigen dari miselium dan eksudat. Antibodi yang diproduksi dengan menggunakan miselium memberikan hasil yang lebih konsisten dibandingkan dengan antibodi yang diproduksi dengan menggunakan eksudat. Antibodi yang dihasilkan dengan menggunakan antigen *Ganoderma* sp asal Lokasi 2 dan 3 lebih reaktif terhadap beberapa antigen dibandingkan dengan antibodi asal Lokasi 1. Karakteristik dan profil protein dari antibodi yang diproduksi dengan menggunakan isolat dari Lokasi 1, 2 dan 3 bervariasi dalam hal sensitivitas dan komposisinya.

[Kata kunci : *Ganoderma* sp., deteksi dini, ntramus IgY, miselium, eksudat]

*)Penulis korespondensi: irma.kresnawaty@yahoo.com

Pendahuluan

Penyakit busuk pangkal batang (BPB) pada kelapa sawit yang disebabkan oleh *Ganoderma* sp. Merupakan penyakit yang paling merusak baik pada tanaman belum menghasilkan (TBM) maupun tanaman menghasilkan (TM) (Susanto et al., 2005). Tingkat serangan terus meningkat pada tanaman generasi kedua atau ketiga hingga mencapai 40% (Suharyanto & Darmono, 2001). Penyakit BPB saat ini juga mulai menyerang tanaman generasi pertama pada daerah pengembangan baru kelapa sawit di Sulawesi dan Papua. Di Indonesia, penyakit BPB telah menyebabkan kerugian yang sangat besar (Purnamasari et al., 2012). Di Asia Tenggara kerugian akibat penyakit ini diprediksi mencapai US\$ 500 juta dalam satu tahun (Hushiarian et al., 2013), sehingga berpotensi melumpuhkan industri kelapa sawit.

Menurut Breton et al. (2010) tanaman kelapa sawit umumnya memiliki keragaman genetik yang sempit dan umumnya peka terhadap *Ganoderma* sp. Sehingga usaha untuk memperoleh bibit tanaman yang tahan penyakit sulit dilakukan dan memerlukan waktu lama. Di lain pihak *Ganoderma* sp. Memiliki keragaman genetik yang tinggi. Gejala penyakit baru dapat terlihat pada kondisi dimana ntram sebagian besar jaringan pangkal batang telah rusak. Sementara penggunaan bahan kimia melalui penyuntikan batang atau penyerapan oleh akar diduga hanya efektif jika dilakukan pada tingkat serangan dini (Suharyanto & Darmono, 2012).

Deteksi sedini mungkin untuk mengetahui infeksi *Ganoderma* sp. Sangat diperlukan untuk efektifitas dan menekan biaya pengendalian. Oleh karena itu teknologi atau perangkat yang dapat mendeteksi infeksi *Ganoderma* sp. Sedini mungkin sangat diperlukan (Suharyanto & Darmono, 2012). Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia (PPBBI) telah mengembangkan perangkat deteksi dini infeksi *Ganoderma* sp. Secara serologis berdasarkan dot blot immunosorbent assay (DBIA). Kualitas ntramus merupakan komponen penting yang sangat mempengaruhi keefektifan deteksi dari kit tersebut. Bagaimanapun juga kualitas ntramus dipengaruhi oleh keragaman *Ganoderma* serta sumber antigen yang digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis karakteristik ntramus dari beberapa asal ntramu *Ganoderma* sp. Serta tipe antigen.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayam petelur usia 21 minggu, pakan ayam,

ntramus dan vaksin ayam, *Freund's complete adjuvant*, *EggExtract IgY* (Promega), natrium azida 3%, *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7, buffer karbonat pH 9,6; 3,3'-5,5' tetrametilbenzidin (TMB), susu skim, konjugat IgY-HRP anti chicken, H₂SO₄, Tris HCl, sodium dodesilsulfat (SDS), glisin, gliserol, *coomasie brilliant blue*, CH₃COOH, merkaptotanol, akrilamid, N-metilen akrilamid, ntramus persulfate (APS), Temed, bromfenol blue G250, HCl, Tween-20, H₂SO₄, ovalbumin (OVA), *bovine serum albumin* (BSA), tris buffer saline, diaminobenzidine (DAB), buffer fosfat, asam sitrat, natrium sitrat, natrium asetat, β-siklodekstrin, urea ntramus peroksida, dan asam asetat.

Pembuatan antigen

Isolat *Ganoderma* sp. Sebagai sumber antigen berasal dari tiga kebun kelapa sawit yaitu : Lokasi 1 (Banten), Lokasi 2 (Jawa Barat) dan Lokasi 3 (Lampung). Pada tahap awal terlebih dahulu dibuat kultur murni *Ganoderma* sp. Yaitu dengan melakukan isolasi dari masing-masing tubuh buah *Ganoderma* sp. Untuk selanjutnya dikultur pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA).

Dua tipe antigen yang digunakan adalah berupa miselium dan eksudat *Ganoderma* sp.. *Ganoderma* sp. Sebagai sumber antigen baik dalam bentuk miselium maupun eksudat diremajakan lebih dahulu dengan menumbuhkan pada medium PDA. Selanjutnya kultur yang telah diremajakan ditumbuhkan dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) 50 mL yang digoyang dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang selama 2 minggu. Miselium disaring kemudian dicuci dengan air steril dan selanjutnya dilakukan ekstraksi protein. Ekstraksi protein dari biomassa miselium dilakukan dengan menggerus biomassa miselium menggunakan mortar dalam nitrogen cair. Selanjutnya serbuk halus miselium ditambah dengan buffer fosfat pH 7,2 dengan perbandingan 1:1 (v/v). Homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 8.000-10.000 rpm selama 15 menit dan filtratnya dipisahkan sebagai sumber antigen (Suharyanto et al., 2012).

Eksudat *Ganoderma* sp untuk sumber antigen dikumpulkan dari kultur kayu karet. Pembuatan kultur *Ganoderma* sp. Pada kayu karet adalah dengan terlebih dahulu menumbuhkan *Ganoderma* sp. Pada medium PDA dalam botol jam, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 minggu. Potongan kayu karet direbus dalam air mendidih selama 2 jam, untuk menghilangkan sisa getah serta zat warna kayu karet, kemudian potongan kayu tersebut disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 OC selama 15 menit.

Potongan kayu karet steril tersebut selanjutnya diinokulasikan pada kultur *Ganoderma* sp. Dalam botol jam. Eksudat yang keluar dari kultur kayu karet sekitar umur 2-4 bulan dikumpulkan dan langsung disuntikkan ke hewan percobaan.

Antigen yang disuntikkan pada hewan percobaan merupakan variasi asal antigen, yaitu masing-masing Lokasi 1, 2 dan 3 dan campuran ketiganya, serta kontrol. Jenis antigen yang digunakan yaitu miselium dan eksudat.

Imunisasi hewan percobaan

Ayam diadaptasikan dahulu sebelum dilakukan penyuntikan antigen. Sebanyak 1 mL protein sebagai antigen dari biomassa miselium disuntikkan secara intramuscular ke hewan percobaan, yaitu ayam petelur (Lu *et al.*, 2009). Setelah mendapat suntikan pertama, selanjutnya dilakukan penyuntikan ulang (*booster*) dimana antigen diemulsikan dalam *Freund's adjuvant incomplete*. Jarak antara penyuntikan pertama dan kedua adalah 14 hari demikian pula jarak antara penyuntikan kedua dan ketiga (*booster 2*), sedangkan volume protein antigen yang disuntikkan adalah sama yaitu 1 mL. Hal yang sama juga dilakukan untuk antigen yang berasal dari eksudat *Ganoderma* sp.

Ekstraksi antibodi IgY anti *Ganoderma* sp.

Telur dikumpulkan 1 minggu setelah imunisasi pertama dan disimpan pada suhu 4°C hingga proses ekstraksi. Antibodi dari kuning telur ayam (IgY) dipisahkan dengan EGG Stract IgY (Promega). Kuning telur dicuci dengan akuades dan dikeringkan menggunakan kain kasa. Kuning telur diukur volumenya dan ditambahkan reagen *delipidation* sebanyak 5 x volume kuning telur. Campuran tersebut diaduk hingga merata menggunakan *magnetic stirrer* selama 5 menit dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 24 jam. Selanjutnya, larutan dipisahkan endapannya dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Lapisan air di bagian atas dipisahkan, kemudian ditambahkan reagen *precipitation* dengan volume yang sama dengan supernatan. Supernatan diaduk hingga merata menggunakan *magnetic stirrer* selama 2 menit kemudian disimpan pada suhu 4 °C selama 24 jam. Selanjutnya, endapan yang mengandung antibodi disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Antibodi yang sudah diekstraksi diawetkan dengan penambahan 0,5 ml natrium azida 3% , kemudian disimpan dalam tabung eppendorf di dalam freezer. Sebagian antibodi yang digunakan untuk pengujian disimpan di dalam refrigerator (4°C).

Konsentrasi antibodi diukur dengan menganalisis hasil fraksinasi secara spektro-

fotometri pada $\lambda=280$ nm. Serapan (absorbansi) diukur dan konsentrasinya dihitung dengan rumus:

$$[\text{Ig Y}](\text{mg/mL}) = \frac{\text{serapan} \times \text{faktor pengenceran}}{1,4}$$

Keterangan : 1,4 = faktor koreksi untuk IgY

$$[\text{Ig Y}] = \text{Konsentrasi Ig Y}$$

(Suharyanto *et al.*, 2014)

Karakterisasi protein dengan SDS-PAGE

Pembuatan *running gel* akrilamid 12% dilakukan dengan mencampurkan akuades 1,67 mL; Tris HCl 1,5 M pH 8,8 1,25 mL; SDS 10% 50 μL ; akrilamid 2 mL; APS 10% 30 μL dan Temed 5 μL . Setelah 30 menit (gel mengeras) ditambahkan isopropanol untuk meratakan gel. Kemudian dibuat *stacking gel* (akrilamid 4,5%O dengan komposisi: akuades 1,475 mL; Tris HCl 0,5 M pH 6,8 sebanyak 0,625 mL; SDS 10% 25 μL ; akrilamid 0,35 mL; APS 10% 25 μL dan temed 4 μL . Selanjutnya, pada *stacking gel* dibuat sumuran dengan memasukkan sisir pada gel dan setelah 30 menit sampel antibodi dimasukkan (10 μL dan 20 μL *loading buffer*) dan marker protein (5 μL) yang telah dipanaskan terlebih dahulu di dalam water bath pada suhu 100 °C selama 5 menit. Analisis protein dengan SDS Page dilakukan pada voltase 75 volt selama 3 jam (Suharyanto *et al.*, 2014).

Pengukuran antibodi dengan ELISA

Sebanyak 100 μL miselium *Ganoderma* dalam buffer karbonat-bikarbonat ditambahkan ke dalam 96 sumuran ELISA. Larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Sumuran ELISA tersebut dicuci dengan PBS 0,01 M sebanyak 3 kali dan ditambahkan 100 μL susu skim 2,5% dan diinkubasi selama 2 jam. Kemudian sumuran dicuci kembali dengan PBS 0,01 M sebanyak 3 kali. Ke dalam sumuran ditambahkan antibodi (IgY) anti *Ganoderma* sp dengan pengenceran 1:50 v/v sebanyak 100 μL dan diinkubasi selama 1 jam. Sumuran ELISA tersebut kemudian dicuci menggunakan PBS 0,01 M sebanyak 3 kali. Setelah dicuci, ke dalam sumuran ditambahkan antibodi IgY-HRP *antichicken* sebanyak 100 μL (pengenceran 1:10.000 v/v dalam PBS) , diinkubasi selama 1 jam, lalu dicuci dengan PBS 0,01 M sebanyak 3 kali. Kemudian ditambahkan substrat TMB yang terdiri dari subtrat A dan B, sehingga membentuk warna biru. Reaksi dihentikan dengan penambahan H₂SO₄ M yang merubah larutan berwarna biru menjadi kuning dan dibaca pada alat pembaca ELISA dengan panjang gelombang 450 nm (Maryam *et al.*, 2000).

Hasil dan Pembahasan

Penyiapan antigen dari isolat *Ganoderma* sp.

Gambar 1 menunjukkan *Ganoderma* sp. yang ditumbuhkan pada medium PDB dalam botol jam. Pertumbuhan miselium *Ganoderma* sp dapat dilihat pada Tabel 1. Pertumbuhan *Ganoderma* sp.asal Lokasi 1 dan 2 lebih cepat dibandingkan dengan *Ganoderma* sp yang berasal dari Lokasi 3 (Tabel 1). Sedangkan *Ganoderma* sp yang berasal dari Lokasi 1 membentuk eksudat paling cepat dibandingkan dengan *Ganoderma* yang berasal dari Lokasi 2 dan 3 Eksudat mengandung enzim lignolitik yang berfungsi dalam proses infeksi *Ganoderma* sp. dan menguraikan kayu (Corley & Tinker, 2003).

Sementara itu, eksudat yang terbentuk berwarna putih atau putih kekuningan dan dari 10 botol yang dibuat hanya sekitar 80-90% botol yang menghasilkan eksudat dalam jumlah cukup. Eksudat di beberapa botol sulit diambil karena tertutup oleh miselium yang tumbuh cepat. Dari hasil ini nampaknya pembentukan eksudat tidak berkaitan dengan pertumbuhan miselium. Namun

diduga lebih dipengaruhi oleh virulensi masing-masing isolat. Diduga penyimpanan isolat dalam waktu lama atau pemindahan isolat berkali kali akan mempengaruhi virulensinya dan hal ini berkaitan dengan kemampuannya menghasilkan eksudat.


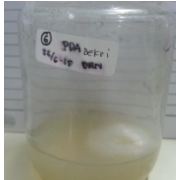
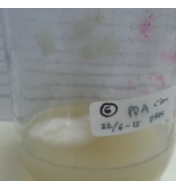


Gambar 1. Isolat *Ganoderma* sp. yang ditumbuhkan dalam medium PDB untuk menghasilkan miselium sebagai antigen.

Figure 1. *Ganoderma* sp isolates were cultured in PDB to get the miselium as antigen.

Tabel 1. Pertumbuhan *Ganoderma* sp. pada medium PDB selama 5 hari.

Table 1. Growth of *Ganoderma* sp . in PDB medium for 5 days

Jenis (Type)	Botol (Bottles)	Hari ke- (Days)					Gambar (Figure)
		1	2	3	4	5	
Lokasi 1 (Location 1)	1	+	+	+	+	+	
	2	+	+	+	+	+	
	3	-	+	+	+	+	
	4	+	+	+	+	+	
	5	+	+	+	+	+	
	6	-	+	+	+	+	
	7	-	+	+	+	+	
	8	+	+	+	+	+	
	9	-	+	+	+	+	
	10	+	+	+	+	+	
Lokasi 2 (Location 2)	1	+	+	+	+	+	
	2	+	+	+	+	+	
	3	+	+	+	+	+	
	4	+	+	+	+	+	
	5	+	+	+	+	+	
	6	+	+	+	+	+	
	7	+	+	+	+	+	
	8	+	+	+	+	+	
	9	+	+	+	+	+	
	10	+	+	+	+	+	
Lokasi 3 (Location 3)	1	-	+	+	+	+	
	2	-	+	+	+	+	
	3	-	+	+	+	+	
	4	-	+	+	+	+	
	5	-	+	+	+	+	
	6	-	+	+	+	+	
	7	+	+	+	+	+	
	8	+	+	+	+	+	
	9	-	+	+	+	+	
	10	-	+	+	+	+	

Keterangan : (+) tumbuh, (-) belum/tidak tumbuh, (K) kontaminasi.

Note : : (+) grow well, (-) not grow, (K)contaminated.

Ekstraksi antibodi IgY

Jumlah IgY yang diperoleh dengan menggunakan kit ini lebih banyak dibandingkan dengan IgY yang dihasilkan menggunakan metode pengekstrak IgY yang biasa digunakan yaitu campuran PBS, kloroform dan polietilen glikol yang menghasilkan IgY 70-86% (Clark *et al.*, 1993).

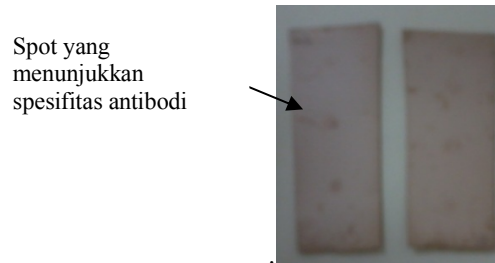
Secara visual dan kelarutannya terdapat perbedaan antara antibodi yang berasal dari *Ganoderma* sp. Lokasi 1 dan Lokasi 3. *Ganoderma* sp. dari Lokasi 3 menghasilkan antibodi yang berwarna putih dan mudah diendapkan, sedangkan *Ganoderma* dari Lokasi 1 menghasilkan antibodi yang berwarna kekuningan dan sulit diendapkan. Hasil konfirmasi dengan *dot blot immunoassay* menunjukkan bahwa antibodi (Ab) IgY yang dihasilkan bereaksi dengan antigen yang terlihat dengan terbentuknya noktah (dot) yang menandakan terdapatnya Ab spesifik di dalam antibodi yang diekstrak (Gambar 2). Karakteristik BM antibodi yang dihasilkan dianalisis di SDS PAGE (Gambar 3).

Untuk mengetahui kuantitas antibodi, dilakukan analisis kadar protein menggunakan metode standard (Lowry) (Tabel 2). Hasil analisis menunjukkan bahwa waktu panen mempengaruhi kadar Ab yang dihasilkan. Walaupun demikian terdapat nilai kadar protein tertinggi untuk Ab yang berasal dari Lokasi 3, yaitu 2,64 mg/L yang dipanen lebih awal, sedangkan nilai tertinggi kandungan protein Ab miselium Lokasi 1 diperoleh 1,76 mg/L. Perbedaan konsentrasi protein dalam antibodi dapat disebabkan oleh volume kuning telur yang berbeda.

Selain konsentrasi, pada penelitian ini juga dianalisis ukuran molekul dari antibodi yang dihasilkan menggunakan SDS PAGE. Antibodi Lokasi 3 menunjukkan konsentrasi yang lebih tinggi yang ditandai dengan pita protein yang lebih tebal. IgY biasanya mempunyai dua pita rantai berat dengan BM ± 120 kDa dan rantai ringan ± 60 kDa. Antibodi Lokasi 3 mempunyai pita pada rentang BM tersebut, yaitu 116 kDa dan 48 kDa. Adanya pita-pita tambahan diduga disebabkan adanya pengotor yaitu protein lain (Gambar 3).

Untuk mengetahui spesifitas dan sensitivitas antibodi yang dihasilkan maka dilakukan analisa ELISA. Antigen yang digunakan berasal dari masing-masing lokasi dan campuran (Tabel 3). Antigen Lokasi 3 dapat dideteksi oleh antibodi seluruh jenis antibodi. Sementara antigen Lokasi 1 dan Lokasi 2 hanya dapat dideteksi pada konsentrasi antibodi dengan pengenceran antibodi yang relatif tinggi (1:10). Antibodi Lokasi 3 dan

Lokasi 2 dapat mendeteksi antigen asalnya dan menghasilkan absorbansi yang relatif tinggi sehingga mudah diamati. Antibodi Lokasi 2 bisa mendeteksi campuran miselium *Ganoderma* sp. dengan memberikan nilai absorbansi yang tinggi pada 450 nm. Nilai absorbansi antara blanko, pengenceran 1:10, 1:100 dan 1:1000 memberikan nilai absorbansi yang relatif tidak berbeda dan nilai absorbansi pada semua antibodi sangat rendah.



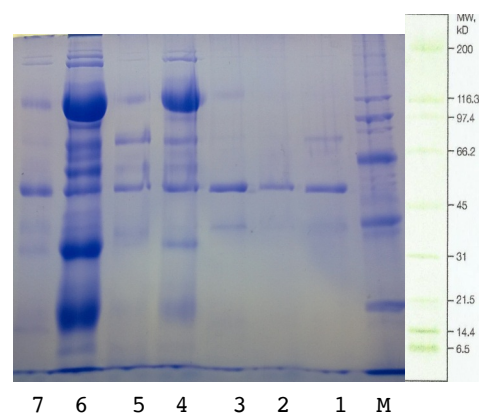
Gambar 2. Kualitas antigen-antibodi anti *Ganoderma* secara *dot blot immunoassay*

Figure 2. Quality of the antigen analyzed using *dot blot immunoassay*

Tabel 2. Konsentrasi protein antibodi dari miselium *Ganoderma* sp. dari Lokasi 1 dan 3

Table 2. Concentration of antibody protein from the mycelium of *Ganoderma* sp of Location 1 and 3

Antibodi (Antibody)	Konsentrasi protein/Protein Concentration (mg/L)
Lokasi 3.1	2,38
Lokasi 3.2	2,64
Lokasi 3.3	1,35
Lokasi 3.4	2,44
Lokasi 1.1	1,22
Lokasi 1.2	1,76
Lokasi 1.3	0,86



Gambar 3. Profil protein antibodi. Baris 1-3. Antibodi asal Lokasi 1, dan baris 4-7 antibodi asal Lokasi 3

Figure 3. Antibody protein profile of; 1-3 Location 1 antibody and 4-7 Location 3 antibody.

Pengujian komposisi asam amino dari masing-masing menunjukkan bahwa komposisi utama antibodi Lokasi 3, Lokasi 2 dan campuran memiliki kesamaan, yaitu didominasi oleh asam amino glutamat, valin dan leusin, sedangkan antibodi Lokasi 1 didominasi asam glutaat, serin dan fenilalanin (Tabel 4). Hasil yang hampir sama juga dilaporkan oleh Kresnawaty et al., (2015) yaitu untuk antibodi IgY okratoksin yang didominasi oleh asam amino glutamat, serin dan leusin. Gugus asam amino glutamat berperan dalam menjadikan antibodi tersebut mudah larut dan berikatan dengan sisi hidrofilik pada antigen

miselium, sedangkan asam amino valin, fenilalanin dan leusin yang bersifat non-polar berperan dalam membentuk konformasi hidrofobik pada antibodi ataupun pengikatan pada sisi hidrofob pada antigen. Antibodi Lokasi 1 memiliki salah satu gugus dominan serin yang bersifat polar, tetapi juga didominasi oleh gugus fenilalanin yang lebih non polar dibandingkan dengan valin dan leusin. Diduga perbedaan komposisi asam amino penyusun antibodi mempengaruhi keefektifan antibodi berikatan dengan antigen.

Tabel 3. Sensitivitas dan spesifitas antibodi yang dihasilkan melalui analisis ELISA

Table 3. Sensitivity and spesificity test of the resulting antibodies using ELISA

No	Antigen/ Antigen	Antibodi (Antibody)	Absorbansi (Absorbance in 450 nm)	Absorbansi - blanko (Blanko- absorbance)	No	Antigen/ Antigen	Antibodi (Antibody)	Absorbansi (Absorbance in 450 nm)
1	Lokasi 3 (Location 3)	Blanko	0.090	0.000	3	Lokasi 2 (Location 2)	Blanko	0.077
		Ab-3 1:10	0.122	0.032			Ab-3 1:10	0.117
		Ab- 3:100	0.118	0.028			Ab-3 1:100	0.084
		Ab-3:1000	0.134	0.044			Ab-3 1:1000	0.093
		Ab-1 1:10	0.137	0.047			Ab-1 1:10	0.106
		Ab-1 1:100	0.142	0.052			Ab-1 1:100	0.103
		Ab-1 1:1000	0.135	0.045			Ab-1 1:1000	0.086
		Ab-2 1:10	0.124	0.034			Ab-2 1:10	0.102
		Ab-2 1:100	0.130	0.040			Ab-2 1:100	0.105
		Ab-2 1:1000	0.126	0.036			Ab-2 1:1000	0.103
		Campur 1:10	0.120	0.030			Campur 1:10	0.090
		Campur 1:100	0.108	0.018			Campur 1:100	0.086
		Campur 1:1000	0.109	0.019			Campur 1:1000	0.092
		Blanko	0.096	0.000			Blanko	0.094
		2	Lokasi 1 (Location 1)	Ab-3 1:10			0.098	0.002
Ab-3 1:100	0.111			0.015	Ab-3 1:100	0.094		
Ab-3 1:1000	0.086			-0.010	Ab-3 1:1000	0.088		
Ab-1 1:10	0.101			0.005	Ab-1 1:10	0.100		
Ab-1 1:100	0.119			0.023	Ab-1 1:100	0.113		
Ab-1 1:1000	0.110			0.014	Ab-1 1:1000	0.110		
Ab-2 1:10	0.126			0.030	Ab-2 1:10	0.127		
Ab-2 1:100	0.106			0.010	Ab-2 1:100	0.136		
Ab-2 1:1000	0.113			0.017	Ab-2 1:1000	0.129		
Campur 1:10	0.097			0.001	Campur 1:10	0.108		
Campur 1:100	0.110			0.014	Campur 1:100	0.119		
Campur 1:1000	0.102			0.006	Campur 1:1000	0.109		

Ket = Ab-1 : Antibodi dari antigen Lokasi 1; Ab-2: Antibodi dari antigen Lokasi ., dan Ab-3: Antibodi dari antigen Lokasi 3

Notes = Ab-1 : Antibody from Location 1 antigen; Ab-2 : Antibody from Location 2 antigen and Ab-3 : Antibody from Location 3 antigen

Tabel 4. Komposisi asam amino antibodi anti *Ganoderma*Table 4. The amino acid composition of antibodies anti *Ganoderma*

Jenis asam amino (Amino acid type)	Antibodi miselium lokasi 3 <i>/Location 3</i> <i>miselium</i> <i>antibody</i> (mg/100 g)	Antibodi miselium lokasi 2/ <i>Location 2</i> <i>miselium</i> <i>antibody</i> (mg/100 g)	Antibodi miselium lokasi 1/ <i>Location 1</i> <i>miselium</i> <i>antibody</i> (mg/100 g)	Antibodi campuran miselium/ <i>Mixed</i> <i>miselium</i> <i>antibody</i> (mg/100 g)	Antibodi eksudat location 2/ <i>location 2</i> <i>exudates</i> <i>antibody</i> (mg/100 g)
Asam aspartat	401,71	241,59	255,83	322,61	416,19
Asam glutamat	595,11	345,99	371,62	469,68	614,10
Serin	406,48	211,50	245,70	322,20	407,03
Histidin	107,67	60,09	67,78	85,26	567,07
Glisin	289,17	158,67	167,98	223,07	302,54
Treonin	354,51	191,34	211,06	278,61	364,24
Arginin	362,85	203,89	217,45	286,77	382,59
Alanin	291,62	166,89	180,77	230,57	305,06
Tirosin	220,31	112,36	122,54	159,00	230,76
Metionin	92,81	38,94	39,23	56,02	84,39
Valin	415,23	241,26	249,72	333,37	444,76
Fenilalanin	217,32	120,52	488,31	174,09	229,14
Isoleusin	219,15	146,14	150,25	184,00	220,66
Leusin	435,12	252,21	264,60	350,01	455,04
Lisin	291,29	178,35	189,42	235,87	275,34
Total asam amino	4700,34	2669,75	3222,26	3711,13	5298,93

Antibodi yang dihasilkan dari antigen miselium asal Lokasi 3 mengandung total asam amino yang cukup tinggi dibandingkan dengan miselium asal Lokasi 1 dan campuran. Sumber antigen yaitu miselium dan eksudat mempengaruhi komposisi asam amino yang terkandung dalam antibodi khususnya untuk isolat *Ganoderma* sp. Asal Lokasi 2. Secara total maupun masing-masing asam amino yang dihasilkan pada eksudat jauh lebih banyak dibandingkan pada miselium. Peningkatan yang dicapai hampir di semua asam amino yaitu menjadi dua kali dan khususnya histidin meningkat menjadi lebih dari 8 kali lipat. Walaupun demikian nampaknya komposisi asam amino yang didominasi asam glutamat kemungkinan berperan dalam menentukan reaksi antigen antibodi.

Kesimpulan

Perbedaan jenis dan sumber antigen memberikan karakteristik antibodi yang berbeda. Antibodi yang berasal dari miselium memberikan hasil yang konsisten dibandingkan dengan eksudat. Antibodi yang berasal dari *Ganoderma* sp. asal Lokasi 3 dan Lokasi 2 memberikan serapan yang lebih tinggi dengan beberapa antigen yang digunakan (serapan sangat rendah, tidak jauh berbeda dengan yang lain). Komposisi asam amino antibodi dari masing-masing lokasi berbeda dan diduga sumber antigen mempengaruhi komposisi asam amino yang terkandung dalam antibodi.

Daftar Pustaka

Breton F, M Rahmaningsih, Z Lubis, I Syahputra, U Setiawaty, A Flori & R Sore (2010).

Evaluation of resistance level of oil palm progenies to basal rot disease by the use of an early screening test, relation to field observation. Second International Seminar Oil palm Disease: Advance in *Ganoderma* Research & Management, 31 May 2010. Yogyakarta, Indonesia. Indonesian Oil Palm Research Institute (IOPRI) & Malaysia Oil palm Board (MPOB).

Clark JR, RR Marquardt, A Oosterveld, AA Frolich, FJ Madrid & M Dawood. (1993). Development of a quantitative and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for ochratoxin A using antibodies from the yolk of the laying hen. *J. Agric. Food. Chem* 41, 1784-1789.

Corley RHV & PB Tinker (2003). *The Oil Palm*. Blackwell Publishing, Oxford.

Darmono TW (1998). Molecular approaches to elucidation basal stem rot disease in oil palm. In: *Proc of the BTIG Workshop on Oil Palm Improvement through Biotechnology*. Bogor 16-17 April 1997. p 83-94.

Darmono TW (2000). *Ganoderma* in oil palm in Indonesia: Current status and prospective use of antibodies for the detection of infection. In: Flood J, PD Bride & M Holderness (ed), *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. CABI Publishing. p 249-265.

Darmono TW & Suharyanto (1995). Recognition of field materials of *Ganoderma* sp. associated with basal stem rot disease in oil palm with a polyclonal antibody. *Menara Perkebunan* 64 (1), 15-22.

- Hushiarian NA Yusof & SW Dutse (2013). Detection and control of *Ganoderma boninense*: strategies and perspectives Roorzbeh, *SpringerPlus* 2,555
- Lu, Y, J Liu, L Jim, X Li, H Xue, Q Lin & Yomgpin. (2009). Passive immunization of crayfish (*Procambarus clarkiaii*) with chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159,750.
- Maryam, R, S Bahri, S Rachmawati & R Widiastuti (2000). Evaluation of methods for aflatoxin and fumonisin determination in foods and feeds in Indonesia. Paper presented in *The 2nd Research Coordinated Meeting (RCM) of the FAO/IAEA Coordinated research Programme (CRP) on Evaluation Methods of Analysis for Determining Mycotoxin Contamination of Food and Feed, Vienna-austria*, 4-8 December 2000.
- Purnamasari MI, C Prihatna, AW Gunawan & A Suwanto (2012). Isolasi dan identifikasi secara molekuler *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan penyakit busuk pangkal batang di kelapa sawit. *J Fitopatol Indones* 8(1), 9-15.
- Suharyanto & TW Darmono (2001). Analysis of protein profiles on oil palm and coconut tree to *Ganoderma* sp infection. In: *Proc.of the 2nd Indonesian Biotechnol. Conf* 388 -395.
- Suharyanto, I Kresnawaty & Siswanto (2014). Deteksi Dini Kontaminasi Okratoksin pada Kopi dan Kakao. *Laporan Penelitian PPBBI.2014*
- Suharyanto, TW Darmono, Ahmad Haslan Saragih, Haryo Tejo Prakoso & Deden Dewantara Eris (2012). Perangkat deteksi dini infeksi *Ganoderma* sp. pada kelapa sawit dengan teknik serologi. *Menara Perkebunan* 80(1), 8-16.
- Susanto A, PS Sudharto & RY Purba (2005). Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantations. *Mycopathologia* 159 (1), 153-157.