

PETUNJUK TEKNIS

Pemakaian Gano-kit untuk Deteksi Dini
Infeksi *Ganoderma* Sp. pada Kelapa Sawit



Pendahuluan

Penyakit busuk pangkal batang (BPB) kelapa sawit yang disebabkan oleh *Ganoderma* sp. merupakan penyakit yang paling merusak baik pada tanaman belum menghasilkan (TBM) maupun tanaman menghasilkan (TM) di Indonesia (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 ekonomis yang sangat besar (Purnamasari *et al.*, 2012) sehingga berpotensi melumpuhkan agribisnis kelapa sawit.

Pengendalian penyakit BPB kelapa sawit masih menghadapi kendala (Sapak *et al.* 2008) karena pada saat gejala serangan mulai terlihat, umumnya tanaman sulit diselamatkan karena patogen telah menjalar ke seluruh bagian tanaman (Nur Ain Izati & Abdullah, 2008). Oleh karena itu perlu dilakukan survai untuk dapat mendeteksi

serangan dini *Ganoderma* sp. di lapang, sehingga prosedur pengendalian *Ganoderma* sp. dapat diterapkan seawal mungkin, sebagaimana penerapan konsep mencegah lebih baik dari mengobati.

Metabolit sekunder dan enzim-enzim lignolitik ditemukan pada tanaman sawit yang terserang *Ganoderma* sp. (Abdullah *et al.*, 2010). Keberadaan senyawa metabolit sekunder dan enzim-enzim lignolitik ekstraseluler tersebut dapat dideteksi untuk mengetahui terjadinya infeksi *Ganoderma* sp. pada kelapa sawit. Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Perkebunan Indonesia telah mengembangkan dan memproduksi perangkat deteksi dini GanoKit yang mampu mendeteksi penyakit BPB kelapa sawit di lapang (Suharyanto *et al.*, 2012). Teknik deteksi tersebut dikembangkan berdasarkan prinsip serologi berbasis *dot immunobinding assay* (DIBA) menggunakan antibodi IgY anti *Ganoderma* sp. (Suharyanto & Darmono 1999; Suharyanto *et al.*, 2012).

Gano-Kit (Prototype 4.1)

Gano-Kit (Prototype 4.1) merupakan perangkat berbasis serologi yang dirancang khusus untuk mendeteksi secara dini serangan *Ganoderma* sp. pada tanaman kelapa sawit, baik pada tanaman bibitan, TBM dan TM. Gano-Kit (Prototype 4.1) dapat digunakan untuk menguji 20 sampel tanaman kelapa sawit dengan tiga kali replika. Waktu yang diperlukan untuk satu kali pengujian adalah 5 jam termasuk 3 jam waktu jeda.

Keunggulan:

- Perangkat test kit deteksi dini infeksi *Ganoderma* sp. (*Ganokit*) pada tanaman kelapa sawit yang cepat, sederhana dan murah.
- Dapat digunakan langsung di lapang.
- Dapat digunakan pada bibit sawit berumur 4 bulan sampai tanaman dewasa berumur 15 tahun.

Kegunaan:

- Untuk survai pemetaan dan monitoring tingkat serangan di lapang dengan hasil yang lebih tepat sebelum gejala dan tanda penyakit terlihat secara visual.
- Upaya sertifikasi bibit kelapa sawit bebas *Ganoderma* sp.
- Upaya penekanan kerugian produksi akibat penyakit BPB.

Cara survai pemetaan tingkat serangan dengan

Gano-Kit

- (1) Untuk pemetaan tingkat serangan mula-mula lakukan sensus untuk mengamati dan mencatat tingkat serangan *Ganoderma* sp. dan kondisi tanaman sawit secara umum pada setiap Blok kebun. Untuk memudahkan dalam

pencatatan tingkat serangan dapat digunakan Tabel berikut :

| Stadium infeksi | Kriteria Warna | Tanda-tanda dan Gejala |
|-----------------|------------------------------------|---|
| 0 | H (Hijau/Green) | Tanaman sehat dengan daun-daun berwarna hijau segar |
| 1 | K (Kuning/Yellow) | Tanaman tampak sehat, pada pangkal batang terlihat tanda serangan berupa massa miselium atau inisiasi tubuh buah |
| 2 | M (Merah/Red) | Tanaman sakit dan beberapa daun klorosis dan beberapa daun tombak tidak membuka, beberapa tubuh buah dewasa dapat dilihat pada pangkal batang |
| 3 | B (Hitam/Black) | Tanaman tumbang, sisa tunggul / bonggol dapat |

| | | |
|---|----------------------------------|---|
| | | ditemukan |
| 4 | P (Putih/White) | Tanaman tumbang, sisa tunggul tidak dapat ditemukan |

- (2) Gambar hasil sensus penyebaran tingkat serangan dengan tanaman dilambang segitiga yang diberi warna sesuai dengan stadium infeksi sehingga diperoleh peta sebaran serangan dalam setiap Blok kebun. Indeks keparahan penyakit (*disease severity index*) dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut : Indeks keparahan penyakit :

$$\frac{\sum(A \times B) 100}{\sum n \times 4}$$

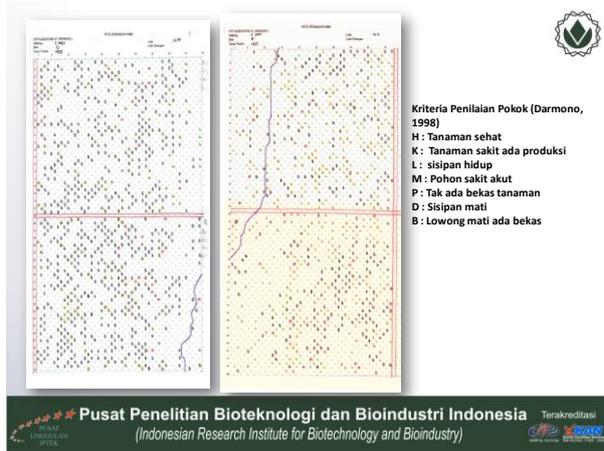
A = Skor tingkat serangan (0 s/d 4)

B = Jumlah tanaman dengan skor tingkat serangan 0, 1, 2, 3 atau 4

n = Jumlah tanaman

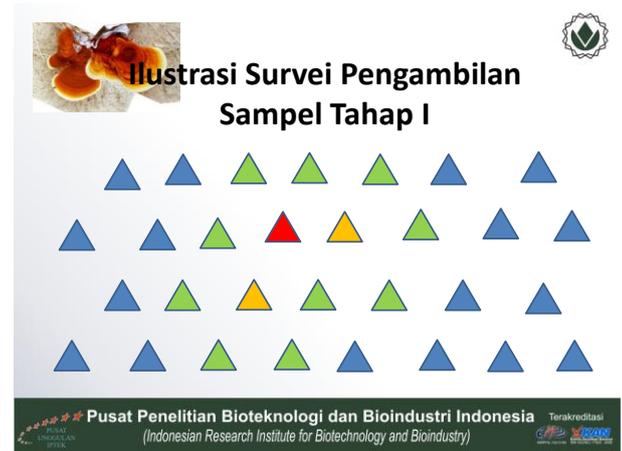
4 = Skor tertinggi tingkat serangan

Contoh sensus tanaman di kebun sawit terserang *Ganoderma* sp.

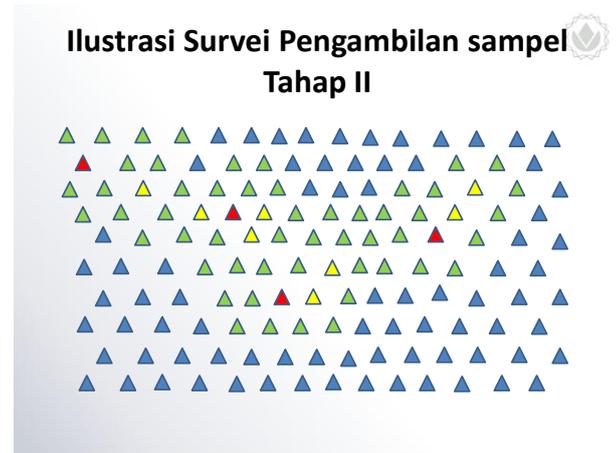


(3) Tandai 10-12 sampel tanaman terlihat sehat (tanaman sehat dilambangkan segitiga hijau) di sekeliling tanaman yang dilaporkan terserang menurut hasil sensus (tanaman sakit dilambangkan segitiga

kuning, merah, hitam dan putih) (lihat ilustrasi). Jumlah individu sampel dapat lebih dari tujuh tergantung jumlah tanaman yang dilaporkan sakit menurut hasil sensus.



- (4) Ambil 10-12 sampel tanaman yang sudah ditandai pada butir (3). Sampel diambil dari bagian akar yang masih segar (5-10 cm) atau pangkal batang 10-20 gram dengan bor listrik, dan simpan dalam kantong plastik atau kantong kertas.
- (5) Uji sampel dengan Gano-Kit untuk menetapkan adanya serangan *Ganoderma* sp. pada pohon, dengan mengikuti petunjuk yang tertera pada Gano-Kit. Tanaman terinfeksi dalam uji dengan uji GanoKit akan menghasilkan bercak berwarna coklat.
- (6) Pada tahap II, ambil sampel lanjutan untuk memperluas wilayah penyebaran pada Blok sawit yang positif terdeteksi serangan *Ganoderma* sp. dengan Gano-Kit. Hal ini dilakukan karena penyebaran penyakit BPB ini dapat melalui kontak akar. Sebanyak masing-masing 7 sampel akar sawit diambil dari pohon sawit yang berada pada blok yang menunjukkan serangan pada deteksi/ pengambilan sampel tahap pertama (lihat ilustrasi).



- (7) Selanjutnya uji sampel Tahap II dengan Gano-Kit seperti sebelumnya untuk menetapkan serangan *Ganoderma* sp. pada pohon sampel. Hasil uji Gano-Kit tahap pertama dan kedua diplot dan dipetakan untuk menggambarkan tingkat

serangan BPB pada satu kebun kelapa sawit.

- (8) Berdasarkan peta tingkat serangan akan disusun rekomendasi pencegahan serangan dan cara pengendaliannya oleh tim pakar *Ganoderma* sp. PPBBI

Gano-Kit (Prototype 4.1)

Isi dalam kemasan

1. 1 buah kotak uji berisi: 20 lembar kertas uji.
(satu kertas uji untuk satu tanaman)
2. 1 **Kemasan A** (Antigen), berisi:
 - ✓ 20 tabung penggerus 2 ml untuk penggerusan sampel tanaman,
 - ✓ 1 buah pengaduk gelas,
 - ✓ 1 buah pipet tetes,
 - ✓ 1 buah botol plastik berisi 20 ml buffer PBS Ag
3. 1 buah botol plastik berisi 15 ml buffer TEN TC Blocking
4. 1 **Kemasan B** (Antibodi), berisi:
 - ✓ 1 botol vial berisi antibodi kering beku
 - ✓ 1 botol plastik berisi 15 ml buffer TEN TC Ab
5. 1 **Kemasan C** (PBS Tween), berisi:
 - ✓ 1 tabung reaksi plastik berisi 25 µl surfaktan Tween
 - ✓ 1 botol plastik berisi 50 ml buffer PBST
6. 1 **Kemasan D** (Konjugat), berisi:
 - ✓ 1 botol vial berisi konjugat peroksidase kering beku
 - ✓ 1 botol plastik berisi 20 ml buffer TEN TC konjugat
7. 1 **Kemasan E** (Pewarna), berisi
 - ✓ 1 botol plastik berisi 15 ml buffer PBS DAB
 - ✓ 1 tablet DAB (10 mg)

- ✓ 1 tabung Eppendorf berisi 12 µl hydrogen peroksida (H₂O₂)

8. Tatakan terbuat dari Sterofoam

9. Sarung tangan

Penunjang Ganokit yang tidak termasuk dalam kit (disediakan oleh pengguna):

- ✓ Air bersih (air mineral kemasan botol)
- ✓ Tissue
- ✓ Gunting
- ✓ Kertas HVS
- ✓ Plastik untuk limbah
- ✓ Penutup hidung (saputangan)
- ✓ pensil

Catatan Keamanan Pengguna:

1. Pada Kemasan E terdapat bahan kimia yang berbahaya apabila terhirup dan terkena kulit.

Maka gunakanlah SARUNG TANGAN dan PENUTUP HIDUNG saat aplikasi.

2. Limbah di dalam plastik penampung dituang ke dalam lubang tanah sedalam 20 cm yang berlokasi jauh dari sumber air dan pemukiman warga agar terjadi penguraian secara alami.
3. Tidak dibenarkan untuk memakai ulang semua peralatan dalam Gano-Kit.
4. Cucilah tangan sebelum dan sesudah pemakaian Gano-Kit.
5. Alat pengaduk gelas, pipet tetes, dan gunting dapat digunakan berkali-kali dengan sebelumnya dibersihkan dengan air bersih dan dikeringkan dengan tissue.
6. Kertas uji hanya boleh disentuh dengan sarung tangan agar tidak terjadi reaksi silang

CARA PENGAMBILAN CONTOH

Gano-Kit

1. Bagian tanaman contoh yang diambil adalah jaringan pangkal batang dengan ketinggian 20 cm diatas permukaan tanah untuk kelapa sawit TBM dan 60-70 cm untuk kelapa sawit TM.
2. Jaringan pangkal batang sebaiknya diambil dengan mesin bor berdiameter ± 1 cm. Jaringan juga bisa diambil dengan gunting setelah pelepah daun dikelupas dengan kapak atau dodos
3. Jaringan pangkal batang diambil sebanyak setengah buku jari dimasukkan ke dalam tabung penggerus (KEMASAN A)
4. Beri kode pada tabung penggerus sesuai dengan kode tanaman contoh
5. Alat yang digunakan untuk mengambil jaringan pangkal batang atau mengelupas pelepah sebaiknya dibilas dengan air bersih dan lap

dengan tissue/kain basah sebelum berganti ke tanaman contoh setelahnya

6. Pengerjaan Gano-Kit Prorotype 4.1 akan lebih efisien apabila pengambilan sampel langsung dilakukan untuk 20 tanaman.

CARA KERJA

Gano-Kit (Prototype 4.1)

Buka kemasan (A) ANTIGEN



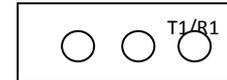
Contoh dipotong-potong lembut di atas kertas
besih dengan gunting



Masukkan kembali contoh ke dalam tabung
penggerus sampai volume contoh mencapai 0,25
ml. Tambahkan larutan PBS Ag sebanyak 1 -2
tetes, lalu gerus sampai halus dengan alat
pengaduk (cairan akan berwarna kecoklatan),
tambahkan kembali PBS Ag sampai volume
contoh+PBS Ag adalah 1 ml, kocok, tegakkan
selama 1 jam di tatakan, sampai mengendap



Gunakan sarung tangan, susun kertas uji pada
tutup kotak kemasan Gano-Kit yang telah
dibersihkan dengan tissue. Pipet cairan sampel
(bagian yang bening), teteskan pada tiga titik di
atas kertas uji masing-masing sebanyak 1 tetes.
Contoh:



Keringanginkan selama 5 menit



Letakkan kertas uji pada kotak uji (bagian yang
ditetesi menghadap ke atas) rendam dengan 15
ml TEN TC blocking, sambil digoyang selama 15
menit, kemudian buang cairan TEN TC blocking.



Buka kemasan (B) ANTIBODI



Larutkan antibodi keringbeku dengan buffer Ten TC Ab secukupnya, kemudian diaduk dengan alat pengaduk, setelah larut, tuangkan kembali ke dalam buffer TEN TC Ab dan kocok. Kemudian tuangkan larutan tersebut ke dalam kotak uji biarkan 1 jam sambil digoyang sesekali lalu buang



Buka kemasan (C) PBS TWEEN (untuk dua kali pemakaian dengan tiga kali ulangan berturut-turut)



Campurkan Tween 20 dengan larutan PBST secukupnya dengan pipet tetes dan aduk hingga larut, lalu tuangkan kembali ke dalam larutan PBST dan kocok



Tuangkan larutan PBST ke kotak uji sampai batas tera kotak uji (garis putih pada dasar kotak uji), lalu goyangkan sebentar (1 menit) lalu buang, ulangi proses ini sampai tiga kali berturut-turut



Buka kemasan (D) KONJUGAT



Larutkan konjugat keringbeku dengan buffer Ten TC Konjugat secukupnya, kemudian diaduk dengan alat pengaduk, setelah larut, tuangkan kembali ke dalam buffer TEN TC Konjugat dan kocok. Kemudian tuangkan larutan tersebut ke dalam kotak uji biarkan 1 jam sambil digoyang sesekali lalu buang



Tuangkan sisa buffer PBST ke kotak uji sampai batas tera kotak uji, goyangkan sebentar (1 menit) lalu buang, ulangi proses ini sampai tiga kali berturut-turut



Buka kemasan (E) PEWARNA



Gunakan sarung tangan kembali dan penutup hidung



Buka kemasan E (Pewarna). Dengan pipet tetes tambahkan 1 ml PBS DAB ke dalam tabung Eppendorf berisi H₂O₂, kocok hingga larut, dan dengan pipet yang sama pindahkan ke dalam botol PBS DAB. Masukkan 1 tablet DAB ke dalam botol PBS DAB kocok hingga larut, lalu tuang ke kotak uji yang berisi kertas uji, kemudian digoyang. Bila muncul bercak berwarna cokelat kuat pada kertas uji (15 menit) berarti ada reaksi positif atau ada indikasi infeksi *Ganoderma* sp. Tampung larutan PBS DAB ke dalam plastik limbah. Tiriskan kertas uji pada kertas HVS beberapa menit.



Amati intensitas warna bercak pada kertas uji

PENGAMATAN HASIL UJI



Intensitas lemah ditemukan pada tanaman sehat



Intensitas sedang ditemukan pada tanaman yang tampak sehat, tetapi pada pangkal batang sudah terlihat gejala terserang



Intensitas kuat indikator ditemukan pada tanaman terserang berat

Konversi ke nilai kuantitatif:

Hasil pengamatan kuantitatif infeksi *Ganoderma* sp. dengan Ganokit dapat diamati dengan cara membandingkan proporsi angka *red* (merah), *green* (hijau) dan *blue* (biru) (RGB) pada foto hasil Ganokit dengan *Adobe Photoshop* versi CS3 tahun 2007.

Tabel 1 Pengamatan kuantitatif infeksi
Ganoderma sp.

| Indikasi Tanaman | Nilai RGB | | | Total RGB |
|---------------------|-----------|-------|------|--------------|
| | Red | Green | Blue | |
| Hijau | 130 | 101 | 89 | 320 |
| Kuning | 132 | 96 | 80 | 308 |
| Merah | 141 | 90 | 61 | 292 |
| Hitam | 140 | 94 | 70 | 304 |

Catatan :

1. Limbah dalam plastik penampung dituang ke dalam lubang tanah sedalam 20 cm yang berlokasi jauh dari sumber air dan pemukiman warga agar terjadi penguraian secara alami.
2. Untuk efisiensi pengujian, satu unit Gano Kit digunakan untuk 20 sampel sekaligus.

3. Karena volume botol vial antibody dan conjugate lebih kecil dari volume pelarut, maka pelarutan dilakukan secara bertahap sampai seluruh pelarut habis.

Daftar Pustaka

- Abdullah SN, F Alizader, N Ali, S Meon & A Senon (2010). Molecular & biochemical approach in *Ganoderma* research. Second International Seminar Oil palm Disease: Advance in *Ganoderma* Research & Management, 31 May 2010. Yogyakarta, Indonesia 14p. Indonesian Oil Palm Research Institute (IOPRI) & Malaysia Oil palm Board (MPOB).
- Widiastuti H, Suharyanto, F Novianti, A Wulaningtyas & Trisning (2011). Pengujian keefektifan teknik inokulasi *Ganoderma* sp. berdasarkan dot immunobinding assay (DIBA). *J. Pen. Kelapa Sawit* 19 (2), 72-82.

Nur-Ain-Izzati MZ & F Abdullah (2008). Disease suppression in *Ganoderma*-infected oil palm seedlings treated with *Trichoderma harzianum*. *Plant Protect Sci.* 44 (3):101-107.

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.

Sapak Z, S Meon, & ZM Ahmad (2008). Effect of endophytic bacteria on growth and suppression of *Ganoderma* sp. infection in oil palm. *International Journal of Agriculture & Biology* 10(2), 127-132.

Suharyanto & TW Darmono (1999). Detection basal stem rot disease of oil palm using polyclonal antibody. *Menara Perkebunan*, 67(1): 32-39.

Suharyanto, TW Darmono, Haryo Tejo Prakoso & Deden Dewantara Eris (2012). Perangkat deteksi dini infeksi *Ganoderma* sp. pada kelapa

sawit dengan teknik serologi. *Menara Perkebunan* 80 (1), 8-15

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.

(Penyusun : Suharyanto & Darmono Taniwiryo)