

RESPON HUMORAL SERANGGA *Trigona* Sp PASCA INFEKSI PATOGEN PENYEBAB PENYAKIT DARAH (BLOOD DISEASE) PADA TANAMAN PISANG

¹Maria Marselina Bay*, ²Tjandra Anggraeni

¹Program Studi Biologi, Fakultas Pertanian, Universitas Timor Kefamenanu

²Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jawa Barat 40123

Email: marselinabay@gmail.com

DOI: [10.46201/jsb/vol3i2pp95-101](https://doi.org/10.46201/jsb/vol3i2pp95-101)

Diterima: 26 Desember 2022 | Direvisi: 31 Desember 2022 | Diterbitkan: 31 Desember 2022

ABSTRAK

Trigona sp merupakan salah satu serangga pengunjung bunga pisang yang berperan sebagai vektor penyebar penyakit darah (blood disease) pada tanaman pisang yang disebabkan oleh bakteri blood disease bacterium. Interaksi *Trigona* sp dan blood disease bacterium dapat memicu aktifnya sistem pertahanan humoral tubuh serangga tersebut. Aktifnya respon humoral *Trigona* sp ditandai dengan sintesis enzim phenoloksidase (PO) dan sintesis peptida antibakteri (AMP). Tujuan penelitian untuk mengukur respon humoral serangga *Trigona* sp setelah terinfeksi patogen penyebab penyakit darah. Sistem pertahanan humoral serangga *Trigona* sp diukur dengan melihat aktifitas enzim PO dan sintesis peptida antibakteri (AMP). Infeksi BDB dilakukan secara oral infeksi dengan jumlah sel bakteri yang berbeda dan lama infeksi divariasikan yaitu 0 (kontrol), 4, 8, 12 dan 24 jam. Hasil penelitian, lama infeksi 4 jam jumlah PO yang dihasilkan yaitu 0,19 unit/mg protein pada infeksi jumlah sel bakteri 19×10^9 /ml. Lama infeksi 8 jam, jumlah PO yang dihasilkan sebanyak 0,33 unit/ mg protein pada infeksi jumlah sel bakteri 14.8×10^9 /ml. Lama infeksi 12 jam, jumlah PO yang dihasilkan yaitu 0,18 unit/mg protein pada infeksi dengan jumlah sel bakteri 9.5×10^9 /ml. Lama infeksi 24 jam, PO yang dihasilkan yaitu 0,25 unit/mg protein pada infeksi dengan jumlah sel bakteri 14.2×10^9 /ml. Uji aktifitas menunjukkan daya hambat sebesar 1,9 cm. Disimpulkan bahwa aktifnya respon humoral ditandai dengan meningkatnya unit PO dan sintesis peptida antibakteri yang ditandai dengan adanya zona hambat pada medium agar Tryphenil Tetrazolium Chloride (TZC).

Kata kunci: *Trigona* sp, Respon Humoral, Tanaman Pisang, Blood Disease Bacterium

ABSTRACT

Trigona sp known is one of the banana flower-visiting insects which then acts as a vector for transmission of blood disease in banana plants caused by bacteria blood disease bacterium. Interaction *Trigona* sp and blood disease bacterium can trigger active humoral defense system of the body of the insect. *Trigona* sp active humoral response characterized by the synthesis of enzymes phenoloksidase (PO) and the synthetis antibacterial peptide (AMP). This study aims to measure the humoral response of insects *Trigona* sp after blood infected with disease-causing pathogens. In this study the insect humoral defense system *Trigona* sp is measured by looking at PO enzyme activity and synthesis of antibacterial peptides (AMP). Infection BDB performed oral infection with a different bacteria cell number and duration of infection varied : 0 hours (control), 4 hours, 8 hours, 12 hours and 24 hours. The results showed an increase in activity units PO at any time of infection. Old infections 4 hours the amount of PO generated high of 0.19 units / mg protein in infected with bacterial cell count of 19×10^9 / ml. Old infections 8 hours, the highest number of PO generated as much as 0.33 units / mg protein produced by insect *Trigona* sp is infected with a bacterial cell number 14.8×10^9 / ml. Old infection 12 hours, the amount of PO generated high of 0.18 units / mg protein in infected with bacterial cell count 9.5×10^9 / ml. 24 hours old infection, PO highest generated 0.25 units / mg protein in infected with bacterial cell count 14.2×10^9 / ml. Test of antimicrobial activity of the extract supernatant *Trigona* sp tested by the method of pitting, indicating inhibition minimum of 1.9 cm. It can be concluded that bacterial BDB infection in insects *Trigona* sp can leads active humoral response, with

increased unit PO and antibacterial peptide synthesis characterized by inhibition zones on agar Tryphenil Tetrazolium Chloride (TZC).

Keywords: *Trigona sp, Response Humoral, Banana Plants, Blood Disease bacterium*

A. LATAR BELAKANG

Penyakit darah (Blood disease) pertama kali dilaporkan terjadi sekitar 80 tahun yang lalu di Sulawesi Selatan, Kepulauan Selayar (Eden-Green, 1994). Penyakit darah sangat mudah berkembang dan menyebar dengan cepat ke berbagai wilayah. Transmisi penyakit ini diduga dipercepat oleh aktivitas serangga pengunjung bunga tanaman pisang yang berpindah dari tanaman yang sakit ke tanaman yang sehat (Setyobudi & Hermanto, 2000). Serangga-serangga pengunjung bunga pisang yang telah dilaporkan diantaranya serangga-serangga dari ordo Hymenoptera (*Trigona sp*, *Apis dorsata*, *Apis cerana*), ordo Lepidoptera (*Erionota thrax*), ordo Diptera (*Cloropidae*, *Drosophilidae*). Ada pula dari ordo Blattaria (*Blatidae*) dan ordo Hemiptera (*N. viridula*) (Habazar dkk., 2013).

Salah satu serangga pengunjung bunga yang dilaporkan berpotensi untuk menyebarkan patogen penyebab penyakit darah (blood disease bacterium) adalah serangga *Trigona sp* (Hymneptera : *Apidae*), (Habazar dkk., 2013; Leiwakabessy, 1999). Serangga ini menyebarkan bakteri penyakit darah ketika mengunjungi bunga tanaman pisang yang sakit, lalu berpindah ke tanaman pisang yang sehat. Interaksi ini dapat menyebabkan terinfeksi serangga *Trigona sp* oleh blood disease bacterium (BDB). Dilaporkan bahwa infeksi bakteri BDB pada tubuh serangga *Trigona sp* tidak menyebabkan kematian (Habazar dkk., 2013).

Kesintasan serangga *Trigona sp* ketika terinfeksi bakteri BDB disebabkan karena adanya mekanisme pertahanan tubuh serangga. Sebagaimana kita ketahui bahwa setiap organisme memiliki sistem pertahanan tubuh terhadap benda-benda asing yang masuk ke dalam tubuhnya. Secara umum mekanisme pertahanan tubuh serangga terdiri dari sistem imunitas bawaan (innate immunity)

sebagai bentuk tanggapan awal terhadap infeksi, memediasi pengenalan benda asing dan mengaktifkan respon imun acquired pada vertebrata (Bidla dkk., 2005).

Mekanisme respon imun bawaan serangga dikelompokkan ke dalam dua kelas yaitu respon imun selular dan respon imun humoral. Respon imun humoral terdiri dari sintesis peptida antimikroba (AMP) yang akan disintesis oleh badan lemak ketika ada gangguan dari patogen (Hwang dkk., 2015) aktivasi prohenoloksidase, dan sintesis protein lektin. Respon imun selular ditandai dengan aktivasi sel-sel kekebalan serangga (hemosit). Sel-sel darah imunologis yang diaktifkan akan langsung membunuh patogen melalui proses seperti fagositosis, enkapsulasi dan nodulasi (Hwang dkk., 2015).

(Bidla dkk., 2005), menyatakan bahwa respon terbaik dari sistem kekebalan tubuh lalat buah *Drosophila melanogaster* adalah respon pertahanan humoral yang terdiri dari ekspresi yang cepat dari sejumlah besar peptida antimikroba. Phenoloksidase (PO) dalam respon pertahanan humoral merupakan proses yang berbeda dalam pembentukan bekuan pada tubuh serangga, melalui tahap-tahap yang berbeda yaitu penutupan luka dan penyembuhan luka, serta memproduksi sitotoksik yang membunuh bakteri.

Enzim phenoloksidase mengkatalisis sintesis melanin dari beberapa molekul prekursor termasuk L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). Hal ini telah ditunjukkan pada hemolimf dari banyak serangga, termasuk serangga model *Drosophila melanogaster* mengandung phenoloksidase yang terdapat dalam sel-sel darah khusus (hemosit). Pada serangga sintesis melanin telah dikaitkan dengan beberapa kunci proses biologis termasuk sklerotisasi dan penggelapan kutikula dan sayap. Melanisasi juga terlibat dalam respon

humoral serangga yaitu pada tahap pengenalan patogen asing, penyembuhan luka, melanotik enkapsulasi dan efek sitotoksik pada diri sendiri maupun pada jaringan dalam dirinya. Infeksi patogen BDB pada tubuh serangga *Trigona* sp juga dapat menyebabkan aktifnya mekanisme respon pertahanan tubuh, baik respon pertahanan selular maupun humoral. Respon pertahanan yang menjadi perhatian pada serangga *Trigona* sp ketika terinfeksi BDB adalah respon humoral yaitu aktivasi enzim phenoloksidase.

B. METODE PENELITIAN

Bahan Kimia

Lysis buffer 250, phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA), bovine serum albumin (BSA), phenylthiourea (PTU), buffer cacodilate, coomasie brilliant blue, etanol 95 %.

Serangga dan Bakteri

Serangga *Trigona* sp yang digunakan diperoleh dari Peternakan *Trigona* Kampung Cibeusi, Ciater Subang, Jawa Barat. Serangga kemudian dibiarkan dalam koloninya dan diberikan pakan alternatif berupa larutan sukrosa 5 % (Neyen dkk., 2014). Serangga dewasa yang kemudian digunakan dalam penelitian.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *blood disease bacterium* (BDB), yang berasal dari hasil isolasi pada tubuh serangga-serangga pengunjung bunga tanaman pisang yang sakit. Isolat bakteri lalu ditumbuhkan pada medium spesifik *Tryphenil Tetrazolium Chloride* (TZC). Penumbuhan bakteri dilakukan dengan penggerak konstan selama 24 jam.

Mekanisme Infeksi Serangga Uji

Infeksi patogen (BDB) mengacu pada metode infeksi yang dilakukan pada penelitian *Drosophila* immunity, (Neyen dkk., 2014) dimana infeksi patogen mikrobial dilakukan melalui oral infeksi. Kultur bakteri BDB dinormalisasi pada OD600 = 2,65 menggunakan

spectrofotometer. Sebelum menginfeksi bakteri pada serangga, serangga dewasa dipuasakan selama 2-3 jam. Jumlah serangga yang digunakan untuk setiap perlakuan adalah 7 ekor. Jumlah sel bakteri yang digunakan : 0 bakteri/ml (kontrol), P1: 19×10^9 , P2: 14.3×10^9 , P3: 9.5×10^9 , P4: 4.8×10^9 . Lama infeksi serangga *Trigona* sp oleh bakteri BDB divariasikan yaitu : 4, 8, 12 dan 24 jam.

Pengumpulan Hemolimf

Sampel hemolimf dalam penelitian ini diperoleh dengan cara, serangga *Trigona* sp yang telah terinfeksi bakteri BDB digerus lalu ditambahkan buffer lysis 250, dimana didalam buffer lysis terdapat inhibisi protease berupa PMSF. Selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000rpm pada suhu 40 C sehingga diperoleh lisat supernatan dan pellet. Lisat supernatan yang dihasilkan kemudian digunakan untuk mengamati aktifitas phenoloksidase dan peptida antimikroba.

Aktifitas Phenoloksidase

Aktivitas PO diamati dengan menggunakan substrat L-Dihydroxyphenilalanine (L-DOPA) (Anggraeni & Putra, 2011), dengan menggunakan metode spot test. Sediaan perlakuan dan kontrol diperoleh dari 30 μ L lisat supernatant hemolimf ditambah 50 μ L buffer cacodilate, dikocok menggunakan vortex, diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruangan. Untuk sediaan perlakuan ditambahkan 50 μ L laminarin untuk mengaktifkan PPO, lalu diinkubasi 5 menit dalam suhu ruangan. Baik .pada sampel perlakuan dan kontrol selanjutnya ditambahkan 25 μ L L-DOPA untuk berikatan dengan PO, diinkubasi selama 5 menit. Sebagai blanko digunakan ekstraksi hemolimf seperti sediaan kontrol dengan lisat supernatant yang digantikan dengan aquades.

Aktifitas peptida antimikroba

Supernatan di tambah dengan propiltiourasil (PTU) kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. 10 μ L sampel supernatant hemolimf dan aquades steril sebagai pembanding,

diteteskan pada agar untuk kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Media padat nutrient agar dibentuk sumuran-sumuran menggunakan alat pelubang. Jarak diatur sedemikian rupa antara sumuran yang satu dengan yang lain. Media tersebut kemudian diinokulasikan dengan bakteri. Pada sumuran nutrien agar tersebut lalu diberi ekstrak supernatan hemolimf. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji zona inhibisi dilakukan pada medium agar yang telah diinokulasi dengan bakteri BDB.

Analisis data

Analisis data unit aktifitas phenoloksidase (PO)

Analisis kandungan phenoloksidase (PO) dilakukan dengan menggunakan microplate reader terhadap sediaan perlakuan dan sebagai blanko digunakan ekstraksi hemolimf seperti halnya pada sediaan kontrol dengan lisat supernatant yang digantikan dengan aquades. Absorbansi warna diukur pada panjang gelombang A490, setelah inkubasi 30 menit, 60 menit, 90 menit, 120 menit, dan 150 menit. Aktivitas PO didefinisikan sebagai jumlah yang menyebabkan naiknya absorbansi dari 0,01/menit dalam campuran reaksi. Jumlah unit aktivitas phenoloksidase diukur sebagai berikut (Melanie, 2008) :

$$\text{Unit Aktifitas} = \frac{\text{Angka yang terbaca pada biorad}}{\text{Jumlah Protein}}$$

Jumlah Protein = ukuran cairan (30µL) x konsentrasi protein

Analisis Bradford

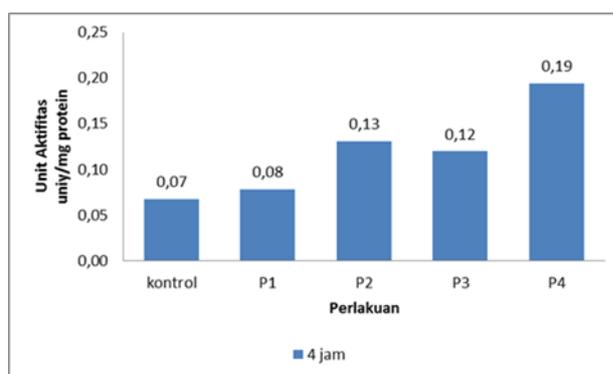
Jumlah protein pada supernatant hemolimf dideterminasi menurut metode Bradford (1976) dengan menggunakan larutan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai standar (Melanie, 2004).

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

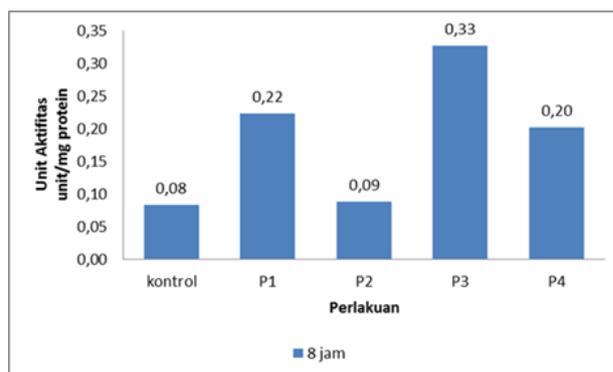
Unit aktivitas phenoloksidase

Prophenoloksidase (PPO) dideteksi dengan melihat bentuk aktifnya yaitu phenoloksidase (PO). Hasil pengamatan aktifitas PO serangga *Trigona sp* yang

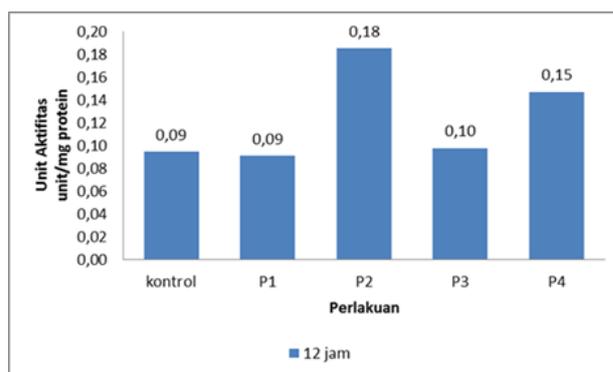
terinfeksi bakteri BDB selama 4, 8, 12 dan 24 jam menunjukkan terjadi peningkatan unit aktifitas PO yang terlihat selama 2,5 jam waktu pengamatan. Peningkatan PO terjadi untuk setiap jumlah sel yang diinfeksi pada serangga *Trigona sp*. Jumlah sel yang diinfeksi berpengaruh terhadap meningkatnya unit aktifitas PO ($P < 0,05$) pada lama infeksi 4-24 jam. Peningkatan unit aktifitas PO selama 2,5 jam waktu pengamatan dapat dilihat pada gambar 1.



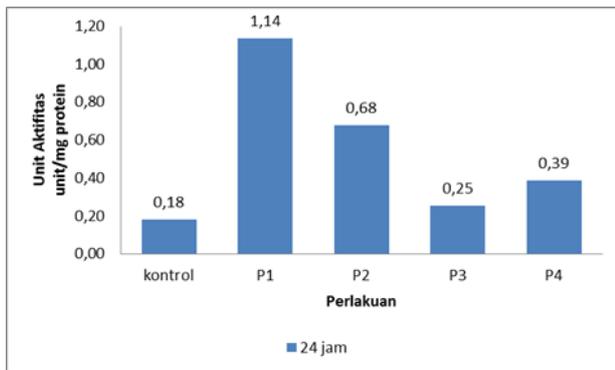
Gambar 1. Peningkatan aktifitas PO (lama infeksi 4 jam)



Gambar 2. Peningkatan aktifitas PO (lama infeksi 8 jam)



Gambar 3. Peningkatan aktifitas PO (lama infeksi 12 jam)



Gambar 4 Peningkatan unit aktifitas PO (lama infeksi 24 jam)

Aktifitas Peptida Antimikroba

Hasil pengamatan aktifitas antimikroba supernatan hemolimf *Trigona* sp menunjukkan aktifitas antibakteri ditemukan pada *Trigona* sp. Aktifitas antibakteri ditandai dengan adanya zona bening pada media agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri BDB. Luas zona hambat yang dihasilkan adalah 1,9 cm. Adanya aktifitas antibakteri ini menunjukkan bahwa ada infeksi lanjutan pada serangga *Trigona* sp ketika terinfeksi oleh BDB.



Gambar II. Zona hambat bakteri BDB

Lama masa infeksi patogen BDB pada tubuh serangga *Trigona* sp, diketahui mempengaruhi peningkatan aktifitas PO. Data yang dikumpulkan selama 2,5 jam waktu pengamatan, menunjukkan adanya peningkatan yang terjadi pada aktifitas PO dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan PO tidak dipengaruhi oleh banyaknya jumlah sel bakteri yang diinfeksi pada serangga *Trigona* sp. Misalnya pada lama infeksi 4 jam terlihat bahwa jumlah PO yang dihasilkan pada infeksi dengan jumlah sel bakteri 19×10^9 /ml lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah sel bakteri lainnya yang diberikan pada serangga *Trigona* sp. Jumlah unit aktifitas PO yang dihasilkan sebanyak 0,19 unit/mg protein.

Lama infeksi 8 jam, jumlah PO tertinggi sebanyak 0,33 unit/ mg protein dihasilkan oleh serangga *Trigona* sp yang diinfeksi dengan jumlah sel bakteri $14,8 \times 10^9$ /ml. Jumlah PO tertinggi dihasilkan oleh *Trigona* sp yang diinfeksi bakteri BDB yaitu infeksi dengan jumlah sel bakteri $9,5 \times 10^9$ /ml pada lama masa infeksi 12 jam dengan jumlah unit aktifitas PO 0,18 unit/mg protein, sedangkan pada lama infeksi 24 jam, jumlah PO tertinggi yaitu ketika serangga *Trigona* sp diinfeksi dengan jumlah sel bakteri $14,2 \times 10^9$. Jumlah unit aktifitas PO sebanyak 0,25 unit/mg protein Hasil yang diperoleh ini menunjukkan bahwa masing-masing jumlah sel bakteri yang diinfeksi memberi respon yang sama terhadap meningkatnya aktifitas PO.

Pada Arthropoda, PO selalu hadir dalam keadaan tidak aktif yang kemudian akan diaktifkan oleh Prophenoloksidase Activating System (PA system). PA sistem merupakan rangkaian enzimatik yang berperan dalam mengubah prophenoloksidase menjadi phenoloksidase. PA sistem berperan sebagai perantara pengenalan benda asing, pembentukan melanin dengan cara oksidasi fenol menjadi quinon, menyebabkan opsonisasi, koagulasi, aktivitas fungisidal dan bakterisidal. Perubahan PPO menjadi PO pada keadaan in vitro, dapat diperantarai oleh bermacam agen atau perlakuan, termasuk lipid, larutan organik, protease dan oleh aktivator pada hemolimf atau pada kutikula (Anggraeni & PUTRA, 2011)

Selain aktifnya enzim PO serangga *Trigona* sp sebagai respon terhadap infeksi BDB, serangga ini juga mensintesis peptida antibakteri. Secara umum, protein antibakteri akan diinduksi setelah bakteri diinjeksikan atau pada waktu infeksi secara alami dan juga dipengaruhi oleh variasi dalam gen dan dalam spesies itu sendiri (Anggraeni & PUTRA, 2011). Dalam penelitian ini, peptida antibakteri yang dihasilkan oleh serangga *Trigona* sp belum diketahui secara pasti jenisnya, namun hasil pengamatan zona bening yang dihasilkan pada media agar yang diinokulasikan dengan bakteri BDB menunjukkan bahwa ada peptida antimikroba yang dihasilkan

sebagai tanggapan terhadap infeksi bakteri BDB. Hasil ini menunjukkan bahwa infeksi alami pada serangga *Trigona* sp, menyebabkan dihasilkannya peptida antimikroba. Peptida yang dihasilkan ini dapat melindungi *Trigona* sp dari kematian akibat infeksi bakteri BDB.

Hasil yang sama ditunjukkan pada *Sarcophaga peregrina*, dimana injeksi bakteri *Escherichia coli* menghasilkan sarcotoxin II dengan konsentrasi yang tinggi setelah 24 jam infeksi (Anggraeni & PUTRA, 2011). Aktifitas plasma lysozyme yang sama dengan aktifitas antibakteri yang berperan dalam proses inaktivasi bakteri juga ditemukan pada *Galleria mellonella* setelah terinfeksi *Bacillus thuringiensis* (Grizanova dkk., 2014).

Serangga yang terinfeksi dengan bakteri atau jamur akan mengekspresikan peptida antimikroba yang berbeda yang membuktikan bahwa mereka memiliki lebih dari satu jalur immunoregulator. Jalur-jalur ini akan menanggapi aktivator yang berbeda dan mengatur pengaturan berbagai subset dan respon gen (Dushay dkk., 2000). Sistem antibakteri juga dapat melindungi organisme dari mikroflora yang bersimbiosis dengan usus (Grizanova dkk., 2014).

KESIMPULAN

Infeksi patogen BDB pada serangga *Trigona* sp melalui sistem oral infeksi pada penelitian ini, memicu aktifnya respon humoral yang ditandai dengan meningkatnya aktifitas PO pada setiap waktu infeksi yang diberikan dan juga sintesis peptida antibakteri yang ditandai dengan adanya zona hambat yang dihasilkan pada media agar.

TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB dan Direktorat Jenderal dan Pendidikan Tinggi (DIKTI)

DAFTAR PUSTAKA

Anggraeni, T. & PUTRA, R.E. 2011. Cellular and humoral immune defenses of *Oxya japonica* (Orthoptera: Acrididae) to entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. *Entomological Research*, 41(1): 1–6.

Bidla, G., Lindgren, M., Theopold, U. & Dushay, M.S. 2005. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Developmental & Comparative Immunology*, 29(8): 669–679.

Dushay, M.S., Roethele, J.B., Chaverri, J.M., Dulek, D.E., Syed, S.K., Kitami, T. & Eldon, E.D. 2000. Two attacin antibacterial genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 246(1): 49–57.

Eden-Green, S.J. 1994. INIBAP Musa Disease Fact Sheet No. 3. Banana Blood Disease.

Grizanova, E.V., Dubovskiy, I.M., Whitten, M.M.A. & Glupov, V.V. 2014. Contributions of cellular and humoral immunity of *Galleria mellonella* larvae in defence against oral infection by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of invertebrate pathology*, 119: 40–46.

Habazar, T., Hasyim, A. & Nasir, N. 2013. Potensi *Trigona* Spp. Sebagai Agen Penyebar Bakteri *Ralstonia Solanacearum* Phylotipe IV Penyebab Penyakit Darah Pada Tanaman Pisang. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 12(1): 92–101.

Hwang, S., Bang, K., Lee, J. & Cho, S. 2015. Circulating hemocytes from larvae of the Japanese rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the cellular immune response to microorganisms. *PLoS one*, 10(6): e0128519.

Neyen, C., Bretscher, A.J., Binggeli, O. & Lemaitre, B. 2014. Methods to study *Drosophila* immunity. *Methods*, 68(1): 116–128.

Setyobudi, L. & Hermanto, C. 2000. Rehabilitation of cooking banana farms: base line status of banana disease bacterium (BDB) distribution in Sumatra. Advancing banana and plantain R & D in Asia and the Pacific. Proceedings of the 9th INIBAP-ASPNET Regional Advisory Committee meeting held at South China Agricultural University, Guangzhou, China, 2-5 November 1999. INIBAP-ASPNET, hlm.117–120.