

# **Deteksi Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) Dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Daun Tanaman Jeruk Yang Memiliki Pola Gejala Klorosis Berbeda**

RIDA MELANI  
WAYAN ADIARTAYASA\*)  
I NYOMAN WIJAYA

Program Studi Agroekoteknologi Pertanian Universitas Udayana  
Jl. PB. Sudirman Denpasar 80231 Bali

\*)Email: adiartayasaw@gmail.com

## **ABSTRACT**

### ***Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) Disease Detection With *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Technique In Citrus Plant Leaves That Have Different Chlorosis Symptom Patterns**

Detection of *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) disease with Polymerase Chain Reaction (PCR) on citrus leaves that have different pattern of chlorosis symptoms was conducted at laboratory of Genetic Resources and Biology Molecular, Udayana University. This study aims to determine the presence of *Liberibacter asiaticus* in citrus leaves that have different patterns of chlorosis symptoms using a specific primer 16S rDNA (OI1 and OI2c). DNA amplified on 1% agarose gel obtained DNA bands of 1160 bp on four samples with a pattern of symptoms of chlorosis.

*Keywords:* CVPD, *Liberibacter asiaticus*, Pattern of Chlorosis Symptoms, PCR

## **1. Pendahuluan**

Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour) merupakan salah satu buah yang sering ditemui di pasar tradisional. Buah jeruk siam digemari oleh masyarakat sebagai buah segar maupun olahan. Khususnya di Bali buah jeruk siam selain digunakan untuk konsumsi, juga digunakan dalam upacara agama Hindu. Salah satu kendala dalam budidaya jeruk yaitu penyakit *Huanglongbing* atau yang lebih dikenal di Indonesia penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD). Menurut Jagoueix *et al.* (1996), penyakit CVPD pada pertanaman jeruk disebabkan oleh bakteri gram negatif *Liberibacter asiaticus*. Luas panen jeruk di Indonesia berfluktuasi selama periode 1970-2012, ditengarai sebagai akibat masih tingginya angka kematian tanaman jeruk. Nurhadi (2005), menyatakan produksi jeruk di 33 provinsi pada periode 2008-2012 mengalami penurunan kecuali Jawa Timur, Bali, Kalimantan Barat, dan Kalimantan

Selatan. Penyakit CVPD masih prevalen dan menjadi ancaman serius terhadap keberlanjutan pengusahaan jeruk di berbagai provinsi.

Gejala penyakit CVPD yaitu klorosis atau daunnya menguning, warna tulang daun menjadi hijau tua, daunnya lebih tebal, kaku dan ukurannya menjadi lebih kecil (Wijaya, 2003). Menurut Putra *dkk.* (2013), secara morfologi di Kecamatan Kintamani didapatkan sembilan jenis jeruk yaitu jeruk siam, selayar, besakih, tejakula, manis, nipis, purut, lemo, dan jeruk bali, pada masing-masing jenis tanaman jeruk memiliki variasi gejala klorosis dari ringan sampai berat. Menurut Meitayani *dkk.* (2014), gejala serangan penyakit CVPD pada daun tanaman jeruk selayar dan siam menunjukkan gejala klorosis yang bervariasi di Desa Katung, Belancan, Bayung Gede, Awan, Catur, Pengotan, Petang dan Pelaga. Menurut Putra *dkk.* (2016), gejala klorosis ditemukan pada daun tanaman jeruk siam dan jeruk selayar di Dusun Untalan dengan persentase tanaman terserang penyakit CVPD berkisar antara 19% sampai dengan 37%. Hasil rata-rata persentase tanaman jeruk yang menunjukkan gejala serangan CVPD sebesar 27%. Menurut Nurhayati *dkk.* (2016), kandungan klorofil daun tanaman jeruk  $\leq 47,06$  SPAD dapat digunakan sebagai dasar untuk mendiagnosa penyakit CVPD pada tanaman jeruk, serta menurut Himawan *dkk.* (2010), gejala klorosis pada daun jeruk siam yang terserang CVPD dikelompokkan menjadi delapan tipe klorosis.

Berdasarkan pertimbangan adanya variasi gejala klorosis pada daun tanaman jeruk yang diduga terserang penyakit CVPD, maka diperlukan deteksi patogen penyebab CVPD dengan menggunakan teknik molekuler oleh karena itu peneliti tertarik melakukan penelitian deteksi penyakit CVPD dengan teknik PCR pada daun tanaman jeruk yang memiliki pola gejala klorosis berbeda.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biologi Molekuler, Universitas Udayana, Denpasar. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Desember 2016 sampai dengan bulan Februari 2017.

### 2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar, *ependorf tube*, *water bath*, mesin PCR, seperangkat alat elektroforesis (BioRad), mikrosentrifuse, *UV transilluminator*, *microwave*, pipet mikro, kertas parafilm, *GD Column*, *collection tube*, *filter column*, timbangan analitik, alat *vortex*, *erlenmeyer*, alat inkubasi, plastik, kertas label, kamera, sarung tangan *latex*, spatula, dan alat tulis.

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sampel tanaman jeruk dengan pola gejala penyakit CVPD pada daun jeruk siam, *aquadest*, *agarose* 1g, TAE 100ml, *liquid nitrogen*, *Kit* Isolasi DNA menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Plant)*, *PCR master mix solution*, *Marker DNA 1 kb ladder*, *Etidium Bromida*, *loading dye* dan sepasang *primer* spesifik 16S rDNA untuk mendeteksi keberadaan

bakteri *Liberibacter asiaticus* yaitu *Forward Primer* OI1 5' GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG C 3' dan *Reverse Primer* OI2 5' GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T 3' DNA yang teramplifikasi dengan *primer* tersebut berukuran 1160bp.

### 2.3 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian diawali dengan pengamatan pada daun jeruk Siam yang memiliki pola gejala berbeda yang diduga terserang penyakit CVPD dari berbagai umur tanaman yang ada di lahan petani jeruk Siam di Desa Mangguh, Kecamatan Kintamani. Sampel daun dipilih dari jumlah pola gejala klorosis yang ada dipertanaman, kemudian didapatkan lima sampel daun jeruk Siam yang memiliki pola gejala klorosis yang ditemukan dipertanaman. Selanjutnya, sampel dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi DNA dan deteksi dengan PCR.

### 2.4 Deteksi Daun Tanaman Jeruk

Daun tanaman jeruk siam yang menunjukkan pola gejala klorosis berbeda dideteksi dengan teknik PCR melalui tahapan isolasi DNA total, amplifikasi DNA, dan visualisasi hasil PCR.

#### A. Isolasi Total DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Plant)*. Sampel tulang daun 1g digerus menggunakan *liquid nitrogen* setelah halus masukkan ke dalam *ependorf tube*. Tahap lisis dilakukan dengan mencampurkan 400 µl buffer *GPI* dan 5 µl RNase A untuk mendegradasi RNA kontaminan di *tube* lain, kemudian dihomogenkan dan dimasukkan *tube* sampel. Suspensi diinkubasi 60°C selama 15 menit dan divortex setiap 5 menit (pada waktu yang sama diinkubasi pula *Elution buffer*). Setelah inkubasi ditambahkan 100 µl buffer *GP2* lalu divortex dan diinkubasi dalam es selama 3 menit. Sampel dimasukkan *filter column* yang telah dipasang *collection tube*, kemudian disentrifugasi 1000 x g selama 1 menit. *Filter column* dibuang dan supernatan pada *collection tube* dipindahkan ke dalam tube baru. Pada tahap pengikatan DNA, sampel ditambah *GP3* sebanyak 1,5 volume sampel yang diperoleh dan divortex sampai homogen. 700 µl dari campuran dipindahkan ke dalam *GD column* yang telah dipasang *collection tube*, perlakuan diulangi jika masih ada sisa campuran pada tube. Sampel disentrifugasi 15.500 x g selama 2 menit. *Flow through* dibuang dan *GD column* dipasang kembali ke *collection tube*. Untuk proses pencucian, 400 µl buffer *WI* dimasukkan ke *GD column*, kemudian disentrifugasi 15.000 x g selama 1 menit. *Flow through* dibuang dan *GD* dipasang lagi ke *collection tube*. Pencucian selanjutnya 600 µl *Wash Buffer* dimasukkan ke *GD column* dan disentrifugasi 15.000 x g selama 1 menit. *Flow through* dibuang dan, pasang lagi *GD column* ke *collection tube* lalu disentrifugasi 15.000 x g selama 3 menit untuk proses pengeringan. Kemudian dimasukkan 50 µl *Elution buffer* (yang telah diinkubasi sebelumnya) tepat di tengah ring dan dibiarkan 5 menit, kemudian disentrifugasi 15.000 x g selama 1 menit, kemudian didapatkan hasil isolasi DNA (Geneaid, 2015). Hasil isolasi yang telah didapatkan kemudian di

elektroforesis pada gel agarose 1% untuk mengetahui ada tidaknya DNA total, apabila sudah diketahui adanya DNA total maka dilanjutkan dengan amplifikasi DNA.

### **B. Amplifikasi DNA**

Analisis PCR untuk mendeteksi keberadaan penyakit CVPD dilakukan dengan menggunakan primer spesifik dari 16S rDNA, Forward Primer OI1 (5' GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG C 3') dan Reverse Primer OI2c (5' GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T 3'). DNA hasil isolasi diamplifikasi sebanyak 10 $\mu$ l dengan teknik PCR. Reaksi PCR terdiri dari 1 $\mu$ l DNA sampel, 1 $\mu$ l *forward primer*, dan 1 $\mu$ l *reverse primer*, 5 $\mu$ l *PCR master mix solution*, dan *free water* 2 $\mu$ l. Amplifikasi DNA dilakukan sebagai berikut: a) Perlakuan awal pada suhu 92<sup>0</sup> C selama 30 detik dengan satu siklus ulangan, b) Empat puluh siklus yang terdiri atas pemisahan utas DNA (*Denaturasi*) pada suhu 92<sup>0</sup>C selama 60 detik, c) Penempelan primer pada DNA (*Anearling*) pada suhu 60<sup>0</sup>C selama 30 detik. d) Sintesis DNA (*Elongation*) pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 90 detik. e) Penyesuaian utas atas dan bawah (*Extension*) pada suhu 72<sup>0</sup> C selama 90 detik dengan satu siklus ulangan.

### **C. Visualisasi Hasil PCR**

Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada gel agarose 1%, untuk mengetahui hasil visual PCR. Gel agarose dibuat dengan 1g agarose dan 100 ml TAE kemudian dipanaskan menggunakan *microwave* selama 2-3 menit sampai larut. Setelah tercampur larutan tersebut didiamkan hingga suhunya hangat, larutan dituangkan pada cetakan dan ditunggu sampai agar padat. Gel agarose yang sudah padat kemudian dipindahkan pada alat elektroforesis. Produk PCR sebanyak 2 $\mu$ l dan DNA marker sebanyak 1 $\mu$ l dimasukkan ke dalam sumuran yang telah disiapkan pada gel agarose. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama 30 menit, selanjutnya direndam didalam *etidium bromide* selama 15 menit lalu divisualisasi dengan UV *Transilluminator*.

## **3. Hasil dan Pembahasan**

### **3.1 Gejala Penyakit CVPD**

Hasil pengamatan secara visual pada areal pertanaman jeruk Siam di Desa Mangguh, Kecamatan Kintamani, didapatkan lima pola gejala klorosis pada daun tanaman jeruk yang mempunyai gejala berbeda, diantaranya pola a, pola b, pola c, pola d, dan pola e (Gambar 1). Gejala yang tampak pada sampel adalah sebagai berikut:

- a. Pola a yaitu, gejala klorosis tampak secara merata dengan lamina daun menguning dan tulang daun agak kuning (Gambar 1 a.1). Gejala klorosis tampak jelas pada pucuk tanaman (Gambar 1 a.2) dan gejala klorosis pada pohon, tampak beberapa pucuk menunjukkan gejala (Gambar 1 a.3).
- b. Pola b yaitu, tampak gejala klorosis pada lamina daun menguning tidak seperti pola a dan tulang daun berwarna hijau tua, serta tampak kontras antara warna lamina daun dengan tulang daun (Gambar 1 b.1), pola b ini sesuai dengan

- gejala yang ditunjukkan dalam penelitian Himawan *dkk.* (2010). Gejala klorosis tampak jelas pada pucuk tanaman (Gambar 1 b.2), dan gejala klorosis pada pohon tampak beberapa pucuk menunjukkan gejala (Gambar 1 b.3).
- c. Pola c yaitu, gejala klorosis tampak jelas pada lamina tetapi dominan hijau muda mulai dari tepi daun dan tulang daun tampak hijau tua (Gambar 1 c.1). Gejala klorosis tampak jelas pada pucuk tanaman (Gambar 1 c.2), dan gejala klorosis pada pohon tampak beberapa pucuk menunjukkan gejala (Gambar 1 c.3).
  - d. Pola d yaitu, gejala klorosis tampak ringan, pada lamina dan tulang daun berwarna hijau tampak tidak kontras (Gambar 1 d.1), pola d ini sesuai dengan gejala yang ditunjukkan dalam penelitian Himawan *dkk.* (2010). Gejala klorosis tampak jelas pada pucuk tanaman (Gambar 1 d.2), dan gejala klorosis pada pohon tampak beberapa pucuk menunjukkan gejala (Gambar 1 d.3).
  - e. Pola e yaitu, tampak gejala klorosis mulai dari pangkal daun sampai 2/3 tulang daun dan selebihnya masih berwarna hijau, warna tulang daun hampir sama dengan lamina (Gambar 1 e.1). Gejala klorosis tampak jelas pada pucuk tanaman (Gambar 1 e.2), dan gejala klorosis pada pohon tampak beberapa pucuk menunjukkan gejala (Gambar 1 e.3).

Putra *dkk.* (2013), melaporkan bahwa di Kecamatan Kintamani didapatkan sembilan jenis tanaman jeruk dengan gejala penyakit CVPD secara visual pada masing-masing tanaman jeruk memiliki variasi gejala klorosis dari ringan sampai berat serta menurut Meitayani *dkk.* (2014), gejala serangan penyakit CVPD pada daun tanaman jeruk di lokasi berbeda menunjukkan gejala yang bervariasi. Wirawan *dkk.* (2004), menemukan bahwa ada dua molekul protein khas pada tanaman yang terserang penyakit CVPD, diduga protein ini merupakan protein virulen (toksin) dari bakteri *L. asiaticum* dan protein reseptor dari tanaman jeruk. Interaksi kedua molekul protein ini mempengaruhi transport ion ke dalam sel tanaman jeruk sehingga menyebabkan tanaman kekurangan mineral Zn, Mn, Ca, dan muncul gejala serangan penyakit CVPD.

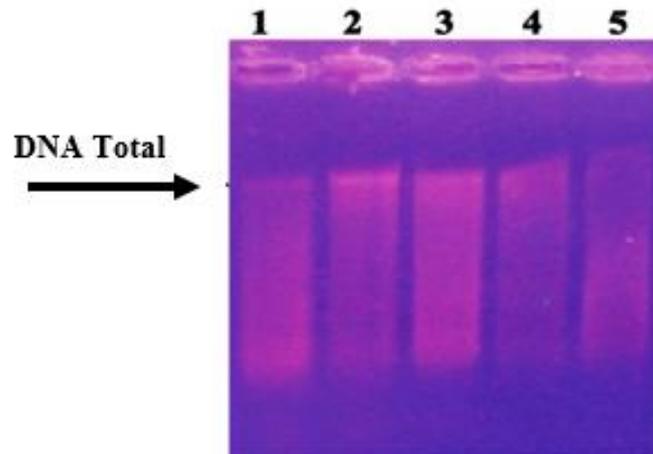


Keterangan : 1. Gejala pada daun, 2. Gejala pada pucuk, 3. Kondisi pertanaman

Gambar 1. Gejala Penyakit CVPD pada Daun Tanaman Jeruk Berdasarkan Pola Klorosis.

### 3.2 Isolasi Total DNA Tanaman

Hasil isolasi DNA pada daun tanaman jeruk didapatkan total DNA. Total DNA adalah seluruh DNA yang terkandung dalam tanaman. Hasil isolasi total DNA tanaman dielektroforesis menggunakan gel agarose 1% tampak pita DNA pada kolom 1, 2, 3, 4, 5. Adanya pita DNA pada hasil elektroforesis menunjukkan total DNA daun tanaman jeruk sudah terisolasi. Berikut hasil elektroforesis total DNA daun tanaman jeruk dapat dilihat pada (Gambar 2).



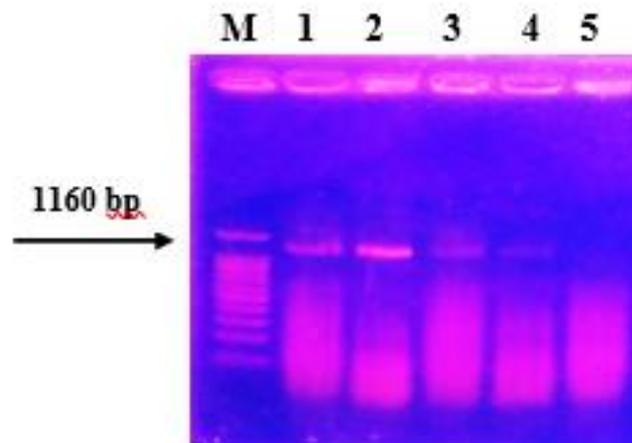
Gambar 2. Hasil Elektroforesis Gel Agarose 1% Daun Jeruk Siam

Keterangan: 1 = Pola a, 2 = Pola b, 3 = Pola c, 4 = Pola d, 5= Pola e

Total DNA tanaman yang terisolasi kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR. Menurut Ohtsu, *et al.*, (2002) bakteri *L. asiaticum* masih belum dapat dikultur sehingga tidak memungkinkan untuk mengisolasi DNANYA saja, maka dilakukan pendekatan dengan isolasi total DNA tanaman yang diinginkan untuk dideteksi. Taylor (1993), menyatakan dalam tahapan amplifikasi dengan teknik PCR diperlukan kualitas DNA template yang baik dan program yang sesuai.

### 3.3 Amplifikasi Total DNA dengan Teknik PCR

Hasil DNA teramplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik 16S rDNA, OI1 (*forward*) dan OI2c (*reverse*) dielektroforesis pada gel agarose 1% ditemukan pita DNA dengan ukuran 1160bp pada kolom 1, 2, 3, dan 4 (Gambar 4.3), hal itu berarti empat sampel tersebut mengandung bakteri *L. asiaticus*. Berdasarkan hasil amplifikasi PCR tersebut sampel yang positif mengandung bakteri *L. asiaticus* ditemukan pada pola a, pola b, pola c, dan pola d. Terdeteksinya bakteri *L. asiaticus* pada 4 sampel dari penelitian ini menunjukkan bahwa pola gejala klorosis pada daun tanaman jeruk Siam yang terserang penyakit CVPD berbeda-beda. Sedangkan, pita DNA 1160bp tidak ditemukan pada kolom 5 yaitu sampel e, maka sampel tersebut negatif bakteri *L. asiaticus*. Hal ini diduga penyebab menguningnya daun seperti gejala CVPD mungkin dikarenakan kekurangan unsur hara atau diserang organisme pengganggu lainnya.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis DNA Teramplifikasi pada Gel Agarose 1%  
Keterangan: M= DNA Marker; 1 = Pola a; 2 = Pola b; 3 = Pola c; 4 = Pola d; 5 = Pola e.

Menurut Wirawan *dkk.* (2003), yang menyatakan bahwa tidak semua daun-daun pada ranting yang menunjukkan gejala serangan CVPD positif mengandung bakteri *L. asiaticus*. Dapat terjadi daun bagian atas positif mengandung bakteri sedangkan daun bagian bawahnya negatif. Wirawan *dkk.* (2003), juga menyatakan bahwa penemuan ini menunjukkan bahwa tidak diperlukan adanya patogen pada bagian daun tanaman untuk memunculkan gejala penyakit atau dengan kata lain patogen yang berada pada daun tanaman lain dapat menyebabkan munculnya gejala pada daun disebelahnya atau diatas dan dibagian bawahnya.

#### 4. Simpulan dan Saran

##### 4.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Hasil pengamatan secara visual gejala pada daun tanaman jeruk Siam yang diduga terserang penyakit CVPD didapatkan lima pola gejala klorosis.
2. Hasil DNA teramplifikasi dengan teknik PCR pada gel agarose 1% didapatkan empat pola gejala klorosis positif terhadap bakteri *L. asiaticus*.
3. Dari lima pola gejala klorosis didapatkan empat pola gejala klorosis yang terserang penyakit CVPD yang dapat digunakan sebagai dasar identifikasi penyakit CVPD.

##### 4.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui penyebab pasti gejala klorosis pola e.

**Daftar Pustaka**

- Geneaid. 2015. Genomic DNA Mini Kit (Plant) Ver.07.16.15. <http://www.geneaid.com> (Diakses pada tanggal 20 Desember 2016).
- Himawan, A., Yohanes, B.S., Suasanto, S., Yohanes, A.T., dan Andrew, B. 2010. Deteksi Menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) *Candidatus Liberibacter Asiaticus*, Penyebab *Huanglongbing* Pada Jeruk Siem Dengan Beberapa Tipe Gejala Pada Daun. HPT Tropika, Vol. 10, No. 2, 2010.
- Jagoueix, S., Bove J.M., dan Garnier, M. 1996. *PCR Detection Of The Two Liberobacter Species Associated With Greening Disease Of Citrus*. Molecular and Cellular Probes 10: 43-50.
- Meitayani, N.P.S., W. Adiartayasa, dan I.N. Wijaya. 2014. Deteksi Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Tanaman Jeruk di Bali. E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika, Vol. 3, No. 2, April 2014
- Nurhadi. 2015. Penyakit *Huanglongbing* Tanaman Jeruk (*Candidatus Liberibacter Asiaticus*) Ancaman Dan Strategi Pengendalian. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika.
- Nurhayati, I., W. Adiartayasa, dan I.G.N. Bagus. 2016. Deteksi Keberadaan Penyebab Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) secara Molekuler pada Tanaman Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour var. *microcarpa* Hassk) berdasarkan Variasi Gejala Klorosis. E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika, Vol. 5, No. 4, Oktober 2016
- Ohtsu, Y., Prommintara, M., M. Okuda, S., Goto, T., Kano, T., Nakhasima, K., M. Imada, J., and Kawasima, K. 2002. *Partical Purification of the Thai Isolate of Citrus huanglongbing (greening) Bacterium and Antiserum Production for Serological Diagnosis*. J. Gen. Plant Pathol. 68: 372-377.
- Putra, G.P.D., W. Adiartayasa., dan M. Sritamin. 2013. Aplikasi Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Terhadap Variasi Gejala Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) pada Beberapa Jenis Daun Tanaman Jeruk. E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika, Vol. 2, No. 2, April 2013
- Putra, I.K.P., W. Adiartayasa., dan I.M.M. Adnyana. 2016. Deteksi Keberadaan Penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) dengan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) di Dusun Untalan Desa Jungutan Kecamatan Bebandem Kabupaten Karangasem. E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika, Vol. 5, No. 4, Oktober 2016
- Taylor, G.R. 1993. *Polymerase Chain Reaction. Basic Principles and Automation. Dalam PCR A Practical Approach. Editors: J.M Mc Pherson; Quirke and G.R. Taylor. Oxford. Oxford University Press.*
- Wijaya, I.N. 2003. *Diaphorina citri* KUW (Homoptera: Psyllidae): Bioteknologi dan Peranannya sebagai Vektor Penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) pada Tanaman Jeruk Siam. [Disertasi] Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Wirawan, I.G.P., L. Susilowati., dan I.N. Wijaya. 2004. *Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk, Analisis Baru Berbasis Bioteknologi*. Udayana University Press. Denpasar.

\_\_\_\_\_. 2003. Mekanisme Tingkat Molekul Infeksi Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk dan Peran *Diaphorina citri* Kuw. Sebagai Serangga Vektor. Denpasar. Lemlit. Universitas Udayana.