

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

IKA NURHAYATI
WAYAN ADIARTAYASA*)
I GUSTI NGURAH BAGUS

PS Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana
Jl. PB Sudirman Denpasar 80232
*)E-mail: adiartayasaw@gmail.com

ABSTRACT

Detection of the Presence of *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) Disease Causing in Molecular on Citrus (*Citrus nobilis* Lour var. *microcarpa* Hassk) which Based on Variation of Chlorosis Symptoms

This research was aimed to identify the presence of *Liberobacter asiaticum* which caused of *Citrus Vein Phloem Degeneration* disease on citrus leave with different chlorosis symptoms. This research was conducted at Laboratory of Genetics Resources and Biology Molecular, Udayana University. The leaves sample were measured the chlorophyll content using a chlorophyll meter and then were identified in molecular using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) technique, using primer O11 and O12 which will amplified the specific fragmen of 16S rDNA. The result for chlorophyll content indicated that the leaf samples were containing 26.80, 36.52, 36.62, 40.74, 44.56, 47.06, 58.44 and 65.16 SPAD. DNA amplification showed that the leaves which contained chlorophyll at 58.44 and 65.16 SPAD didn't show DNA bands with size 1160 bp, and leaves which contained chlorophyll at 26.80, 36.52, 36.62, 40.74, 44.56 and 47.06 SPAD showed DNA bands 1160 bp. Therefore the DNA bands 1160 bp is expression by *L. asiaticum*, then the citrus leaf samples were detected positive for the *L. asiaticum* and the samples were positive infected by CVPD disease, so that the chlorophyll content of citrus leaves at ≤ 47.04 SPAD can be used as basis to diagnosis CVPD disease on citrus plants.

Keywords: CVPD, *Liberobacter asiaticum*, Chlorosis, PCR

1. Pendahuluan

Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) merupakan salah satu penyakit yang menyerang tanaman jeruk dan dapat menurunkan produksi tanaman jeruk. CVPD menyerang hampir semua kultivar jeruk, menyebabkan produksi berkurang atau gagal, memperpendek masa hidup tanaman jeruk (Hung *et al.*, 2000; Su dan Hung, 2001), dan dapat mematikan tanaman jeruk dalam waktu 1 – 2 tahun (da Graca, 1991). Penyakit CVPD yang juga disebut *citrus greening* atau

huanglongbin disebabkan oleh bakteri *Liberobacter* yang tergolong dalam subdivisi Protobacteria (Sandrine *et al.*, 1996). Bakteri *Liberobacter* hidup dalam floem tanaman jeruk dan menimbulkan gejala yang khas (klorosis pada daun), bakteri tersebut belum bisa dibiakkan pada media buatan (Wirawan, 2001).

Dalam upaya pengendalian penyakit CVPD, pengembangan metode deteksi yang tepat merupakan tahap pertama yang penting karena dapat dijadikan sebagai dasar pengambilan tindakan pengendalian. Untuk mendeteksi patogen CVPD secara efektif dan tepat, telah dikembangkan suatu teknik yang lebih peka dan cepat yaitu teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer spesifik patogen penyebab CVPD (Nakashima *et al.*, 1996; Jagoueix *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 1999).

Wijaya (2003) melaporkan bahwa tanaman jeruk yang terserang CVPD memperlihatkan gejala daun menguning atau klorosis, warna tulang daun tetap hijau, ukuran daun menjadi kecil dan daun menjadi kaku. Putra, dkk (2013) melaporkan bahwa terdapat terdapat 3 tipe gejala klorosis, yaitu klorosis ringan, klorosis sedang dan klorosis berat. Daun yang menunjukkan gejala klorosis ringan memiliki warna tulang daun hijau dengan lamina daun yang masih tetap hijau, daun menjadi tebal dan kaku. Daun yang menunjukkan gejala klorosis sedang warna lamina menguning pada sebagian permukaan daun, tulang daun warnanya tetap hijau, daun menjadi lebih tebal dan kaku. Sedangkan daun yang memiliki gejala klorosis berat memiliki warna lamina yang menjadi kuning pada semua permukaan daun, dan warna tulang daun tetap hijau, serta daun menjadi kaku.

Berdasarkan pengamatan secara visual di lapangan, tanaman jeruk yang diduga terserang penyakit CVPD memiliki gejala klorosis yang bervariasi. Oleh karena itu perlu dilakukan deteksi keberadaan patogen penyebab penyakit CVPD (bakteri *Liberobacter asiaticum*) secara molekuler dengan teknik PCR, berdasarkan perbedaan gejala klorosis dengan klorofil meter (SPAD). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan bakteri *L. asiaticum* pada daun tanaman jeruk dengan tingkat gejala klorosis yang berbeda.

2. Metode Penelitian

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di UPT Laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biologi Molekuler Universitas Udayana Denpasar dari bulan Desember 2015 - Februari 2016.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gunting, timbangan, mortar, Klorofil meter, mikropipet, ependorf (tabung mikro), sentrifugator, mesin vorteks, UV Transiluminator, mesin elektroforesis dan mesin PCR.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daun tanaman jeruk yang bergejala CVPD dengan perbedaan gejala klorosis, aquadest, nitrogen cair, DNA Extraction Kit NucleoSpin®, etanol 95%, penyangga TAE 1%, PCR master mix solution, buffer TE, sepasang primer spesifik 16S rDNA untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Liberobacter asiaticum* yaitu 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'.

2.3 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian diawali dengan pengamatan gejala penyakit CVPD secara visual, yang dilakukan terhadap tanaman jeruk dengan daun yang menunjukkan gejala klorosis di lahan milik petani di Desa Batukaang Kecamatan Kintamani Kabupaten Bangli, Desa Jungutan Kecamatan Bebandem Kabupaten Karangasem dan Desa Pelaga Kecamatan Petang Kabupaten Badung.

Sampel daun yang diambil adalah daun dari tanaman jeruk dengan berbagai umur, yang menunjukkan gejala klorosis dan yang tidak bergejala klorosis masing-masing sebanyak lima helai. Sampel daun diukur kadar klorofilnya dengan menggunakan klorofil meter SPAD. Pengukuran kandungan klorofil dilakukan terhadap lima daun dan setiap daun diukur lima kali sebagai sampel. Sampel yang telah diukur kandungan klorofilnya kemudian dideteksi keberadaan bakteri *L. asiaticum* secara molekuler dengan teknik PCR.

2.4 Deteksi Keberadaan Bakteri Penyebab Penyakit CVPD secara Molekuler

Deteksi bakteri penyebab penyakit CVPD dilakukan secara molekuler yaitu dengan teknik PCR, yang meliputi tiga tahapan yaitu: isolasi DNA total; amplifikasi DNA; dan visualisasi hasil PCR.

Isolasi DNA total dilakukan dengan menghaluskan tulang daun sebanyak ± 10 mg dengan nitrogen cair kemudian disuspensi menggunakan DNA Extraction Kit NucleoSpin®, sehingga didapatkan pelet DNA untuk diamplifikasi. Analisis PCR untuk mendeteksi keberadaan patogen 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 20 μ l dengan teknik PCR.. Reaksi PCR terdiri dari 2 μ l DNA sampel, 1 μ l forward primer, dan 1 μ l reserve primer, 10 μ l PCR master mix solution, dan 6 μ l buffer TE. Amplifikasi DNA terdiri dari: a) Perlakuan awal pada suhu 92⁰C selama 30 detik dengan satu siklus ulangan; b) Empat puluh siklus yang terdiri atas pemisahan utas DNA (Denaturasi) pada suhu 92⁰C selama 60 detik, penempelan primer pada DNA (Anealing) pada suhu 60⁰C selama 30 detik dan sintesis DNA (Elongation) pada suhu 72⁰C selama 90 detik, c) Penyesuaian utas atas dan bawah (Extension) pada suhu 72⁰C selama 90 detik dengan siklus ulangan. DNA hasil amplifikasi PCR

dielektroforesis pada gel agarose 1%. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama 1 jam. Selanjutnya dilihat dengan transilluminator UV.

2.5 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengukuran kandungan klorofil daun tanaman jeruk dengan menggunakan klorofil meter (SPAD) dan visualisasi hasil PCR menggunakan primer spesifik 16S rDNA.

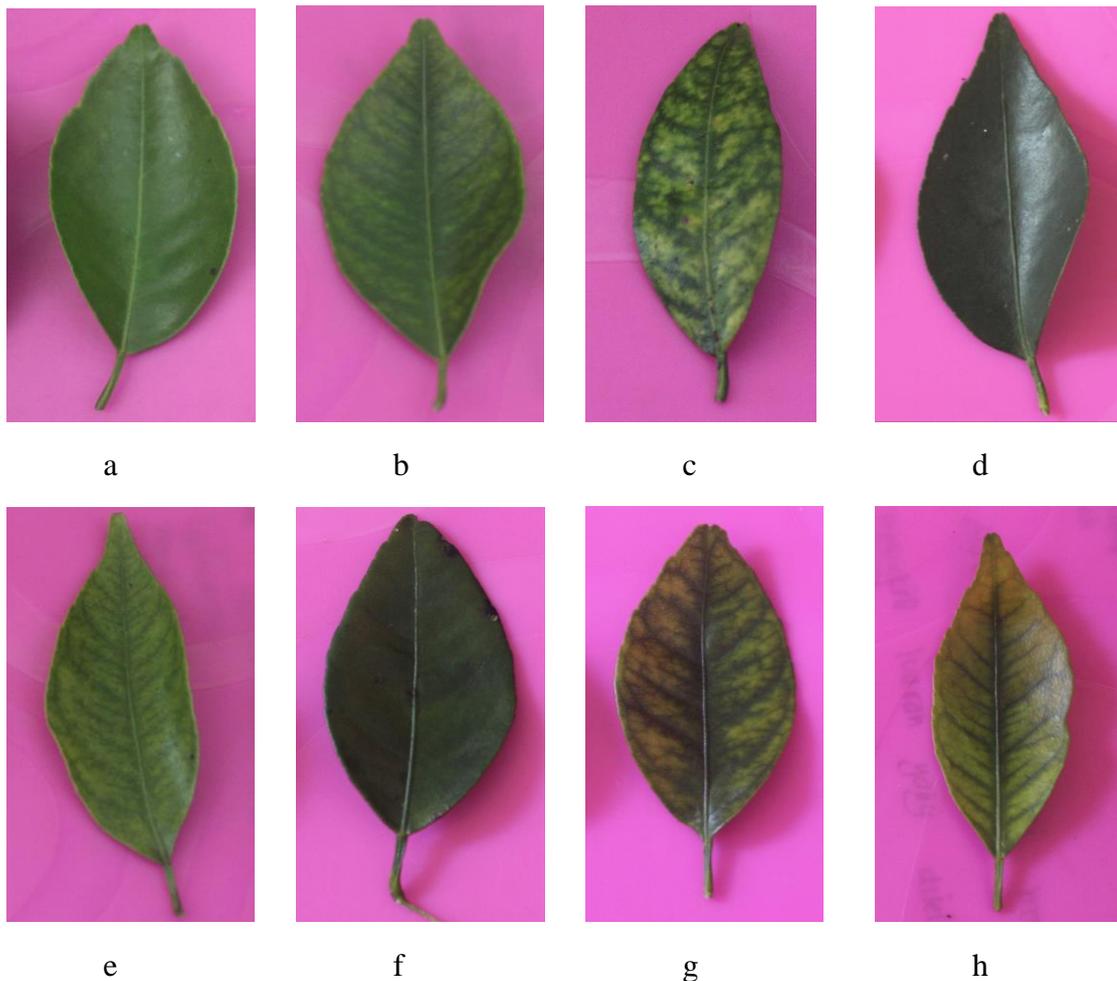
3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Gejala Penyakit CVPD

Pengamatan tanaman bergejala klorosis dilakukan pada tanaman jeruk Siam di Desa Batukaang Bangli, Desa Pelaga Badung dan Desa Jungutan Karangasem. Secara umum, gejala khas pada tanaman yang terinfeksi penyakit CVPD adalah terjadi klorosis atau daun menguning, warna tulang daunnya menjadi hijau tua, daun lebih tebal, kaku dan ukurannya lebih kecil (Wijaya, 2003).

Hasil pengamatan secara visual terhadap gejala serangan penyakit CVPD terdapat variasi gejala klorosis pada daun jeruk pada setiap pertanaman. Jeruk Siam Badung memperlihatkan gejala klorosis dengan warna lamina daun menguning diantara tulang daun namun tidak terlalu kontras dengan warna tulang daun yang tetap hijau (Gambar 1. b). Pada sampel daun jeruk Siam Badung yang lain juga tampak gejala klorosis, dengan bercak-bercak kuning pada seluruh bagian lamina daun dan tulang daun tetap berwarna hijau (Gambar 1. c). Jeruk Siam Bangli menunjukkan gejala klorosis dengan warna lamina daun menguning diantara tulang daun sedangkan warna tulang daun tetap hijau (Gambar 1. e). Jeruk Siam Karangasem memperlihatkan gejala klorosis dengan warna lamina kuning pada semua permukaan daun dan tampak sangat kontras dengan warna tulang daun yang tetap hijau (Gambar 1. g). Jeruk Siam Karangasem yang kedua menunjukkan gejala klorosis yang sama dengan sampel g, akan tetapi warna lamina daun lebih kuning dan lebih merata (Gambar 1. h).

Wirawan, dkk (2003), menduga perbedaan gejala klorosis ini dapat disebabkan oleh umur tanaman atau daun, intensitas serangan, kondisi iklim atau perbedaan strain bakteri *L. asiaticum* yang menyerang tanaman. Adiartayasa, dkk (2012), melaporkan hasil pengamatan terhadap gejala penyakit CVPD pada tanaman jeruk di Kabupaten Karangasem dan menemukan adanya variasi gejala klorosis. Perbedaan gejala klorosis tersebut diduga disebabkan karena adanya pengaruh variasi genetik bakteri penyebab penyakit CVPD, adanya pengaruh lingkungan, kemungkinan asal bibit dan variasi distribusi bakteri yang tidak beraturan pada tanaman.



Gambar 1. Variasi Gejala Klorosis pada Daun Tanaman Jeruk Siam Badung: (a) tidak bergejala CVPD, (b & c) bergejala CVPD, Jeruk Siam Bangli: (d) tidak bergejala CVPD, (e) bergejala CVPD, Jeruk Siam Karangasem: (f) tidak bergejala CVPD, (g & h) bergejala CVPD

Hasil pengukuran kandungan klorofil pada masing-masing sampel sebanyak 5 kali per daun menunjukkan bahwa masing-masing sampel disetiap kabupaten memiliki kandungan klorofil yang bervariasi. Dari keseluruhan sampel, rata-rata kandungan klorofil daun jeruk terendah adalah 26,80 SPAD dan yang tertinggi adalah 65,16 SPAD. Sampel a dan d memiliki rata-rata kandungan klorofil yang berbeda tidak nyata, tetapi berbeda nyata dengan sampel-sampel yang lain. Sampel b, c dan f juga memiliki rata-rata kandungan klorofil yang berbeda tidak nyata. Rata-rata kandungan klorofil sampel e berbeda tidak nyata dengan sampel h. Sedangkan sampel g memiliki rata-rata kandungan klorofil yang berbeda nyata dengan sampel yang lainnya (Tabel 1.). Rata-rata kandungan klorofil pada daun yang bergejala klorosis lebih rendah daripada daun yang tidak bergejala. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sarwono (1995) dan Seolarso (1996) yaitu klorosis terjadi karena

pembentukan klorofil pada daun berkurang. Wirawan, dkk (2004) menyatakan bahwa serangan penyakit CVPD menyebabkan tanaman kekurangan unsur-unsur Zn, Mn dan Ca sehingga mempengaruhi produksi klorofil pada daun.

Tabel 1. Rata- rata Kandungan Klorofil Daun Tanaman Jeruk yang Bergejala Klorosis dan yang Tidak Bergejala Klorosis.

Sampel Daun Tanaman Jeruk	Kandungan Klorofil (SPAD)	Hasil PCR
d	65,16 a	-
a	58,44 a	-
f	47,06 b	+
b	44,56 bc	+
c	40,74 bc	+
h	36,62 c	+
e	36,52 c	+
g	26,80 d	+

Keterangan: nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama yang mengikuti angka pada lajur yang sama menunjukkan perbedaan tidak nyata dengan Uji Duncan pada taraf 5%

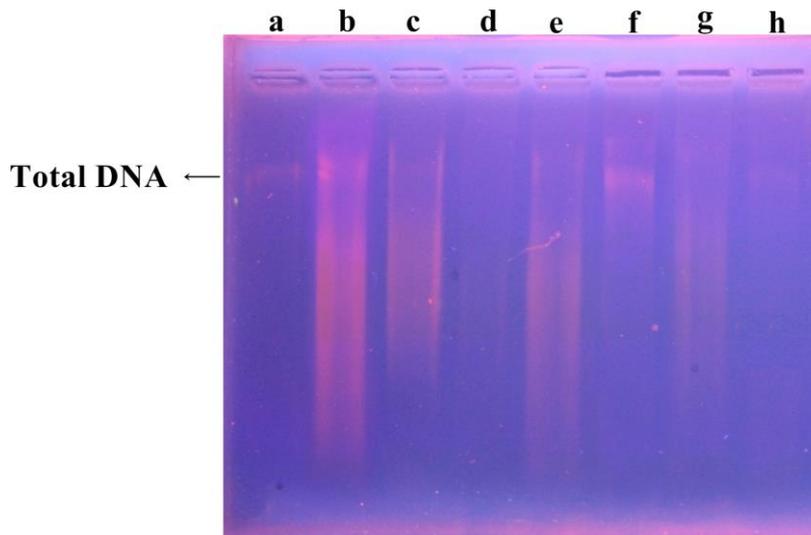
+ : mengandung bakteri *L. asiaticum*

- : tidak mengandung bakteri *L. asiaticum*

3.2 Isolasi Total DNA pada Daun Tanaman Jeruk

Hasil isolasi total DNA beberapa daun tanaman jeruk pada elektroforesis gel agarose 1%, didapatkan adanya pita total DNA pada kolom b (44,56 SPAD), c (40,74 SPAD), e (36,52 SPAD), f (47,06 SPAD) dan g (26,80 SPAD), dan pada kolom tersebut masih ditemukan RNA yang tampak semir. Sedangkan pita total DNA tampak kurang jelas pada kolom a (58,44 SPAD), d (65,15 SPAD) dan h (36,62 SPAD) (Gambar 2.). Hasil isolasi total DNA tanaman kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR.

Bakteri CVPD masih belum dapat dikultur sehingga tidak memungkinkan untuk mengisolasi DNANYA saja, maka dilakukan pendekatan dengan isolasi DNA total tanaman yang diinginkan untuk dideteksi (Ohtsu, *et al.*, 2002). Isolasi total DNA pada daun tanaman jeruk perlu dilakukan untuk memperoleh DNA template berkualitas baik dari daun tanaman jeruk yang akan digunakan dalam analisis PCR. Taylor (1993), menyatakan bahwa amplifikasi dengan menggunakan PCR memerlukan kualitas DNA yang baik.

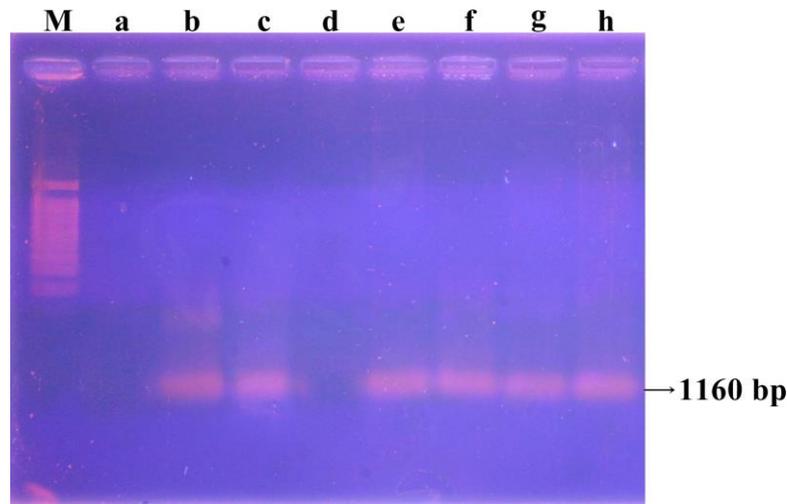


Gambar 2. Hasil Elektroforesis Total DNA Daun Tanaman Jeruk Siam pada gel agarose 1%. Jeruk Siam Badung: a= tidak bergejala CVPD (58,44 SPAD); b= bergejala CVPD (44,56 SPAD); c= bergejala CVPD (40,74 SPAD); Jeruk Siam Bangli: d= tidak bergejala CVPD (65,16 SPAD); e= bergejala CVPD (36,52 SPAD); Jeruk Siam Karangasem: f= tidak bergejala CVPD (47,06 SPAD); g= bergejala CVPD (26,80 SPAD); h= bergejala CVPD (36,62 SPAD)

3.3 Amplifikasi Total DNA dengan Teknik PCR

Hasil DNA teramplifikasi dengan teknik PCR menggunakan sepasang primer Hasil DNA teramplifikasi dengan teknik PCR menggunakan sepasang primer spesifik 16S rDNA dielektroforesis pada gel agarose 1%. Pita DNA 1160 bp tampak pada kolom g (26,80 SPAD), e (36,52 SPAD), h (36,62 SPAD), c (40,74 SPAD), b (44,56 SPAD) dan f (47,06 SPAD). Oleh karena bakteri *L. asiaticum* memiliki pita DNA pada 1160 bp, maka sampel bereaksi positif terhadap bakteri *L. asiaticum*. Menurut Jagoueix, *et al* (1994), hasil PCR dengan primer spesifik untuk bakteri CVPD (16S rDNA) untuk *L. asiaticum* mengamplifikasi DNA pada 1160 bp. Pada kolom a dan d (58,44 dan 65,15 SPAD) tidak ditemukan pita DNA pada 1160 bp, maka pada sampel tersebut tidak ditemukan keberadaan bakteri *L. asiaticum* (Gambar 3.). Hal ini didukung hasil penelitian Putra, dkk (2013) yang melaporkan bahwa sampel daun dari beberapa varietas tanaman jeruk yang memiliki variasi gejala klorosis dari ringan sampai berat menghasilkan pita DNA pada 1160 bp.

Berdasarkan hasil pengukuran kandungan klorofil daun tanaman jeruk dengan hasil visualisasi DNA amplifikasi dapat dikatakan bahwa Kandungan klorofil daun tanaman jeruk $\leq 47,06$ SPAD dapat digunakan sebagai dasar untuk diagnosa tanaman jeruk terserang oleh patogen penyebab penyakit CVPD.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis DNA teramplifikasi pada gel agarose 1%, M= DNA Marker, Jeruk Siam Badung: a= tidak bergejala CVPD (58,44 SPAD); b= bergejala CVPD (44,56 (SPAD); c= bergejala CVPD (40,74 SPAD); Jeruk Siam Bangli: d= tidak bergejala CVPD (65,16 SPAD); e= bergejala CVPD (36,52 SPAD); Jeruk Siam Karangasem: f= tidak bergejala CVPD (47,06 SPAD); g= bergejala CVPD (26,80 SPAD); h= bergejala CVPD (36,62 SPAD)

4. Kesimpulan dan Saran

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Hasil pengamatan secara visual ditemukan gejala klorosis pada masing-masing tanaman jeruk yaitu lamina daun menguning dan tulang daun tetap hijau.
2. Kandungan klorofil pada masing-masing sampel menunjukkan rata-rata kandungan klorofil terendah yaitu 26,80 SPAD dan tertinggi yaitu 65,16 SPAD.
3. Sampel yang dideteksi bereaksi positif terhadap bakteri *L. asiaticum* adalah sampel b (44,56 SPAD), c (40,74 SPAD), e (36,52), f (47,06 SPAD), g (26,80 SPAD) dan h (36,62 SPAD) dan yang tidak bereaksi positif adalah sampel a dan d (58,44 dan 65,15 SPAD)
4. Kandungan klorofil daun tanaman jeruk $\leq 47,06$ SPAD dapat digunakan sebagai dasar untuk diagnosa mendiagnosa penyakit CVPD pada tanaman jeruk.

4.2 Saran

Berdasarkan hasil pengukuran kandungan klorofil dan analisis PCR disarankan kandungan klorofil daun tanaman jeruk $\leq 47,06$ SPAD dapat digunakan sebagai dasar untuk mendiagnosa penyakit CVPD pada tanaman jeruk.

Daftar Pustaka

- Adiartayasa, Wayan. I G P Wirawan. I N Wijaya & I G N Bagus. 2012. Akhir Kajian Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk di Kabupaten Karangasem. Laporan Riset Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Udayana
- Da Graca, J.V. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20: 109 – 36.
- Hung, T.H., Wu, M.L., and Su, H.J. 1999. Detection of Fastidious Bacteria Causing *Citrus* Greening Disease by Nonradioactive DNA Probes. *Ann. Pythopathol. Soc. Jpn.* 65: 140-146.
- Hung, T.H., Wu, M.L., and Su, H.J. 2000. Detection of fastidious bacteria causing citruss greening disease by nonradioactive DNA probes.
- Jagoueix, S., J.M. Bove and M. Garnier. 1994. The Phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of thea subdivision of the Protobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:379-386.
- Jagoueix, S., J.M. Bove and M. Garnier. 1996. PCR Detection of Two Candidates *Liberobacter* Species Associated With Greening Disease of *Citrus*. *Moleculer and Cellulas Probes.* 10:43-50.
- Nakashima, K., M. Prommintara, Y. Ohtsu, T. Kano, J. Imada and M. Koizumi. 1996. Detection of 16 S rDNA of Thai isolates of bacterium like organism associated with greening disease of citrus. *JIRCAS J.*3:1-8.
- Ohtsu, Y; M. Prommintara; S. Okuda; T. Goto; T. Kano; K. Nakashima, M.Koiszwni; J. Imada; & K. Kawashima. 2002. Partial Purification of Thai Isolate of *Citrus Huanglongbing* (greening) Bacteriwn and Antiserum Production for Serological Diagnosis. *J. Plant Phato!* 68: 372-377
- Putra, GP Dintya. Wayan Adiartayasa. Made Sritamin. 2013. Aplikasi *Teknik Polymerase Chain Reaction* (PCR) Terhadap Variasi Gejala Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) pada Beberapa Jenis Daun Tanaman Jeruk. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika* Vol. 2, No. 2.
- Sandrine, J., J.M. Bove, & M. Garnier. 1996. PCR detection of Two Candidates *Liberobacter* Species Assosiated with Greening Disease of Citrus. *Moleculer an Celluar Probes.* 10: 43.
- Sarwono, B. 1995. Jeruk dan Kerabatnya, PT. Penebar Swadaya, Jakarta
- Soelarso, R.B. 1996. Budidaya Jeruk Bebas Penyakit. Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- Su, H.J, and Hung, T.H. 2001. Detection of Greening Fastidious Bacteria (GFB) Causing *Citrus* Greening by Dot Hybridization and *Polymerase Chain Reaction* (PCR) with DNA Probes and Primer Pairs. *Plant Protection.*
- Taylor, G.R. 1993. *Polymerase Chain Reaction.* Basic Principle and Automation. PCR A Practical Approach. Editors: J.M Mc Pherson; Quirke & G.R Taylor. Oxford University Press.
- Wijaya, IN. 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. 2001. *Bioteknologi Menjawab Tantangan Pembangunan Berbasis Teknologi*. Orasi Ilmiah Pengukuhan Guru Besar Tetap Universitas Udayana. Universitas Udayana Denpasar.

Wirawan, I G P, Lilik Sulistyowati dan I Nyoman Wijaya. 2003. Mekanisme Tingkat Molekul Infeksi Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk dan Peran *Diaphorina citri* Kuw. Sebagai Serangga Vektor. Denpasar. Lemlit. Universitas Udayana.

Wirawan, I G P. I N Wijaya. S Liliek. 2004. *Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk: Analisis Baru Berbasis Bioteknologi*. Denpasar: Udayana University Press