

# **Deteksi Keberadaan Penyebab Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD)* pada Tanaman Jeruk dengan Gejala Menyeluruh Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)***

OCTA FRANSISCA SITORUS  
I NYOMAN WIJAYA\*)  
NI MADE PUSPAWATI

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Udayana  
Jln. PB. Sudirman, Denpasar 80362 Bali  
\*)Email : wijayainyoman@gmail.com

## **ABSTRACT**

### **Detection of Occurrence Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) Disease on Citrus Plant with Comprehensive Symptoms using Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique.**

*Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD)* is one of very serious disease of citrus plant. The disease is caused by *Liberobacter asiaticum* bacteria and transmitted by *Diaphorina citri* Kuw insect. The outspread of disease can also caused by the use of citrus seedlings which have been infected by CVPD. Preliminary visual observations CVPD disease symptoms, there are two types of plants showing symptoms of partial and systemic. Partial symptoms are not all the leaves of plants showing symptoms CVPD, while the systemic symptom is on the whole leaves of plants showing symptoms CVPD. This research aimed to determine the outspread of *L. asiaticum* bacteria in every parts of the plant that made detection by PCR. The research has been conducted from in Batukaang, Bangli and Plaga, Badung then continued at Laboratory of Genetic Resources and Biology Molecular, Udayana University. Results of PCR visualization using 1% agarose gel showed that there were a DNA band at 1160 bp on the leaves, twigs, branches and trunks. Because the size of 1160 bp DNA bands is expression by *L. asiaticum*, then the citrus leaf samples were detected positive for the *L. asiaticum* and it can be ascertained that *L. asiaticum* has been distributed to all parts of the plant.

Keywords: *Citrus*, *CVPD*, *L. asiaticum*, *PCR*.

## **1. Pendahuluan**

Salah satu kendala dan ancaman yang sangat serius pada tanaman jeruk adalah adanya serangan *Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD)*. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Liberobacter* (Sandrine *et al.*, 1996) yang hidup dalam pembuluh floem pada tanaman jeruk dan menimbulkan gejala yang khas, bakteri tersebut belum bisa dibiakkan pada media buatan (Wirawan, 2001). Penyakit CVPD ditularkan oleh serangga vektor *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera ; Psyllidae) (Tirtawidjaja & Suharsojo, 1990 ; Wirawan, 2000). Penyebaran penyakit juga dapat

disebabkan oleh penyebaran bibit tanaman jeruk yang telah terinfeksi oleh patogen penyakit CVPD (*tissue graft*) (Mead, 1998).

Gejala luar yang ditimbulkan penyakit CVPD yaitu klorosis atau daunnya menguning, warna tulang daunnya menjadi hijau tua, daunnya lebih tebal, kaku dan ukurannya menjadi lebih kecil (Wijaya, 2003). Gejala penyakit CVPD yang tampak pada daun jeruk muda, sedang dan tua tidak menunjukkan perbedaan yang jelas karena gejala tampak pada semua tingkat umur (Adiartayasa, 2006). Gejala pada buah akibat infeksi patogen CVPD, buah menjadi kecil-kecil dan keras serta kulit buah menjadi cepat menguning (Wirawan *et al.*, 1998). Hasil pengamatan secara visual di lapangan, didapatkan dua tipe tanaman yang menunjukkan gejala parsial dan merata. Gejala parsial adalah hanya sebagian pucuk ranting daunnya saja yang menunjukkan gejala CVPD. Sedangkan gejala menyeluruh atau merata adalah pada seluruh daun tanaman menunjukkan gejala CVPD. Diduga pada seluruh daun tanaman akan ditemukan bakteri penyebab penyakit CVPD dan kemungkinan terdapat juga pada tulang daun, batang, cabang dan ranting.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui penyebaran bakteri *L. asiaticum* di seluruh bagian tanaman (pada daun, ranting, cabang dan batang).

## 2. Metode Penelitian

### 2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilakukan sejak bulan Juli 2015 sampai dengan bulan Februari 2016 di Desa Batukaang, Kabupaten Bangli dan Desa Plaga, Kabupaten Badung selanjutnya di Laboratorium Biomolekuler dan Sumber Daya Genetika, Universitas Udayana, Denpasar.

### 2.2 Bahan dan Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar, *ependorf tube*, mesin PCR, seperangkat alat elektroforesis (BioRad), *centrifuge*, *UV transilluminator*, *microwave*, alat vortex, erlenmeyer, alat inkubasi, plastik, label, kamera, alat tulis. Sedangkan bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sampel tanaman jeruk yang terserang CVPD dengan gejala berat, *Lysis Buffer* PL-1, *Wash buffer* (PW1 dan PW2), RNase, *elution buffer*, penyangga TAE 1%, dan sepasang primer spesifik 16S rDNA untuk mendeteksi keberadaan bakteri yaitu:

Forward Primer OI1 5' GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG C 3'

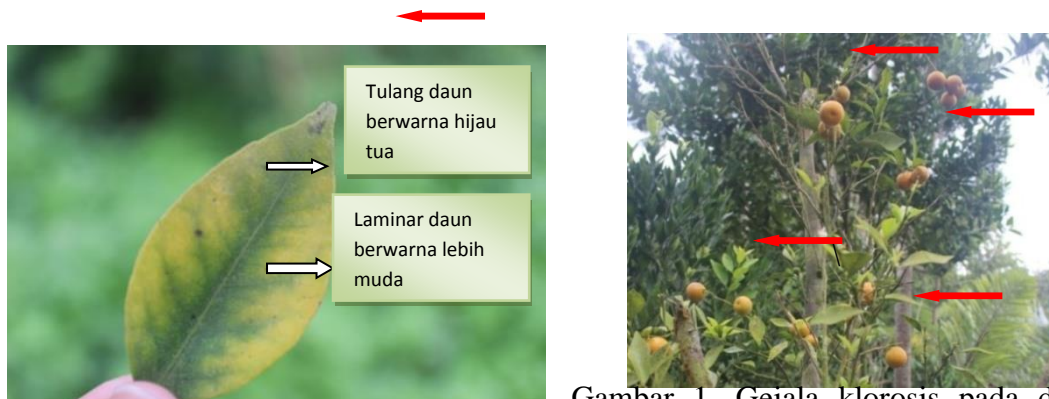
Reverse Primer OI2c 5' GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T 3'

DNA yang teramplifikasi dengan primer tersebut berukuran 1160 bp. (Wirawan, 2000).

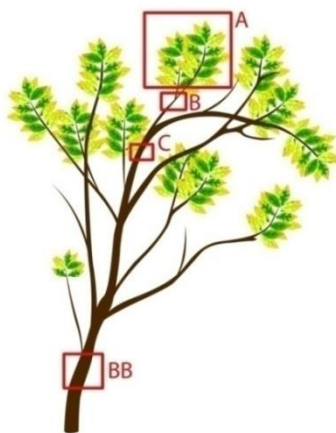
### 2.3 Pelaksanaan Penelitian

### 2.3.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan mengamati secara visual di lapangan untuk mencari tanaman yang daun dan buahnya menunjukkan gejala penyakit CVPD secara menyeluruh atau merata, seperti pada (Gambar 1), kemudian ditentukan satu pohon dari suatu lahan. Bagian yang diambil adalah pucuk daun, kulit cabang, kulit ranting, dan kulit batang (Gambar 2).



Gambar 1. Gejala klorosis pada daun jeruk dan buah jeruk yang terserang CVPD (Sumber: Gambar pribadi)



Keterangan:

A= pucuk daun dari pohon bergejala menyeluruh

B= Kulit ranting

C= Kulit cabang

BB= Kulit batang bawah

Gambar 2. Pengambilan sampel tanaman jeruk yang bergejala menyeluruh (Sumber: Gambar pribadi)

### 2.3.2 Pengamatan Persentase Pucuk Tanaman yang Menunjukkan Gejala CVPD

Pengamatan persentase pucuk tanaman yang terserang dilakukan dengan menghitung seluruh pucuk dari satu tanaman sampel yang diambil dari dua lokasi yang berbeda yaitu di Desa Batukaang dan Desa Plaga. Rumus:

$$\text{Persentase Pucuk Tanaman Terserang} = \frac{\text{Jumlah pucuk tanaman terserang}}{\text{Jumlah pucuk tanaman yang diamati}} \times 100\% \dots (1)$$

### 2.3.3 Deteksi Penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*)

Sampel tanaman jeruk diidentifikasi secara molekuler melalui teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan primer 16S rDNA dengan beberapa tahapan isolasi DNA total, amplifikasi DNA, dan visualisasi hasil PCR (Rogers & Bendich, 1991).

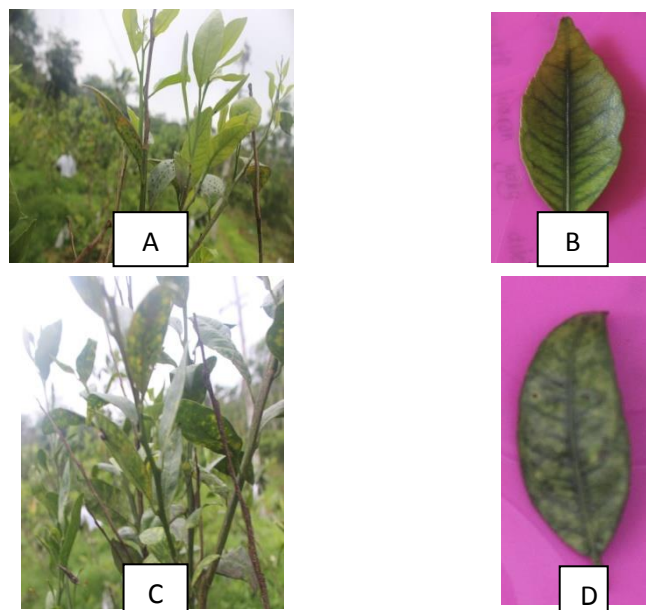
### 2.3.4 Parameter yang Diamati

- Deteksi penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) dengan primer spesifik 16S rDNA.
- Pita DNA bakteri *Liberobacter asiaticum* pada sampel tanaman yang teramplifikasi 1160 bp.

## 3. Hasil Dan Pembahasan

### 3.1 Kondisi Tanaman Jeruk di Lapangan

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilaksanakan di dua desa yang berbeda yaitu Desa Batukaang dan Desa Plaga, ditemukan bahwa terdapat beberapa pohon yang menunjukkan gejala serangan penyakit CVPD secara merata. Sampel tanaman jeruk yang berasal dari Desa Plaga memiliki ciri-ciri gejala daun menguning atau klorosisnya sudah merata pada lamina daun dan tulang daunnya berwarna lebih tua, sedangkan pada sampel yang berasal dari Desa Batukaang memiliki ciri-ciri klorosis tidak merata pada lamina daun dan warna tulang daun tidak berbeda jauh dengan warna lamina. (Gambar 3).



Gambar 3. Gejala klorosis pada tanaman jeruk di Desa Plaga dan Batukaang. (A) Pucuk daun jeruk di Desa Plaga yang bergejala merata (B) Daun bergejala di Desa Plaga (C) Pucuk daun jeruk di Desa Batukaang yang bergejala merata dan (D) Daun bergejala di Desa Batukaang.

Berdasarkan gambar tersebut dapat terlihat bahwa meskipun gejala klorosis kedua sampel tersebut masih sama-sama tergolong klorosis sedang, tetapi tipe gejala pada daun di Desa Plaga terlihat lebih parah dibandingkan dengan tipe gejala pada daun di Desa Batukaang. Penyebab terjadinya perbedaan tipe gejala pada daun tanaman jeruk yang diserang CVPD belum diketahui dengan pasti. Diduga perbedaan ini dapat disebabkan oleh umur tanaman atau daun, kondisi iklim atau oleh perbedaan strain bakteri *L.asiaticum* yang menyerang tanaman (Wirawan *et al.*, 2003, Adiartayasa *et al.*, 2012).

### 3.2 Persentase Pucuk Tanaman Terserang CVPD

Dari hasil rata-rata persentase pucuk terserang (tabel 1) sebesar 75,79% dapat diasumsikan bahwa pucuk tanaman terserang dari tanaman yang menunjukkan gejala CVPD secara merata tergolong dalam kategori berat (Sarwono, 1986). Tetapi persentase pucuk terserang tidak dapat menentukan merata atau tidaknya penyebaran bakteri *L.asiaticum* dalam tanaman. Oleh sebab itu, perlu dilakukan deteksi melalui teknik PCR.

Tabel 1. Persentase Pucuk yang Menunjukkan Gejala Penyakit CVPD pada Setiap Tanaman

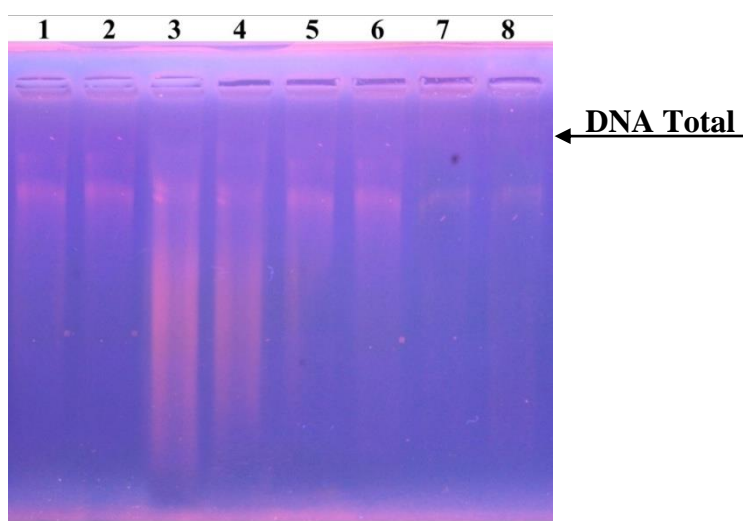
No	Nama Desa	Jumlah pucuk yang diamati (daun)	Jumlah pucuk yang menunjukkan gejala (daun)	Persentase pucuk yang menunjukkan gejala (%)
1	Batukaang	323	250	77,39
2	Plaga	248	184	74,19
<b>Rata-rata</b>				<b>75,79</b>

Dari tabel 1 diatas, dapat dilihat bahwa persentase pucuk terserang pada sampel pohon di Desa Batukaang lebih besar dibandingkan dengan sampel pohon di Desa Plaga. Hal ini disebabkan karena jumlah pucuk yang terserang pada sampel pohon di Desa Batukaang lebih banyak dibandingkan dengan sampel pohon di Desa Plaga. Bila dilihat dari gejala klorosisnya, sampel daun di Desa Plaga menunjukkan gejala klorosis yang lebih parah dibandingkan dengan sampel daun di Desa Batukaang. Hal ini kemungkinan juga disebabkan karena konsentrasi patogen pada sampel pohon di Desa Plaga lebih banyak dibandingkan dengan sampel pohon di Desa Batukaang sehingga keberhasilan penularan penyebab penyakit dalam tanaman lebih tinggi pada sampel daun di Desa Plaga.

### 3.3 Isolasi DNA Total Tanaman

Deteksi hasil isolasi total DNA tanaman jeruk siam dari masing-masing bagian yaitu tulang daun, kulit ranting, kulit cabang dan kulit batang yang menunjukkan gejala penyakit CVPD secara merata, terlihat adanya pita DNA pada elektroforesis *gel agarose* 1% (Gambar 4).

Dari gambar tersebut, menunjukkan bahwa DNA tanaman tersebut sudah terisolasi dengan baik. Bakteri CVPD masih belum bisa dikultur sehingga tidak memungkinkan untuk mengisolasi DNA-nya saja, maka dilakukan pendekatan dengan isolasi DNA total tanaman yang diinginkan untuk dideteksi. (Ohtsu, *et al.*, 2002). Menurut Taylor (1993), dalam tahapan amplifikasi dengan teknik PCR diperlukan kualitas DNA template yang baik dan program yang sesuai agar hasil DNA yang diperoleh bagus.

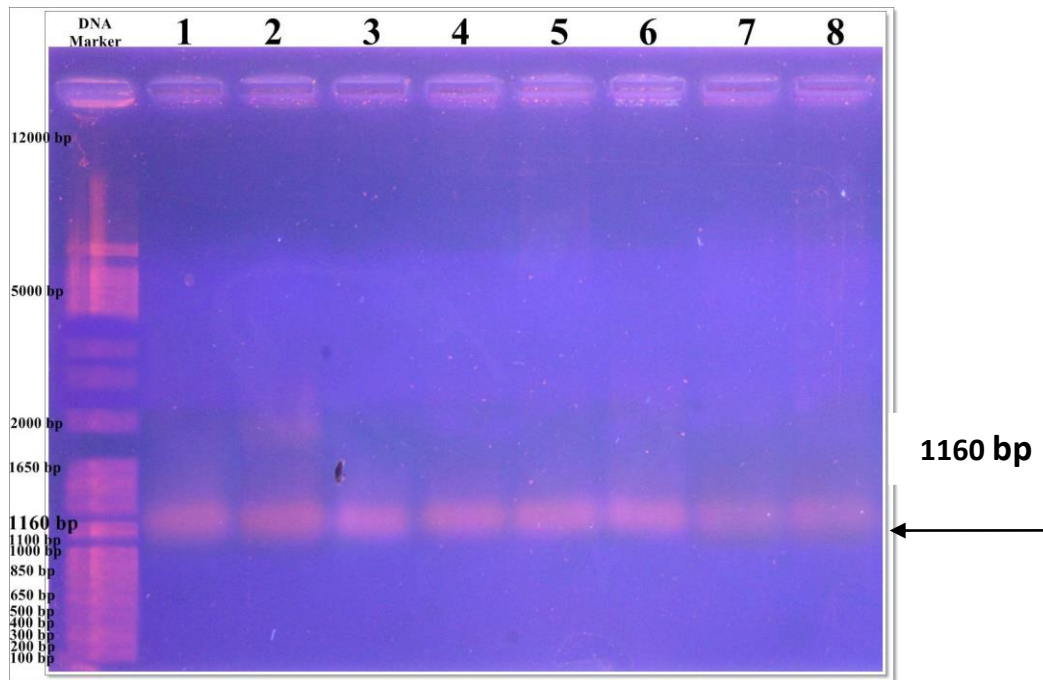


Gambar 4. Hasil Isolasi Total DNA pada dua tanaman. (Kolom: 1=daun jeruk siam Batukaang ; 2=daun jeruk siam Plaga ; 3=kulit ranting jeruk siam Batukaang ; 4=kulit ranting jeruk siam Plaga ; 5=kulit cabang jeruk siam Batukaang ; 6=kulit cabang jeruk siam Plaga ; 7=kulit batang jeruk siam Batukaang ; 8=kulit batang jeruk siam Plaga).

### 3.4 Deteksi Bakteri *Liberobacter* dengan Teknik PCR

Analisis PCR terhadap jeruk siam dari masing-masing bagian tanaman yaitu pada tulang daun, kulit ranting, kulit cabang dan kulit batang yang menunjukkan gejala CVPD secara merata atau menyeluruh dengan menggunakan primer spesifik 16S rDNA diperoleh hasil bahwa tanaman yang terserang CVPD dan menunjukkan gejala secara merata atau menyeluruh pada hasil elektroforesis *gel agarose* 1% terdapat adanya pita DNA pada ukuran 1160 bp. Pada sample tanaman yang menunjukkan gejala secara merata, ditemukan adanya bakteri *L. asiaticum* di masing-masing bagian yaitu pada daun, ranting, cabang dan kulit batang (Gambar 5). Hal ini membuktikan bahwa pada seluruh tanaman yang menunjukkan gejala CVPD secara menyeluruh ditemukan patogen penyebab penyakit CVPD. Pernyataan ini sesuai dengan yang dikemukakan Yuniti (2002) yang menyatakan bahwa penyakit

CVPD penyebarannya melalui pembuluh floem menyebar ke seluruh bagian tanaman.



Gambar 5. Hasil Visualisasi PCR pada dua tanaman. (Kolom: 1=daun jeruk siam Batukaang ; 2=daun jeruk siam Plaga ; 3=kulit ranting jeruk siam Batukaang ; 4=kulit ranting jeruk siam Plaga ; 5=kulit cabang jeruk siam Batukaang ; 6=kulit cabang jeruk siam Plaga ; 7=kulit batang jeruk siam Batukaang ; 8=kulit batang jeruk siam Plaga).

Pada pita DNA menggunakan *gel agarose* 1% terlihat pada bagian daun lebih tebal dari pita DNA pada bagian tanaman yang lain. Pada umumnya, bakteri *L. asiaticum* lebih sering ditemukan pada bagian daun. Hal ini membuktikan bahwa infeksi awal bakteri *L. asiaticum* terjadi di bagian daun. Infeksi ini dibantu oleh vektor penyakit CVPD yaitu kutu loncat *D.citri* karena serangga ini menyukai daun muda (Yuniti, 2002).

#### 4. Kesimpulan Dan Saran

##### 4.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Hasil visualisasi DNA teramplifikasi pada gel agarose 1% ditemukan adanya pita DNA pada daun, ranting, cabang dan batang tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD secara merata. Oleh karena bakteri *L. asiaticum* memiliki pita DNA 1160 bp, maka sampel tersebut dinyatakan bereaksi positif terhadap bakteri *Liberobacter asiaticum*.
2. Seluruh sampel tanaman dideteksi adanya bakteri *L. asiaticum*.

#### 4.2. Saran

Tindakan pengendalian yang disarankan kepada petani untuk tanaman yang menunjukkan gejala CVPD secara menyeluruh adalah untuk memotong secara keseluruhan tanaman (eradikasi total) sehingga dapat mencegah infeksi bakteri pada tanaman yang lain dan tidak boleh digunakan sebagai mata tempel dalam pembibitan. Selain itu perlu dilakukan pengendalian terhadap vektor *Diaphorina citri* dengan menggunakan musuh alami dan penggunaan insektisida yang sesuai.

#### Daftar Pustaka

- Adiartayasa, W. 2006. Identifikasi Beberapa Varietas Jeruk dan Deteksi Patogen CVPD dengan PCR di Kecamatan Kintamani. [Tesis]. Universitas Udayana. Denpasar.
- Adiartayasa, Wayan, I G P Wirawan, I N Wijaya & I G N Bagus. 2012. Kajian Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk di Kabupaten Karangasem. Laporan Riset Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Udayana.
- Mead, F.W. 1998. *Asiatic Citrus Psyllid Diaphorina citri Kuwayama, University of Florida, Cooperative Extension Service, Institut of Food and Agricultural Services*. <http://creaturesifas.ufl.edu>.
- Ohtsu, Y., M. Prommintara., S. Okuda., T. Goto., T. Kano., K. Nakashima., M. Koizumi., J. Imada., and K. Kawashima. 2002. Partial Purification of Thai Isolate of Citrus Huanglongbing (greening) Bacterium and Antiserum Production for Serological Diagnosis. *J. Plant Pathol.* 68:372-377.
- Rogers SO, Bendich AJ. 1991. *Extraction of DNA from Plant Tissues. Plant Molecular Biology Manual. USA : Kluwer Academic Publisher.*
- Sandrine, J.,J.M. Bove and M. Garnier. 1996. *PCR Detection of Two Candidatus Liberobacter Spesies Assosiated with Greening Disease of citrus. Moleculer an Celluler Probes* 10:43 hal.
- Sarwono, B. 1986. Jeruk dan Kerabatnya, PT. Penebar Swadaya, Jakarta.
- 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.*
- Tirtawidjaya, S., T & R. Suharsojo. 1990. Penyakit CVPD Merupakan Bahaya Laten Bagi Tanaman Jeruk di Indonesia. *Perlindungan Tanaman Menunjang Terwujudnya Pertanian Tangguh dan Kelestarian Lingkungan*. PT. Agricon. h. 299-310.
- Wijaya, I.N. 2003. *Diaphorina citri* KUW (Homoptera: Psyllidae) : Bioteknologi dan Perannya sebagai Vektor Penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) pada Tanaman Jeruk Siam. [Disertasi] Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Wirawan, I G.P., N. Arya., S. Subandiyah. 1998. Isolasi Loci Resisten Terhadap CVPD dengan Metode Transformasi Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Laporan Riset Unggulan Terpadu V. Kantor Menteri Negara Riset Teknologi. Dewan Riset Nasional. Jakarta.
- \_\_\_\_\_. 2000. Isolasi Resisten Terhadap CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) dengan Metode Transformasi Menggunakan *Agrobacterium*



*tumefaciens*. Laporan Riset Unggulan Terpadu V. Universitas Udayana. Denpasar.

\_\_\_\_\_. 2001. *Bioteknologi Menjawab Tantangan Pembangunan Berbasis Teknologi*. Orasi Ilmiah Pengukuhan Guru Besar Tetap Universitas Udayana. Universitas Udayana. Denpasar.

Yuniti, Diah I.G.A. 2002. Penyebaran Bakteri *Liberobacter asiaticum* pada Tanaman Jeruk dalam Beberapa Tingkat Gejala Serangan Penyakit CVPD. Universitas Udayana, Denpasar.