

Deteksi Keberadaan *Liberobacter asiaticum* Pada Tanaman Jeruk Yang Terserang *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) Dengan Gejala Parsial

VANI SILVANA
I NYOMAN WIJAYA *)
I GEDE PUTU WIRAWAN

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

ABSTRACT

Detection Of The Existence of *Liberobacter Asiaticum* in Citrus Stricken with Symphoms of Partial CVPD.

Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) is a major disease of citrus caused by Gram-negative bacteria *Liberobacter asiaticum*. The symptoms of the disease were varied due to many factors such as type of pathogenic races of the pathogen, types of citrus trees, and the presence or spread of plant pathogens in the plant. This study aims to detect the existence or distribution of pathogens of CVPD in citrus plant with partial symptoms. Samples were taken from the bone leaves, bark twigs, bark of branches and bark of stem whether symptomatic or non symptomatic. Sampling was carried out in Plaga village, Badung Regency, Bali and analysis of *polymerase chain reaction* (PCR) was conducted in UPT Lab Genetics Resources and Molecular Biology, Udayana University. The results of this study indicate that the amplified DNA of 1160 bp was found in the first plant that was symptomatic leaf, twig bark of leaf symptomatic and non symptomatic leaves. While on the second sample of citrus plants, DNA fragments were found on the leaves and symptomatic leaf and non symptomatic, and they were not found in other parts of plant, namely twig bark, branch bark, bark of stem. These results indicate that in citrus with partial symptoms the distribution of pathogens *L. asiaticum* were only partial in plant.

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

1. Pendahuluan

Salah satu factor penyebab menurunnya hasil produksi jeruk adalah serangan penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) yang disebabkan oleh bakteri *Liberobacter* yang tergolong dalam subdivisi Protobacteria (Sandrine *et al.*, 1996). Menurut Wirawan (2001), *Liberobacter* belum bisa dibiakkan pada media buatan. Keberadaan *Liberobacter* pada tanaman jeruk yang terinfeksi CVPD dapat dideteksi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik 16S rDNA (Bove *et al.*, 1996). Bakteri *Liberobacter* hidup dan hanya berkembang pada jaringan floem tanaman jeruk sehingga mengakibatkan sel-sel pada phloem

mengalami degenerasi sehingga menghambat translokasi nutrisi pada tanaman (Anonim., 2012).

Penularan penyakit CVPD dilakukan oleh serangga vector *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera : Psyllidae) (Tirtawidjaja & Suharsojo, 1990; Wirawan, 2000). Selain melalui vektor, penyakit CVPD dapat ditularkan melalui bibit terinfeksi.

Gejala penyakit CVPD pada jeruk diantaranya klorosis atau daunnya menguning, warna tulang daunnya menjadi hijau tua, daunnya lebih tebal, kaku dan ukurannya menjadi lebih kecil (Wijaya, 2003). Hasil pengamatan bahwa terdapat beberapa tanaman jeruk yang terserang CVPD pada daun menunjukkan gejala merata dan tidak merata atau parsial. Gejala merata adalah pada keseluruhan daun tanaman menunjukkan gejala penyakit CVPD, sedangkan gejala parsial adalah tidak semua daun tanaman jeruk menunjukkan gejala atau hanya sebagian pucuk atau ranting daunnya yang menunjukkan gejala penyakit CVPD. Diduga tidak semua batang, tangkai daun, pucuk daunnya yang mengandung bakteri penyebab penyakit CVPD pada tanaman jeruk.

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sebaran/keberadaan *L. asiaticum* dari pucuk yang menunjukkan gejala penyakit CVPD ke cabang, ranting, pucuk yang belum menunjukkan gejala.

2. Metode Penelitian

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel daun jeruk di Desa Plaga, Kecamatan Petang, Kabupaten Badung, dan deteksi *Liberobacter asiaticum* menggunakan analisis PCR di UPT Laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biomolekuler, Universitas Udayana Denpasar sejak bulan Desember 2015 sampai Februari 2016.

2.2 Bahan dan Alat

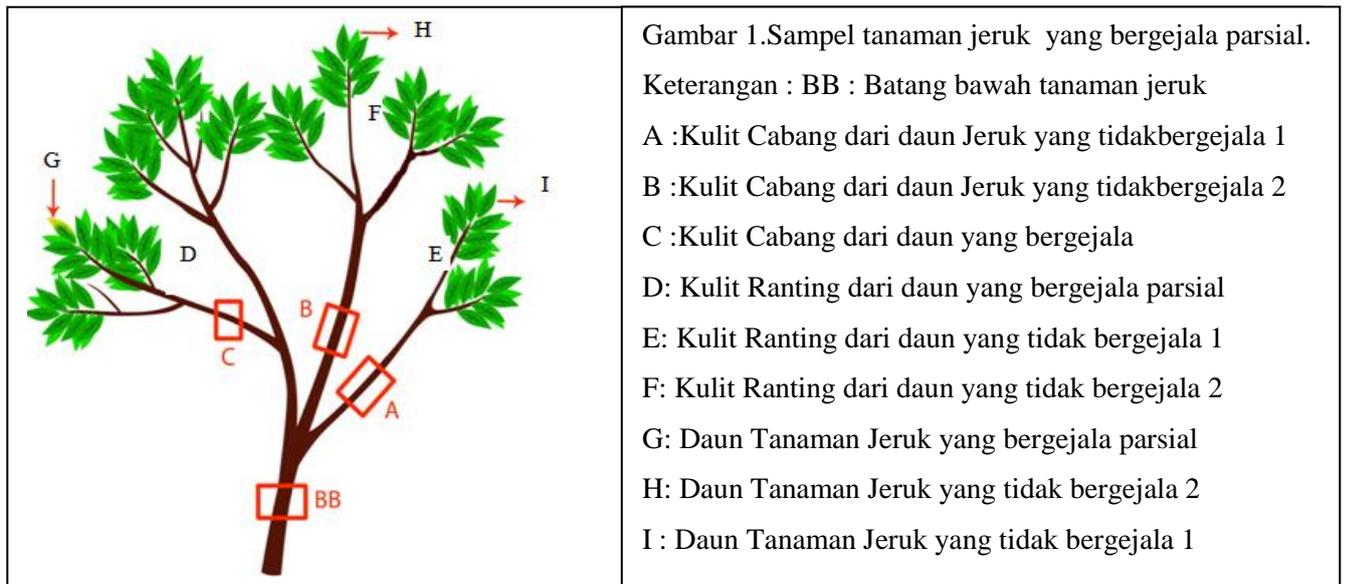
Bahan yang digunakan adalah daun, batang, cabang tanaman jeruk yang bergejala parsial. Bahan lain yang diperlukan : Aquades, Nitrogen cair, Lysis Buffer PL-1, Wash Buffer(PW-1 dan PW-2), RNase Elution Buffer, Nucleon Spin (green ring, violet ring), PCR Kit (2x PCR Master Solution (i-Taq™), i-Taq™ DNA Polymerase (5μ/μl), PCR Reaction Buffer), F Primer O11 dan R Primer O12b, Etidium Bromida, Loading Dye, TAE Buffer 1%, Agarose.

Alat yang digunakan adalah mortar dan pistil, ependorf (tabungmikro), gunting, pipet mikro, chip pipet, mikrosentrifus Mikro 200R Hettich Sentrifugen, *ice box*, *vortex mixer*, mesin PCR, perangkat elektroforesis, transluminator UV.

2.3 Pelaksanaan Penelitian

2.3.1 Pengambilan sampel

Sampel penelitian diambil dengan menentukan tanaman secara terpilih yang menunjukkan gejala penyakit CVPD secara parsial. Gejala parsial atau ringan dicirikan sebagai berikut tulang daun terlihat lebih tua, lamina daun sebagian menguning dan daun menjadi kaku serta hanya menyerang beberapa pucuk pada satu pohon/tanaman jeruk seperti pada gambar 1. Daun yang menunjukkan gejala tersebut ditentukan sebagai sampel. Sampel kemudian dideteksi menggunakan teknik PCR.



2.3.2 Deteksi Penyakit CVPD dengan teknik PCR

Sampel tanaman diidentifikasi secara molekuler dengan menggunakan primer 16S rDNA melalui beberapa tahap, tahapan tersebut:

1. Isolasi Total DNA Sampel dari Tanaman Jeruk
2. Amplifikasi DNA dengan PCR
3. Elektroforesis Gel Agarose dan Visualisasi Hasil PCR

2.4 Parameter yang diamati

Parameter yang diamati adalah DNA yang teramplifikasi dari sampel total DNA tanaman Jeruk dengan menggunakan primer O11 dan O12b pada ukuran 1160 bp

3. Hasil dan Pembahasan

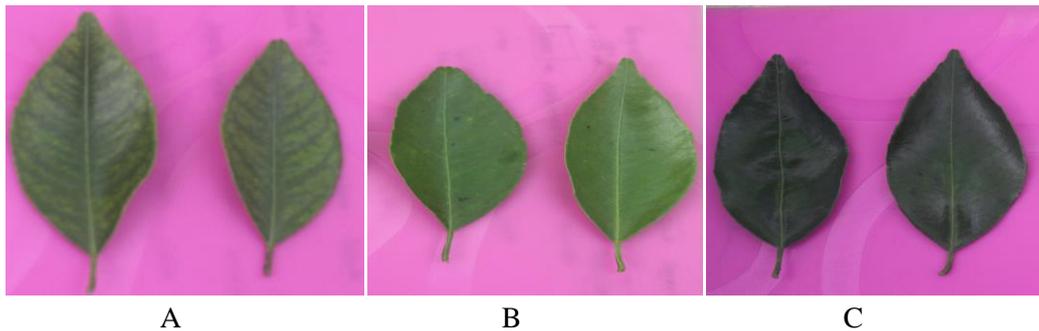
3.1 Pengamatan Gejala di Lapangan

Hasil pengamatan di lapangan, tanaman jeruk yang mendominasi pertanaman di desa Plaga yaitu jeruk siam dengan umur tanaman berkisar 5 tahun. Luas lahan produktif tanaman jeruk yang diambil pohonnya untuk dijadikan sampel yaitu sekitar

50 are milik seorang petani bernama Ketut Agus, dengan kondisi pertanaman seperti pada Gambar 2. Gejala penyakit CVPD yang ditemui di desa Plaga yaitu gejala secara parsial. Tanaman jeruk yang menunjukkan gejala penyakit CVPD secara parsial yang terlihat dilapangan yaitu klorosis ringan dengan tulang daun masih hijau, sebagian lamina daun menguning (Gambar 3 dan 4 bagian A) dan hanya 1 pucuk daun yang menunjukkan gejala sedangkan pucuk daun lainnya tidak bergejala (Gambar 3 dan 4 bagian B dan C). Tidak adanya gejala yang khas pada bagian ranting, cabang serta batang.



Gambar 2. Kondisi pertanaman jeruk yang dijadikan sebagai sampel didesa Plaga



Gambar 3. Sampel Daun Jeruk Siam tanaman 1

Keterangan : A : Daun Tanaman Jeuk bergejala CVPD

B : Daun Tanaman Jeruk yang tidak bergejala 1

C : Daun Tanaman Jeruk yang tidak bergejala 2



Gambar 4. Sampel Daun Jeruk Siam Tanaman 2

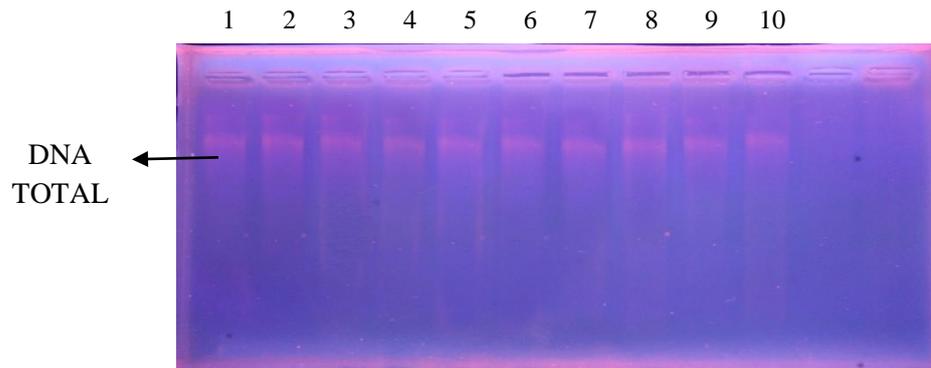
Keterangan : A: Daun bergejala CVPD

B: Daun tidak bergejala 1

C: Daun tidak bergejala 2

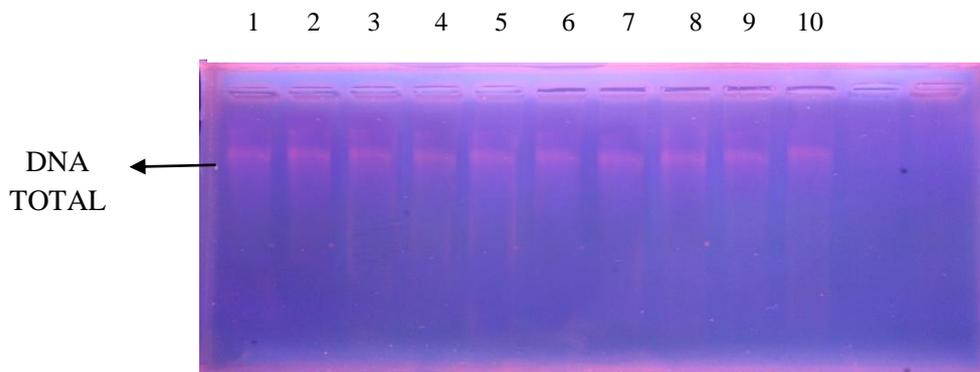
3.2 Isolasi Total DNA

Sebelum mendeteksi *L. asiaticum* penyebab penyakit CVPD pada tanaman jeruk perlu dilakukan isolasi total DNA tanaman jeruk. Hasil isolasi total DNA beberapa bagian tanaman jeruk di desa plaga yang bergejala dan tidak bergejala CVPD ditunjukkan dengan adanya pita DNA dalam proses elektroforesis gel agarose 1% pada Gambar 5 dan 6.



Gambar 5. Isolasi total DNA tanaman Jeruk Siam Tanaman 1 di desa Plaga.

Keterangan : Line 1) DNA dari kulit cabang daun tidak bergejala 1. 2) DNA dari kulit cabang daun tidak bergejala 2. 3) DNA dari kulit cabang daun bergejala. 4) DNA dari kulit batang bawah. 5) DNA daun tidak bergejala 1. 6) DNA daun tidak bergejala 2. 7) DNA daun bergejala ringan. 8) DNA dari kulit ranting daun bergejala ringan. 9) DNA dari kulit ranting daun daun tidak bergejala 2. 10) DNA dari kulit ranting daun daun tidak bergejala 1.



Gambar 6. Isolasi total DNA Tanaman Jeruk Siam Pohon 1 di desa Plaga.

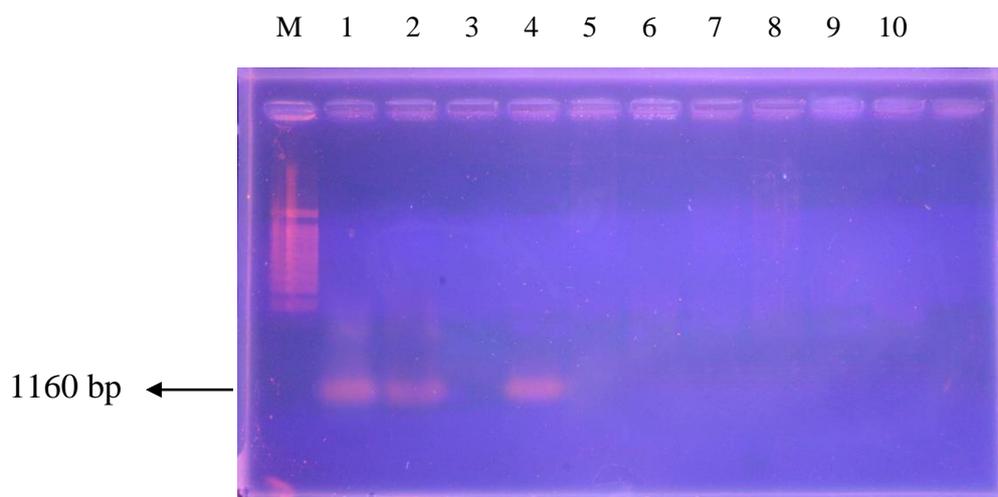
Keterangan : Line 1) DNA dari kulit cabang daun tidak bergejala 1. 2) DNA dari kulit cabang daun tidak bergejala 2. 3) DNA dari kulit cabang daun bergejala. 4) DNA dari kulit batang bawah. 5) DNA daun tidak bergejala 1. 6) DNA daun tidak bergejala 2. 7) DNA daun bergejala ringan. 8) DNA dari kulit ranting daun bergejala ringan. 9) DNA dari kulit ranting daun daun tidak bergejala 2. 10) DNA dari kulit ranting daun daun tidak bergejala 1.

Pada Gambar 5 dan 6 menunjukkan bahwa DNA tanaman telah terisolasi dengan baik, kualitas total DNA tanaman yang baik diperlukan dalam proses

amplifikasi dengan teknik PCR. *L. asiaticum* belum dapat dibiakan dalam media buatan, sehingga diperlukan Isolasi total DNA tanaman yang ingin dideteksi (Wirawan, 2001).

3.3 Hasil Amplifikasi dengan PCR

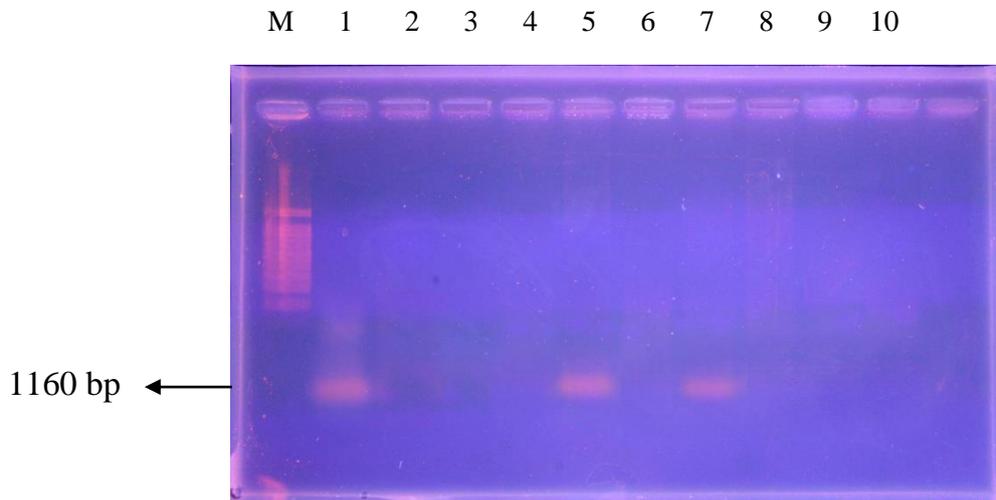
Amplifikasi dengan teknik PCR bertujuan untuk memperbanyak DNA *L. asiaticum* penyebab penyakit CVPD dari DNA hasil isolasi DNA total didapat. Terlihat pada gel agarose 1% hanya terdapat 3 pita DNA pada 1160 bp dari 10 pita DNA yang telah dielektroforesis setelah proses amplifikasi yaitu pada line 1, line 2 dan line 4 (Gambar 7). Dari ketiga pita DNA diketahui bahwa *L. asiaticum* hanya terdapat pada daun yang menunjukkan gejala CVPD, daun yang tidak menunjukkan gejala 1 dan pada kulit ranting pada daun yang menunjukkan gejala. Daun yang tidak menunjukkan gejala atau yang secara visual tampak sehat mengandung *L. asiaticum* kemungkinan disebabkan karena infeksi baru oleh serangga vektor yaitu *D. citri* hal ini diperkuat dengan adanya serangga vektor pada pengamatan dilapangan.



Gambar 7. Hasil Amplifikasi DNA Bakteri *L. asiaticum* dari tanaman jeruk 1 bergejala Parsial dengan Teknik PCR Menggunakan Primer 16S rDNA pada Gel Agarose 1%. Keterangan : Line M) DNA marker. 1) DNA daun bergejala. 2) DNA kulit ranting dari daun bergejala. 3) DNA dari kulit cabang dari daun yang bergejala. 4) DNA daun tidak bergejala 2. 5) DNA dari kulit ranting daun yang tidak bergejala 2. 6) DNA dari kulit cabang daun tidak bergejala 2. 7) DNA daun tidak bergejala 1. 8) DNA dari kulit ranting dari daun yang tidak bergejala 1. 9) DNA dari kulit batang bawah. 10) DNA kulit cabang dari daun yang tidak bergejala 1.

Menurut Wijaya (2003), imago *D. citri* dapat menularkan penyakit CVPD setelah menghisap cairan sel pada tanaman terinfeksi selama 72 jam. Gejala penyakit CVPD akan tampak setelah kurang lebih 4,5 bulan setelah penularan penyakit. Kulit ranting daun bergejala positif mengandung DNA *L. asiaticum* seperti ditunjukkan pada Gambar 7 line 2, disebabkan karena sebaran *L. asiaticum* dari daun bergejala. Yuniti (2002) menyatakan pada tanaman jeruk yang terinfeksi penyakit CVPD secara parsial diawali dengan sumber infeksi, kemudian menyebar ke bagian tanaman

lainnya mengikuti aliran floem. *L.asiaticum* masuk ke dalam sel-sel floem tanaman jeruk kemudian berkembang biak dengan mengambil sumber karbon dan nitrogen sebagai makanan dari metabolisme sel-sel floem tanaman jeruk (Wirawan dkk, 2004).



Gambar 8. Hasil PCR DNA Bakteri *L. asiaticum* dari sampel tanaman 2 bergejala Parsial menggunakan Primer 16S rDNA pada Gel Agarose 1%.

Keterangan : M) DNA marker. 1) DNA daun bergejala. 2) DNA dari kulit ranting daun bergejala. 3) DNA dari kulit cabang daun bergejala. 4) DNA dari kulit ranting daun tidak bergejala 2. 5) DNA daun tidak bergejala 2 ringan. 6) DNA dari kulit cabang daun tidak bergejala 2. 7) DNA daun tidak bergejala 1. 8) DNA dari kulit ranting daun tidak bergejala 1. 9) DNA dari kulit batang bawah. 10) DNA dari kulit cabang daun tidak bergejala1.

Hasil amplifikasi tanaman jeruk siam 2 menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik O11 dan O12b menunjukkan bahwa terdapat DNA *L.asiaticum* pada line 1, line 5 dan line 7 (gambar 8) yaitu daun bergejala daun tidak bergejala 1 dan daun tidak bergejala 2. Kulit cabang bergejala maupun tidak, kulit ranting bergejala dan tidak, serta kulit batang bawah tidak ditemukan DNA *L.asiaticum* yang ditunjukkan pada gel agarose 1 %.

Ditemukannya DNA *L.asiaticum* pada line 1, line 5 dan line 7, membuktikan bahwa *L.asiaticum* terdapat pada daun yang tidak menunjukkan gejala atau tampak sehat. Sebaran *L. asiaticum* diduga disebabkan oleh vektor *D.citri* yang menularkan dengan infeksi awal di daun. *L.asiaticum* belum menyebar ke ranting, cabang, dan batang bawah tanaman jeruk siam. Sesuai dengan hipotesis awal dan dibuktikan dengan deteksi menggunakan teknik PCR dapat dikatakan bahwa *L. asiaticum* belum menyebar secara merata keseluruhan bagian tanaman jeruk yang menunjukkan gejala parsial.

Dasar pengendalian yang dapat digunakan dengan ditemukannya *L. asiaticum* pada bagian tertentu tanaman jeruk adalah melakukan eradikasi pada bagian yang mengandung *L. asiaticum* agar tidak menyebar ke bagian tanaman jeruk yang lainnya, sehingga tanaman jeruk tetap dapat berproduksi. Gambar 9 dan 10

menunjukkan bagian tanaman yang positif mengandung *L.asiaticum* dan negatif atau tidak mengandung *L.asiaticum*, dengan gambar tersebut dapat diketahui bagian tanaman yang akan eradikasi dalam pengendalian penyakit CVPD secara parsial. Bagian dari tanaman 1 yaitu D, G, H yang perlu eradikasi karena pada daun yang menunjukkan gejala, ranting dari daun bergejala, dan daun yang tidak bergejala 1 positif mengandung *L.asiaticum*. Bagian tanaman 2 (A,B,C) yaitu daun bergejala dan daun tidak bergejala yang perlu eradikasi agar tanaman jeruk siam dapat diproduksi.

	<p>Gambar 9. Sketsa Tanaman 1. Keterangan : BB- : Batang bawah tanaman jeruk tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>. A- : Kulit Cabang dari Tanaman Jeruk yang tidak bergejala 1 tidak mengandung <i>L. asiaticum</i>. B- : Kulit Cabang dari Tanaman Jeruk yang tidak bergejala 2 tidak mengandung <i>L. asiaticum</i>. C- : Kulit Cabang dari Tanaman Jeruk yang daunnya bergejala parsial tidak mengandung <i>L. asiaticum</i>. D+ : Kulit Ranting dari daun yang bergejalaparsial mengandung <i>L.asiaticum</i> E- : Kulit Ranting dari daun yang tidak bergejala 1 tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>. F- : Kulit Ranting dari daun yang tidak bergejala 2 tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>. G+ : Daun Tanaman Jeruk yang bergejala parsial mengandung <i>L.asiaticum</i> H+ : Daun Tanaman Jeruk yang tidak bergejala 2 mengandung <i>L.asiaticum</i> I- : Daun Tanaman Jeruk yang tidak bergejala 1 tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>.</p>
	<p>Gambar 10 Sketsa Tanaman 2. Keterangan : BB- : Batang bawah tanaman jeruk tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>. A+ :Daun Tanaman Jeruk yang bergejala parsial mengandung <i>L.asiaticum</i> B+ :Daun Tanaman Jeruk yang tidak bergejala 1 mengandung <i>L.asiaticum</i> C+ :Daun Tanaman Jeruk yang tidak bergejala 2 mengandung <i>L.asiaticum</i> D-: Kulit Ranting dari daun yang bergejala parsial tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>. E-: Kulit Ranting dari daun yang tidak bergejala 1 tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>. F-: Kulit Ranting dari daun yang tidak bergejala 2 tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>. G- : Kulit Cabang dari daun yang bergejala tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>. H- : Kulit Cabang dari daun Jeruk yang tidak bergejala 1 tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>. I- : Kulit Cabang daun Jeruk yang tidak bergejala 2 tidak mengandung <i>L.asiaticum</i>.</p>

Selain melakukan eradikasi diperlukan pengendalian terhadap serangga vektor *D. citri* yang dapat menularkan penyakit CVPD dari tanaman sakit ke tanaman sehat. Pengendalian serangga vektor dapat dilakukan dengan insektisida maupun pengendalian hayati. Pengendalian hayati dapat berupa pelepasan musuh alami ke daerah ditemukannya *D. citri*, musuh alami dapat berupa predator dan parasitoid.

Wijaya (2003) mengatakan predator dan parasitoid yang ditemukan pada pertanaman jeruk di Bali yaitu *Curinus coeruleus*, *Menochilus sexmaculatus*, *Tetrastichus radiata*, dan *Diaphorencytrus alligarhesis*. Tanaman jeruk siam yang terserang penyakit dengan gejala parsial dapat digunakan untuk pembuatan bibit dengan mata tempel karena penyebaran *L. asiaticum* belum mencapai cabang maupun batang tanaman jeruk. Pembuatan bibit dari tanaman jeruk yang bergejala parsial dengan mata tempel menggunakan cabang dan ranting yang daunnya tidak bergejala CVPD belum mengandung *L. asiaticum*.

4. Kesimpulan dan Saran

4.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Tanaman jeruk siam yang menunjukkan gejala penyakit CVPD dengan gejala parsial disebabkan oleh *L. asiaticum*.
2. *L. asiaticum* pada gejala parsial ditemukan pada beberapa bagian tanaman seperti daun yang bergejala, daun tidak bergejala, dan ranting daun bergejala.
3. Pada Tanaman jeruk bergejala parsial *L. asiaticum* belum menyebar secara merata keseluruh bagian tanaman.

4.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dalam penelitian ini yaitu pengendalian yang dapat dilakukan pada tanaman jeruk yang menunjukkan gejala parsial adalah eradikasi secara parsial, yaitu dengan memotong bagian tanaman yang telah positif mengandung *L. asiaticum* dan pengendalian terhadap serangga vektor *D. citri*. Tanaman jeruk yang terserang penyakit CVPD dengan gejala parsial dapat digunakan untuk pembuatan bibit dengan mata tempel menggunakan cabang dan ranting yang daunnya tidak bergejala CVPD.

Daftar Pustaka

Anonim. 2012. Pengenalan Penyakit CVPD Pada Tanaman Jeruk dan Upaya Pengendaliannya. Dalam <http://sulsel.litbang.pertanian.go.id>, diakses pada 27 Juni 2015.

- Bove JM, Jogoueiix, Garnier M. 1996. PCR Detection of the two candidates *Liberobacter* species associated with greening diseases of citrus. *Molecular and Cellular Probes* 10:43-50.
- Sandrine, J., J.M. Bove, & M. Garnier. 1996. PCR detection of two candidates *Liberobacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes*. 10: 42.
- Tirtawidjaja, S. & R. Suharsojo. 1990. Penyakit CVPD merupakan bahaya laten bagi tanaman jeruk di Indonesia. *Perlindungan Tanaman Menunjang Terwujudnya Pertanian Tangguh dan Kelestarian Lingkungan*. PT. Agricon. hlm 299 – 310.
- 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. 2000. Isolasi Resisten terhadap CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) dengan Metode Transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Laporan Riset Unggulan Terpadu V. Universitas Udayana. Denpasar.
- 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, L. Sulistyowati, dan IN. Wijaya, 2004. Penyakit CVPD Pada Tanaman Jeruk Analisis Baru Berbasis Bioteknologi. Udayana Press.
- Yuniti, Diah, IGA. 2002. Penyebaran Bakteri *Liberobacter asiaticum* pada Tanaman Jeruk dalam beberapa Tingkat Gejala Serangan Penyakit CVPD . Thesis Program Pascasarjana Universitas Udayana.