

Deteksi Penyakit Tanaman Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) yang Tumbuh Disekitar Tanaman Jeruk Bergejala *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

NI KADEK DWI PASARI
I GEDE PUTU WIRAWAN*)
MADE SRITAMIN

Program Studi Agroekoteknologi Pertanian Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar 80231 Bali
*)Email: igpwirawan@yahoo.com

ABSTRACT

Detection of Chilli plant (*Capsicum frutescens* L.) which Grow in the Area of Citrus Cultivation that had symptoms of *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) Using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Technique

Liberibacter bacteria live and thrive inside the phloem tissue CVPD affected plants, the bacteria exhibit a progressive degeneration of the phloem tissue that inhibit phloem nutrient transport through the entire plant. As the attack of *Liberibacter asiaticus* cause *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) disease in citrus plant, it is necessary to do research on the chilli plant around citrus plant area to know whether bacteria of *Liberibacter* also attack the chilli plant by using PCR. The results of this study indicate that the chilli plants with CVPD symptoms which are suspected to be caused by the bacterium *Liberibacter* by using *Liberibacter asiaticus* primer and *Liberibacter solanaceae* which is them specific primer of 16S rDNA are not proven. The result showed chilli plants with similar symptom to CVPD in Mangguh village, Kintamani sub-district were not to be caused by *Liberibacter asiaticus* and *Liberibacter solanaceae*.

Keywords: Chili plants and *L. solanaceae* bacteria.

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Bakteri *Liberibacter asiaticus* hidup dalam pembuluh floem pada tanaman jeruk yang terinfeksi penyakit CVPD dan menimbulkan gejala yang khas, bakteri ini belum bisa dibiakkan pada media buatan. Penyakit CVPD disebabkan oleh bakteri *Liberibacter asiaticus* yang ditularkan oleh serangga vektor *Diaphorina citri* Kuw, tergolong dalam subdivisi Protobacteria (Sandrine *et al.*, 1996). Penularan penyakit CVPD di alam tergantung pada kepadatan populasi *D. citri* sebagai serangga vektor dan keberadaan sumber inokulum (Chen, 1998). Gejala yang ditimbulkan penyakit

CVPD yaitu klorosis pada daun yang menyebabkan daun menguning, warna tulang daunnya menjadi hijau tua, daunnya lebih tebal, kaku dan ukurannya menjadi lebih kecil.

Adanya serangan oleh bakteri *Liberibacter asiaticus* penyebab penyakit CVPD pada tanaman jeruk, maka perlu juga dilakukannya penelitian pada tanaman cabai rawit yang berada disekitar areal tanaman jeruk untuk mengetahui apakah bakteri *Liberibacter asiaticus* penyebab penyakit CVPD pada tanaman jeruk juga menyerang tanaman cabai rawit disekitaran areal pertanaman tanaman jeruk. Hal ini dilakukan melihat dari kebiasaan petani di Desa Mangguh, Kecamatan Kintamani yang mengupayakan pertanian sistem tumpang sari antara tanaman jeruk dan cabai.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah tanaman cabai rawit di areal tanaman jeruk di Desa Mangguh terserang bakteri *Liberibacter asiaticus* atau *Liberibacter solanaceae*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah tanaman cabai rawit di areal tanaman jeruk di Desa Mangguh terserang bakteri *Liberibacter asiaticus* atau *Liberibacter solanaceae*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada para petani, apakah tanaman cabai rawit yang ditanam disekitar pertanaman jeruk terserang bakteri *Liberibacter asiaticus* atau *Liberibacter solanaceae* penyebab penyakit CVPD.

2. Metode Penelitian

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboraturium Sumber Daya Genetika dan Biologi molekuler Universitas Udayana, mulai bulan Januari 2017 sampai bulan April 2017 dan pengambilan sampel daun cabai rawit yang bergejala adanya serangan bakteri *Liberibacter solanaceae* dilakukan di desa Mangguh Kecamatan Kintamani.

2.2 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel daun tanaman jeruk dan sampel daun tanaman cabai rawit, nitrogen cair, aquadest, Proteinase Kit, PCR master mix solution, Marker DNA 1 kb ladder, Loading dye, agarose 1g, TAE 100ml, Lysis Buffer 400µl PL-1, 10µl RNase A, Buffer PC 450µl, Buffer PW1 400µl, Buffer PW2 700µl, dan primer spesifik 16S rDNA khusus bakteri *Liberibacter solanaceae* yaitu: Forward Primer rp01R 5' CTCTAAGATTTTCGGTTGGTT 3', dan Reverse Primer rp01R 5' TATATCTATCGTTGCACCAG 3' sedangkan primer spesifik khusus CVPD 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' DNA yang teramplifikasi dengan primer tersebut berukuran 1160 bp.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gunting, timbangan, mortar, alat PCR, mikropipet, ependof (tabung mikro), *microcentrifuge*, pestle, vortex, UV Transluminator, alat elektroforesis, *collectumtube*, water bath, kertas parafilm, spatula, kertas label, dan kamera digital.

2.3 Pelaksanaan Penelitian

2.3.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan mengamati secara visual tanaman cabai rawit yang menunjukkan gejala CVPD yang diduga disebabkan oleh bakteri *Liberibacter solanaceae*. Kemudian daun yang menunjukkan gejala tersebut ditentukan sebagai sampel. Daun yang bergejala diambil dari beberapa cabang yang berbeda.

2.3.2 Deteksi Penyakit Bakteri *Liberibacter solanaceae*

Sampel tanaman cabai rawit 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 (*Polymerase Chain Reaction*).

2.3.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah deteksi keberadaan bakteri *Liberibacter solanaceae* pada tanaman cabai dengan primer spesifik 16S rDNA menggunakan metode PCR, yaitu adanya pita DNA pada sel dengan ukuran 1160bp.

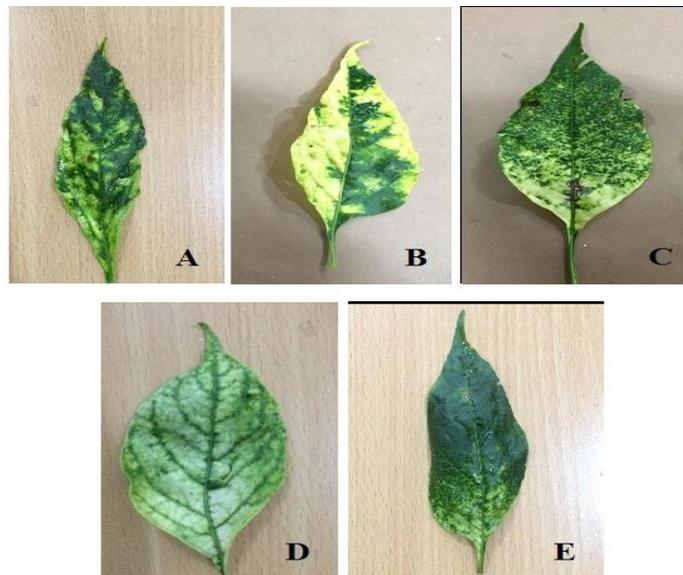
3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Kondisi Tanaman Cabai Di Lapangan

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilaksanakan di desa Mangguh Kecamatan Kintamani ditemukan terdapat beberapa tanaman cabai rawit yang menunjukkan gejala serangan CVPD yang diduga disebabkan oleh bakteri *Liberibacter solanaceae*. Hal ini dilihat dari jumlah daun yang menunjukkan gejala klorosis. Dari tanaman yang bergejala tersebut dipilih daun cabai rawit dari masing-masing pohon sebagai sampel untuk di deteksi secara molekuler.

Sampel tanaman Cabai rawit yang diamati memiliki ciri-ciri gejala daun menguning (klorosisnya sudah merata) pada lamina daun dan tulang daunnya berwarna lebih tua. Ditemukan pula beberapa sampel yang memiliki ciri-ciri klorosis tidak merata pada lamina daun dan warna tulang daun tidak berbeda jauh dengan warna lamina. Hal ini sejalan dengan pernyataan (Liefting *et al.*, 2009) pada tanaman tomat (*Solanum lycopersicum*) dan paprika (*Capsicum annuum*) bahwa terdapat gejala daun menguning dan menebal dengan warna tulang daun tetap hijau, bentuk

daun terpuntir, menyusut serta keriting. Penyakit ini ditemukan diperkebunan tomat komersial pada rumah kaca di Auckland dan mengakibatkan kerugian besar.



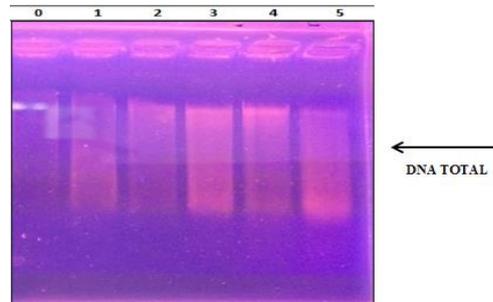
Gambar 1. Daun tanaman cabai (*Capsicum frutescens* L) A, B, C, D, dan E yang diduga bergejala serangan bakteri *Liberibacter solanaceae*.

Dugaan sementara berdasarkan gambar tersebut dapat dilihat bahwa kelima sampel daun tanaman cabai rawit tersebut mengalami gejala klorosis. dari kelima sampel daun cabai rawit yang bergejala di Desa Mangguh terlihat cocok dengan pernyataan Penelitian oleh (Liefting *et al.*, 2009) pada tanaman tomat (*Solanum lycopersicum*) dan paprika (*Capsicum annuum*) yang ditemukan diperkebunan tomat komersial pada rumah kaca di Auckland yang disebabkan oleh bakteri *Liberibacter solanaceae*.

Menurut Sarwono (1995), klorosis terjadi karena pembentukan klorofil berkurang sehingga terjadinya penurunan aktivitas fotosintesis pada tanaman. Proses terjadinya klorosis diawali dengan tertularnya jaringan tanaman oleh patogen melalui stilet serangga vector pada saat mengisap cairan tanaman. Selanjutnya patogen yang terdapat dalam floem tersebar ke bagian-bagian tanaman bersamaan dengan proses traslokasi bahan organik. Kehadiran patogen dalam jumlah yang relative banyak dapat menimbulkan gejala klorosis bahkan terjadinya nekrosis pada floem tulang daun. Hal ini mengakibatkan terhambatnya penyaluran pasokan makanan yang dibawa dari akar menuju kedaun oleh bakteri. Bakteri memerlukan makan untuk hidup, maka mereka mengambil makanan yang dibawa oleh akar menuju daun untuk melakukan fotosintesis. Apabila cadangan makanannya diambil oleh bakteri, maka bakteri akan mampu terus berkembang membentuk atau mengeluarkan karbohidrat yang berlebihan sehingga menutup aliran suplai makanan dari akar untuk daun (Sarwono, 1995).

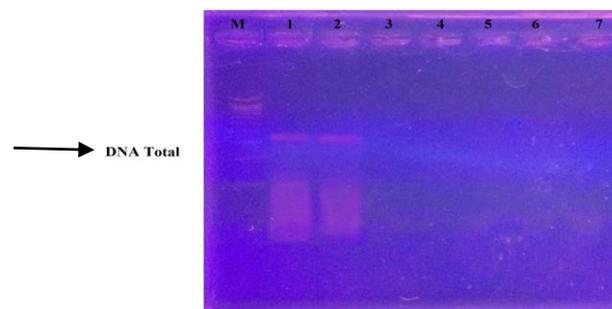
3.2 Hasil Isolasi Total DNA

Deteksi hasil isolasi total DNA tanaman cabai rawit yang bergejala menunjukkan adanya pita DNA pada elektroforesis *gel agarose* 1%.



Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA total sampel daun tanaman cabai rawit (Kolom 1 : Daun tanaman cabai rawit sampel A , Kolom 2 : Daun tanaman cabai rawit sampel B, Kolom 3 : Daun tanaman cabai rawit sampel C, Kolom 4 : Daun tanaman cabai rawit sampel D, dan Kolom 5 : Daun tanaman cabai rawit sampel E)

Hasil elektroforesis DNA total kelima sampel yang digunakan menunjukkan bahwa DNA total tanaman cabai rawit sudah terisolasi dengan baik. Namun, karena bakteri *Liberibacter* masih belum dapat dikultur sehingga tidak memungkinkan untuk mengisolasi DNANYA saja, maka dilakukan pendekatan dengan isolasi DNA total tanaman yang diinginkan untuk dideteksi (Sandrine *et al.*, 1994). 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. Hasil isolasi DNA total pada tanaman cabai rawit dibuktikan pada Gambar 2. Setelah DNA total ditemukan maka perlu dilakukan amplifikasi dengan metode PCR untuk membuktikan apakah tanaman cabai rawit di desa Mangguh kecamatan kintamani terserang oleh bakteri penyebab penyakit CVPD pada tanamn jeruk. Hal ini dilakukan berdasarkan gejala yang dilihat di perkebunan cabai rawit menunjukkan seperti gejala serangan oleh bakteri *Liberibacter*.



Gambar 3. Hasil elektroforesis DNA total sampel daun tanaman jeruk.

Dari Gambar 3 diatas, pada kolom 1 dan 2 menunjukkan bahwa DNA daun tanaman jeruk sudah terisolasi dengan baik. Setelah DNA total ditemukan maka

perlu dilakukannya proses amplifikasi PCR untuk membuktikan bahwa tanaman jeruk yang dijadikan sebagai sampel terserang penyakit CVPD yang disebabkan oleh bakteri *Liberibacter asiaticus*. Tahapan amplifikasi dengan teknik PCR diperlukan kualitas DNA template yang baik dan program yang sesuai agar hasil DNA yang diperoleh tampak bagus.

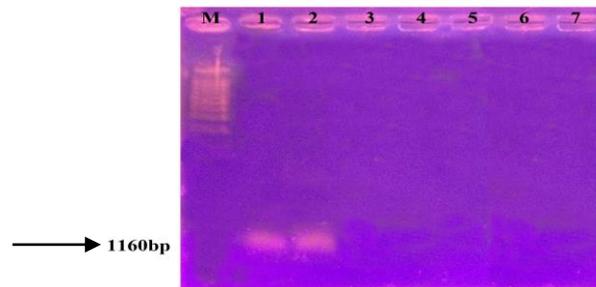
3.3 Hasil Amplifikasi DNA Menggunakan UV-Transilluminator

Analisis PCR tanaman cabai rawit yang menunjukkan gejala serangan bakteri *Liberibacter solanaceae* dengan menggunakan primer spesifik 16S rDNA diperoleh hasil bahwa tanaman yang bergejala pada hasil elektroforesis *gel agarose* 1% tidak disebabkan oleh bakteri *Liberibacter solanaceae*. Hal ini dibuktikan pada hasil amplifikasi DNA dengan tehnik PCR menggunakan primer khusus bakteri *Liberibacter solanaceae* pada sampel daun tanaman cabai rawit, tidak menunjukkan adanya pita DNA bakteri *Liberibacter solanaceae* di masing-masing sampel yang digunakan, disajikan pada Gambar 4. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada seluruh tanaman cabai rawit yang bergejala di desa Mangguh kecamatan Kintamani yang bergejala tidak disebabkan oleh serangan bakteri *Liberibacter solanaceae*.



Gambar 4. Hasil amplifikasi DNA menggunakan UV-Transilluminator sampel daun tanaman jeruk pada kolom 1 dan 2 sedangkan sampel daun tanaman cabai rawit pada kolom 3, 4, 5, 6 dan 7 menggunakan primer bakteri *Liberibacter solanaceae*.

Pada Gambar 4 diatas, merupakan hasil amplifikasi DNA dengan PCR sampel daun tanaman jeruk pada kolom 1 dan 2 sedangkan sampel daun tanaman cabai rawit pada kolom 3, 4, 5, 6 dan 7 menggunakan primer bakteri *Liberibacter solanaceae*, dimana pada *gel agarose* 1% tidak tampak adanya pita DNA sama sekali. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman cabai rawit di desa Mangguh tidak disebabkan oleh bakteri *Liberibacter solanaceae*.



Gambar 5. Hasil amplifikasi DNA menggunakan UV-Transilluminator sampel daun tanaman jeruk dan sampel daun tanaman cabai rawit menggunakan primer CVPD. (1) Kolom 1 dan 2 sampel daun jeruk menggunakan primer CVPD, (2) Kolom 3, 4, 5, 6 dan 7 sampel daun cabai rawit menggunakan primer CVPD.

Pada sampel tanaman jeruk yang terserang CVPD ditemukan adanya pita DNA dengan ukuran 1160bp pada *gel agarose* 1%, disajikan pada Gambar 5, kolom 1 dan 2, sedangkan pada kolom 3, 4, 5, 6 dan 7 sampel daun tanaman cabai rawit tidak menunjukkan adanya pita DNA. Hal ini membuktikan bahwa tanaman cabai rawit di desa Mangguh kecamatan Kintamani tidak terserang oleh bakteri *Liberibacter solanaceae*.

4. Simpulan dan Saran

4.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian dan pembahasan yang telah dijelaskan diatas, dapat peneliti simpukan bahwa :

Berdasarkan hasil deteksi melalui teknik PCR pada sampel tanaman cabai rawit yang menunjukkan gejala seperti penyakit CVPD dengan menggunakan primer spesifik 16S rDNA ternyata bukan disebabkan oleh bakteri *Liberibacter asiaticus* ataupun *Liberibacter solanaceae*.

4.2 Saran

Berdasarkan dari simpulan diatas, diharapkan perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk menemukan penyebab penyakit pada tanaman cabai tersebut. Hal ini dilakukan agar lebih mudah mengambil langkah pengendalian yang tepat guna mengurangi tingkat kerugian.

Daftar Pustaka

- Chen, C.N. 1998. Ecology of The Insect Vector of Citrus Systemic Diseases and Their Control in Taiwan. Citrus Greening Control Project in Okinawa, Japan. Extension Bulletin 459 : 1-5.
- Liefting, W.L., B.S Weir., & S.R. Pennycook., dan G.R.G., Clover. 2009. Candidatus *Liberibacter solanacearum*, associated with plants in the family Solanaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2009), 59, 2274–2276.

- Sandrine, J., J.M. Bove, and M. Garnier. 1994. The Phloem-limited Bacterium of Greening Disease of Citrus is a Member of the a Subdivision of the Proteobacteria. *Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 370-386.
- Sandrine, J., J.M. Bove and M. Garnier. 1996. PCR Detection of Two *Candidatus liberobacter* Spesies Assosiated with Greening Disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes* (1996) 10, 43–50.
- Sarwono, B. 1995. *Jeruk Nipis dan Pemanfaatannya*. PT. Penebar Swadaya.
- 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.*