

Struktur Histopatologi Tangkai Daun Jeruk Siam (*Citrus nobilis* L. var. *microcarpa*) Terinfeksi *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) pada Tingkat Serangan Ringan dan Berat

TRIAN WANGSA PURWANTO
MADE SRITAMIN^{*)}
NI LUH MADE PRADNYAWATHI

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

^{*)}Email: madesritamin@gmail.com

ABSTRACT

Histopathology Structure of Siam Citrus Petiole (*Citrus nobilis* L. var. *microcarpa*) Infected by *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) at Mild and Severe Attack Rates

The main cause of decreasing the production of *Citrus nobilis* L. var. *microcarpa* in Indonesia is the presence of CVPD disease (*Citrus Vein Phloem Degeneration*). *Citrus nobilis* L. var. *microcarpa* infected by CVPD showing anatomic and morphological changes. The main objective of this study was to determine anatomic changes in petiole tissue of *Citrus nobilis* L. var. *microcarpa* infected by CVPD at the level of mild and severe attacks. The research was conducted in Citrus field, Kintamani, Bangli-Bali and Biomolecular and Genetic Resources Laboratory, Faculty of Agriculture, Udayana University in August-September 2018. The result for visual observation showed that the presentation of CVPD symptoms in the field was 46% and attack intensity was 39.6%. Samples were identified using PCR method with O11 and O12c markers. DNA visualization amplified on 1% agarose showed appearing of DNA band for samples with mild and severe attack rates. Samples gave positive reaction to *Liberibacter asiaticus*. It showed that the samples were positive infected by CVPD disease. Preparations of petioles were made to observe the histological structure microscopically. The result showed that there were changes on histological structure of petioles infected CVPD. Petioles infected CVPD at mild symptom and severe symptom showing cell wall thickening on epidermis, shape changes on cortex and there were an accumulation of starch, lysis and necrosis showing on floem with severe attack rate, and there were stretching between xylem cells.

Keywords: histopathology structure, *C. nobilis* L. var. *microcarpa*, CVPD, PCR

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Jeruk (*Citrus sp.*) merupakan salah satu komoditas hortikultura unggulan dan bernilai ekonomi tinggi. Jeruk menempati posisi ketiga sebagai buah-buahan penting di dunia setelah apel dan pisang (Savita et al., 2012). Kandungan vitamin C jeruk tergolong tinggi yaitu sebesar 18,9 mg dalam 100 g jeruk (Helmiyeni et al., 2008). Oleh karena itu jeruk banyak dimanfaatkan sebagai sumber asupan vitamin C yang dapat dikonsumsi dalam bentuk buah segar maupun produk olahan seperti jus dan selai.

Sentra produksi jeruk di Indonesia tersebar di beberapa daerah, salah satunya Bali. Berdasarkan data BPS (2017), produksi jeruk di Bali pada Tahun 2011-2013 mengalami peningkatan yaitu 198.743 ton menjadi 140.581 ton, namun mengalami penurunan sebesar 30% pada Tahun 2014 menjadi 98.524 ton. Penyebab utama rendahnya produksi jeruk di Bali adalah adanya serangan penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD).

Gejala penyakit CVPD secara umum sangat mirip seperti gejala kekurangan hara (Timmer et al., 2003). Pada tingkat serangan CVPD berat tanaman mengalami gejala klorosis. Gejala klorosis ini sering disalahartikan sebagai kekurangan hara, karena klorosis akibat penyakit CVPD mirip dengan gejala kekurangan hara Zink (Zn) (Timmer et al., 2003). Hal ini mengakibatkan sering terjadi kekeliruan diagnosis penyakit, sehingga penanganan gangguan kesehatan tanaman mengalami kesulitan. Penyakit ini sulit untuk didiagnosis secara akurat jika hanya menggunakan cara konvensional, cara ini kurang spesifik karena adanya akumulasi karbohidrat (Dwiastuti, 2001).

Fan et al (2013) menyatakan bahwa anatomi akar, batang serta daun jeruk lemon dan jeruk manis yang terinfeksi patogen *Liberibacter asiaticus* mengalami kerusakan jaringan floem, penyumbatan pembuluh tapis dan terjadi akumulasi pati. Perubahan morfologi dan anatomi jeruk yang terinfeksi CVPD tersebut diduga disebabkan oleh kerusakan jaringan floem. Jaringan floem merupakan jaringan pembuluh yang berfungsi untuk mengangkut nutrisi dari daun ke seluruh bagian tanaman lainnya.

Perubahan struktur dan anatomi jaringan tersebut mengakibatkan terganggunya fungsi organ tanaman sehingga pertumbuhan tanaman terhambat dan berisiko mengalami kematian. Dengan demikian perlu dilakukan pengamatan lebih dini untuk mendeteksi adanya penyakit CVPD pada tanaman jeruk, maka dilakukanlah penelitian tentang histopatologi terkait vitalnya fungsi sel dan jaringan tanaman. Pengamatan struktur sel dan jaringan jeruk dapat dilakukan melalui pengamatan mikroskopis dengan pembuatan preparat sayatan melintang tangkai daun jeruk.

1.2 Perumusan Masalah

Bagaimana perubahan anatomi jaringan tanaman jeruk yang terserang bakteri *Liberibacter asiaticus* penyebab penyakit CVPD pada tingkat serangan ringan dan

berat melalui pengamatan secara mikroskopis sayatan melintang jaringan tangkai daun menggunakan metode mikroteknik tumbuhan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui perubahan anatomi jaringan tanaman jeruk yang terserang bakteri *Liberibacter asiaticus* penyebab penyakit CVPD pada tingkat serangan ringan dan berat melalui pengamatan secara mikroskopis.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi tentang perubahan struktur anatomi jaringan tangkai daun jeruk yang terinfeksi CVPD dengan pendekatan secara histopatologi.
2. Dapat dijadikan sebagai referensi untuk melakukan deteksi CVPD sedini mungkin pada jeruk sesuai dengan tingkat serangan yang terjadi di lapangan.

1.5 Hipotesis

Pada tanaman jeruk yang terserang bakteri *Liberibacter asiaticus* penyebab penyakit CVPD terjadi perubahan struktur anatomi jaringan yang berbeda pada tingkat serangan ringan dan berat.

2. Metode Penelitian

2.1 Waktu dan Tempat

Sampel tangkai daun jeruk diambil dari lahan jeruk milik petani di Desa Kintamani, Bangli-Bali. Pembuatan preparat sayatan melintang tangkai daun jeruk dilakukan di Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gajah Mada. Deteksi keberadaan *Liberibacter asiaticus* tangkai daun jeruk dengan metode PCR, pengamatan preparat sayatan melintang tangkai daun jeruk dilakukan di Laboratorium UPT Sumberdaya Genetika dan Biomolekuler, Universitas Udayana. Penelitian dilaksanakan selama 2 bulan dimulai dari Bulan Agustus sampai September 2018.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain gunting, timbangan, mortar, mikropipet, eppendorf (tabung mikro), sentrifugator, mesin vorteks, UV transiluminator, mesin elektroforesis, mesin PCR, alat tulis, bunsen, cawan petri, gelas objek, gelas penutup, gelas ukur, hotplate, kamera, kuas, mikrotom putar, mikroskop cahaya, oven, pinset, pipet tetes, pisau, silet, dan staining jar. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daun tanaman jeruk siam yang sehat yang bergejala CVPD ringan dan berat, aquades, 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* pada tanaman yang menunjukkan gejala serangan CVPD

yaitu OI1 forward (5'-GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG C-3') dan OI2c reverse (5'-GCC TCG CGA CTT CGC AACCCA T-3'), DNA yang teramplifikasi dengan primer tersebut berukuran 1160 bp, albumin, larutan fiksatif FAA, asam asetat glasial, alkohol dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%, 96%, dan 100%, formalin 10%, Canada Balsam, parafin, safranin 1%, dan *xylol*.

Penelitian lapangan dilakukan melalui pengamatan dan perhitungan persentase jumlah tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD dan intensitas serangan penyakit CVPD secara visual pada 100 sampel tanaman di lapang. Lahan jeruk yang diamati adalah lahan jeruk siam milik petani yang berlokasi di Desa Kintamani, Kecamatan Kintamani, Kabupaten Bangli, Provinsi Bali. Sampel penelitian diambil yaitu berupa daun dan tangkai daun jeruk siam pada tanaman terpilih yang menunjukkan penyakit CVPD ringan dan berat serta tanpa gejala CVPD sebagai kontrol masing-masing 3 helai.

Deteksi keberadaan *Liberibacter asiaticus* penyebab CVPD dilakukan secara molekuler yaitu dengan teknik PCR, meliputi tiga tahapan yaitu isolasi DNA total, amplifikasi DNA dan visualisasi hasil PCR. Isolasi total DNA dilakukan dengan menghaluskan daun sebanyak ± 10 mg dengan nitrogen cair, kemudian disuspensi menggunakan DNA Kit sehingga didapatkan pellet DNA untuk diamplifikasi. Analisis PCR untuk mendeteksi keberadaan patogen penyakit CVPD dilakukan dengan menggunakan primer spesifik dari 16S rDNA. 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 92°C selama 30 detik dengan satu siklus ulangan, b) Empat puluh siklus yang terdiri atas pemisahan utas DNA (Denaturasi) pada suhu 92°C selama 60 detik, penempelan primer pada DNA (Annealing) pada suhu 60°C selama 30 detik dan sintesis DNA (Elongation) pada suhu 72°C selama 90 detik, c) Penyesuaian utas atas dan bawah (Extension) pada suhu 72°C selama 90 detik dengan satu siklus ulangan. Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada gel agarose 1%, penyangga untuk elektroforesis digunakan penyangga TAE 1% yang mengandung 40 mM sodium EDTA. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama 1 jam. Selanjutnya dilihat dengan transilluminator UV.

Pembuatan sayatan melintang daun dan ranting menggunakan metode parafin meliputi tahapan fiksasi, pencucian, pewarnaan I, dehidrasi, dealkoholisasi, parafinasi, pembenaman, penyayatan, penjernihan, pewarnaan II, penutupan, dan pelabelan.

Variabel yang diamati adalah persentase jumlah tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD, intensitas kerusakan tanaman yang terserang CVPD, visualisasi hasil PCR dan pengamatan bentuk dan struktur jaringan tangkai daun jeruk dari luar ke dalam yaitu jaringan dermal (epidermis), jaringan dasar (korteks dan mesofil), jaringan pembuluh (xilem dan floem) serta pengamatan pati pada jaringan dasar. Data-data yang diperoleh dari hasil pengamatan disajikan secara deskriptif dalam bentuk visual (foto).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 *Kondisi Umum Lahan Jeruk Siam Kintamani, Bangli*

Penelitian dilakukan di lahan jeruk milik petani Banjar Kayu Kapas, Desa Kintamani, Kecamatan Kintamani, Kabupaten Bangli, Provinsi Bali dengan ketinggian tempat 650 - 1.110 m dpl. Luas daerah pertanaman jeruk adalah \pm 50 are. Batas-batas areal pertanaman yaitu sebelah utara berbatasan dengan Desa Batur, sebelah selatan berbatasan dengan Desa Belancang, sebelah timur berbatasan dengan Banjar Wanagiri dan sebelah barat berbatasan dengan Banjar Glagah Linggah. Jumlah tanaman jeruk yang ditanam adalah 400 tanaman dengan umur tanam 5 tahun. Jarak tanam antar tanaman adalah 3,5 m x 3,5 m. Perlakuan agronomis yang dilakukan oleh petani yaitu pemberian pupuk NPK, kotoran sapi dan sekam, sedangkan pestisida yang digunakan adalah fungisida skor dan isektisida sidador.

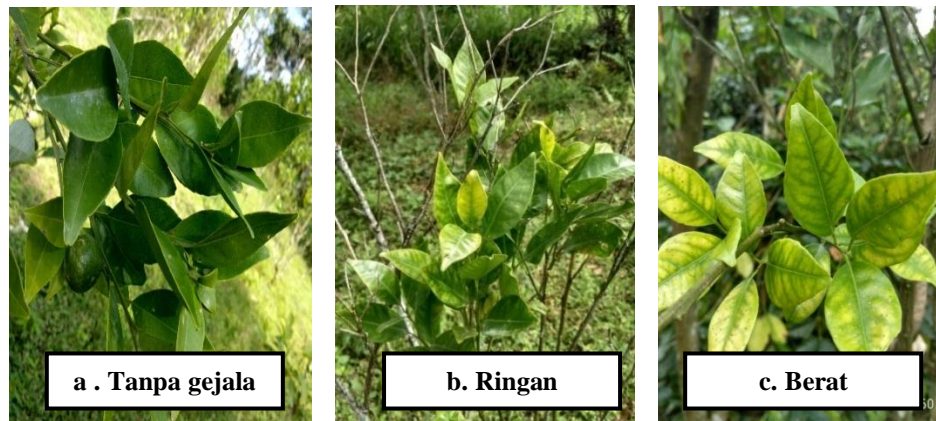


Gambar 1. Kondisi lahan penelitian tanaman jeruk siam di Desa Kintamani

Hasil pengamatan pada pertanaman jeruk di Desa Kintamani adalah seluruh lahan ditanami jeruk siam (*Citrus nobilis L. var. microcarpa*) (Gambar 1). Ciri morfologi jeruk siam yaitu tinggi tanaman sekitar 3 - 4 meter. Batang tanaman berduri jarang. Panjang duri sekitar 1-3 cm. Warna daun hijau cerah kekuningan. Panjang daun sekitar 2 - 4 cm sedangkan lebar daun sekitar 2 - 3 cm. Tanaman berbentuk tegak bercabang, percabangan mulai dari 60 - 150 cm dari permukaan tanah.

3.2 *Gejala penyakit CVPD pada tanaman jeruk*

Hasil pengamatan visual pada pertanaman jeruk siam di Kintamani ditemukan gejala klorosis yang menyerupai gejala khas penyakit CVPD. Menurut Wijaya (2003) secara umum, gejala khas penyakit CVPD adalah terjadi klorosis atau menguning pada daun, warna tulang daun menjadi hijau tua, daun lebih tebal, kaku dan ukurannya lebih kecil.



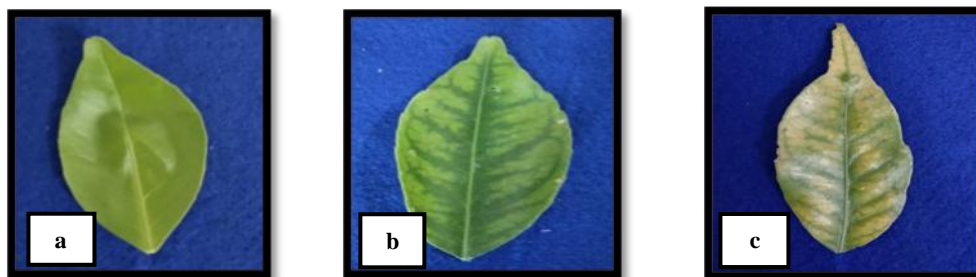
Gambar 2. Tanaman jeruk siam yang bergejala penyakit CVPD di lahan Kintamani dengan tingkat serangan yang berbeda.

Terdapat variasi gejala klorosis yang berbeda setiap tanaman. Tanaman yang sehat atau tidak bergejala penyakit CVPD keseluruhan daunnya berwarna hijau seperti ditunjukkan pada gambar 2a. Tanaman yang bergejala penyakit dengan tingkat serangan ringan menunjukkan klorosis secara parsial atau sebagian pada daun jeruk. Lamina daun nampak berwarna kuning sedangkan tulang daun masih berwarna hijau dapat dilihat pada gambar 2b. Sedangkan tanaman dengan tingkat serangan berat menunjukkan klorosis eksekif hampir pada seluruh daun dan tajuk tampak kerdil. Gejala klorosis pada bagian pucuk daun terlihat sangat jelas seperti pada gambar 2 c.

Perbedaan gejala klorosis antar tanaman di lahan Kintamani diduga karena pengaruh lingkungan dan variasi distribusi bakteri yang tidak beraturan. Secara visual dapat diamati bahwa sebagian tanaman memiliki tajuk yang normal dengan warna daun hijau, sedangkan sebagian tanaman lainnya mengalami klorosis berat ditandai dengan tajuk yang kerdil dan daun didominasi warna kekuningan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Wirawan *et al* (2003) yang menyatakan bahwa variasi gejala klorosis pada tanaman jeruk dapat disebabkan oleh kondisi iklim, umur tanaman atau daun, intensitas serangan, atau perbedaan strain bakteri *Liberibacter asiaticus* yang menyerang tanaman. Sedangkan Adiartayasa *et al* (2012), melaporkan adanya variasi gejala klorosis yang disebabkan karena pengaruh variasi genetik bakteri penyebab penyakit CVPD, pengaruh asal bibit dan variasi distribusi bakteri pada tanaman di lahan jeruk Kabupaten Karangasem.

Berdasarkan pengamatan pada 100 tanaman jeruk, jumlah tanaman bergejala CVPD sebanyak 46 tanaman. sedangkan tanaman tanpa gejala sebanyak 54 tanaman. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa persentase tanaman jeruk yang bergejala CVPD sebesar 46%. Intensitas serangan CVPD di lahan jeruk adalah 39,6% dengan rincian sebanyak 54 tanaman tidak bergejala CVPD (0% pucuk menunjukkan gejala CVPD), 16 tanaman bergejala ringan (1%-25% pucuk menunjukkan gejala CVPD), 12 tanaman bergejala sedang (25%-50% pucuk menunjukkan gejala CVPD), 14 tanaman bergejala berat (50%-75% pucuk menunjukkan gejala CVPD) dan 4 tanaman bergejala sangat berat/ puso (75%-100% pucuk menunjukkan gejala

CVPD). Dengan demikian, secara umum lahan pertanaman jeruk siam Kintamani terinfeksi CVPD dengan tingkat serangan sedang.



Gambar 3. Sampel daun jeruk siam

Keterangan : (a) Daun tanaman tanpa gejala penyakit CVPD, (b) Daun tanaman bergejala penyakit CVPD ringan, dan (c) Daun tanaman bergejala penyakit CVPD berat.

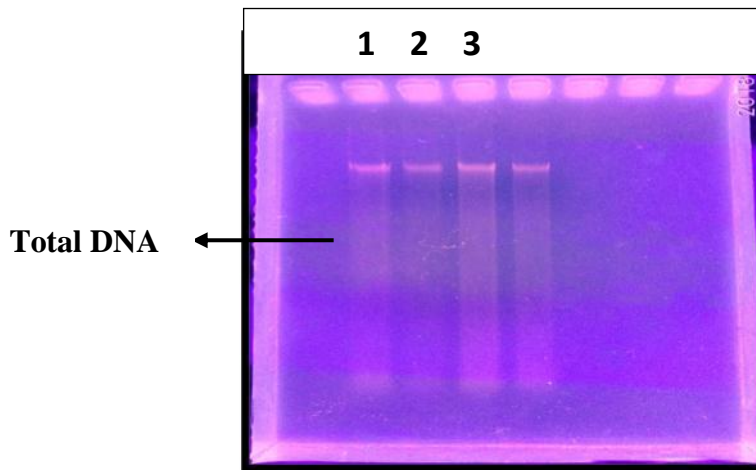
Infeksi penyakit CVPD yang disebabkan oleh *Liberibacter asiaticus* mengakibatkan adanya gangguan fisiologis pada tanaman. Gangguan fisiologis terjadi karena massa bakteri menyebabkan penghambatan transportasi nutrisi. Jaringan floem tertutupi oleh massa bakteri yang kemudian mengakibatkan degenerasi sel-sel floem sehingga terjadi hambatan nutrisi dari daun ke seluruh jaringan tanaman lainnya. Hal ini mengakibatkan terjadinya klorosis pada tanaman yang bergejala CVPD pada tingkat serangan ringan dan berat ditandai dengan perubahan warna daun menjadi kekuningan dari tepi daun menuju tulang daun, sedangkan hal serupa tidak terjadi pada daun tanpa gejala (Gambar 3). Tulang daun pada tanaman yang bergejala CVPD mengalami pengerasan sehingga ketika diraba maka daun akan terasa lebih kaku dan cenderung lebih melengkung kedua tepinya ke arah dalam. Pengerasan tulang daun berhubungan dengan xilem primer yang mengalami penonjolan ke epidermis (Su and Hung, 1990).

3.3 Deteksi Bakteri Penyebab CVPD dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)

Daun jeruk tanpa gejala, bergejala CVPD ringan dan bergejala CVPD berat dideteksi keberadaan bakteri *Liberibacter asiaticus* yang terkandung dalam DNA daun secara molekuler menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Primer yang digunakan adalah primer spesifik dari 16S rDNA yaitu primer OI1 *forward* (5'GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG C 3') dan Primer OI2c *reverse* (5' GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T 3'). Primer spesifik tersebut telah banyak digunakan untuk mendeteksi bakteri penyebab CVPD termasuk di Indonesia. Taufik *et al* (2010) dan Meitayani *et al* (2014) menggunakan primer tersebut untuk mendeteksi sampel jeruk dari Sulawesi Tenggara dan Bali.

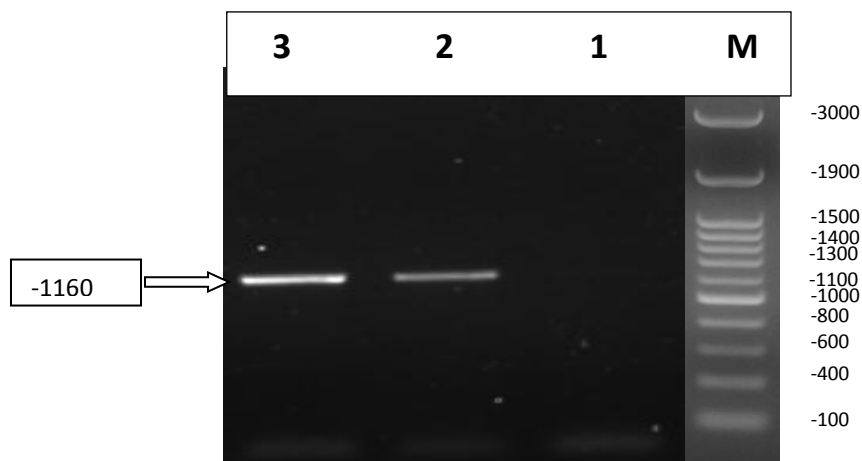
Hasil isolasi total DNA daun jeruk pada elektroforesis gel agarose 1% menunjukkan bahwa terdapat pita total DNA pada kolom 1, 2 dan 3 namun tampak

semir dan masih terdapat RNA (Gambar 4). Adanya pita DNA menunjukkan bahwa DNA tanaman sudah terisolasi dengan baik. Hasil isolasi total DNA tanaman kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR. Bakteri CVPD belum dapat dikultur sehingga perlu dilakukan pendekatan dengan mengisolasi DNA total tanaman yang diinginkan untuk dideteksi dan memperoleh kualitas DNA template yang baik. Taylor (1993) menyatakan bahwa amplifikasi dengan metode PCR memerlukan kualitas DNA yang baik.



Gambar 4. Hasil elektroforesis DNA total daun jeruk siam.

Keterangan : (1) DNA total tangkai daun jeruk tanpa gejala penyakit CVPD, (2) DNA total tangkai daun jeruk bergejala penyakit CVPD ringan, dan (3) DNA total tangkai daun jeruk bergejala penyakit CVPD berat.

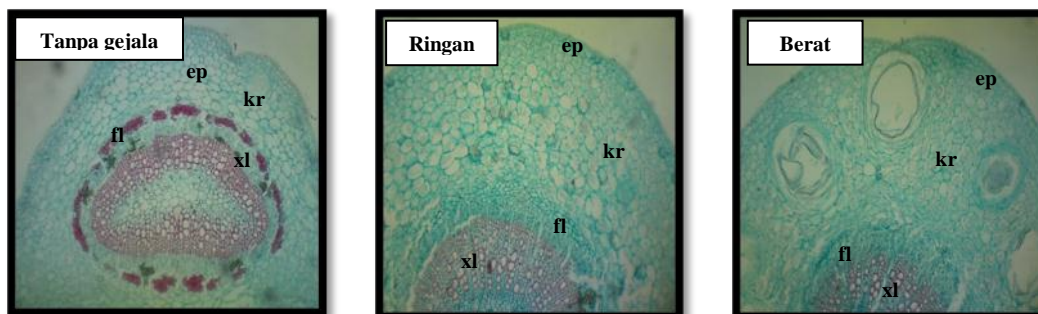


Gambar 5. Hasil visualisasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) DNA total daun jeruk siam

Keterangan: (1) Sampel DNA tanpa gejala penyakit CVPD, (2) Sampel DNA penyakit bergejala CVPD ringan, (3) Sampel DNA bergejala penyakit CVPD berat dan (M) DNA marker.

Hasil visualisasi DNA menggunakan PCR menunjukkan bahwa terdapat pita DNA 1160 bp pada kolom 2 dan 3 (Gambar 5). Bakteri *Liberibacter asiaticus* memiliki pita DNA pada 1160 bp. maka sampel daun pada kolom 2 dan 3 bereaksi positif terhadap bakteri *Liberibacter asiaticus*. Hal ini menunjukkan bahwa daun bergejala CVPD ringan dan CVPD berat dipastikan positif terinfeksi CVPD.

3.4 Histopatologi Tangkai Daun Jeruk Siam

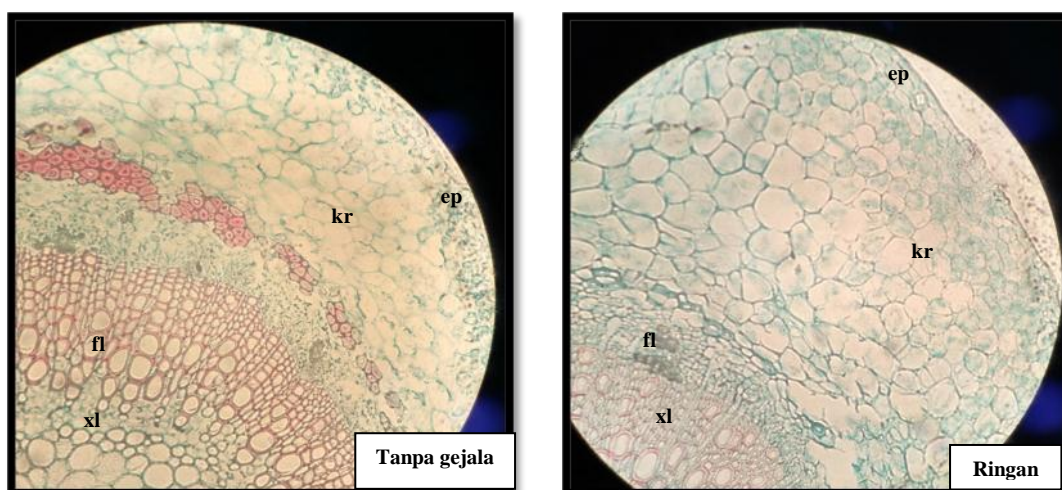


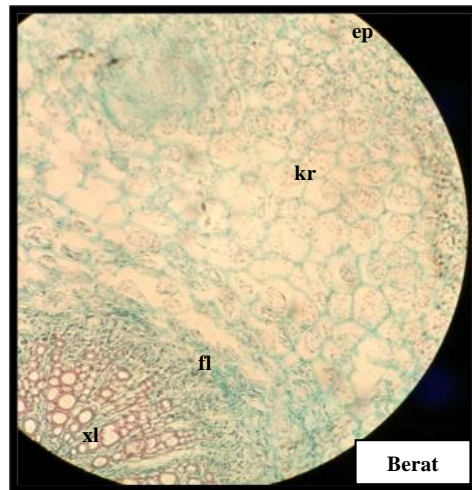
Gambar 6. Hasil foto preparat sayatan melintang tangkai daun jeruk siam

Keterangan: epidermis (**ep**), korteks (**kr**), floem (**fl**) dan xilem (**xl**).

Perbesaran 100x.

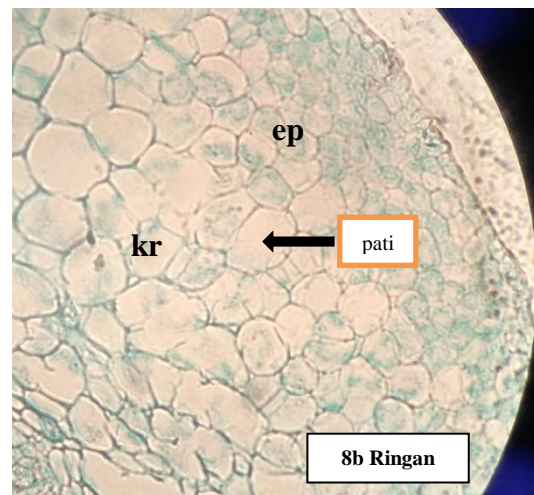
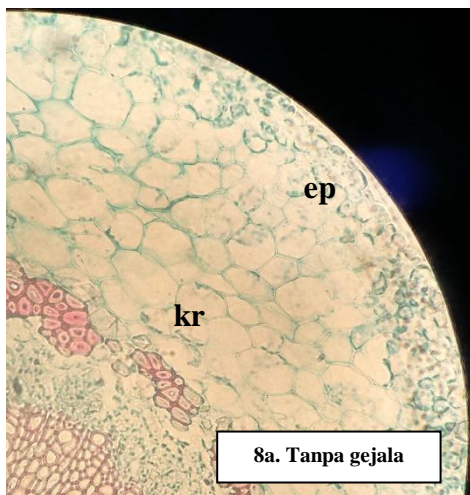
Tangkai daun jeruk sehat dan bergejala CVPD dibuat preparat dengan metode embedding sayatan melintang untuk diamati struktur histopatologinya dari jaringan luar ke dalam. Hasil foto preparat menunjukkan terdapat adanya perbedaan struktur dan bentuk sel epidermis, korteks dan floem antara tangkai daun sehat dengan tangkai daun bergejala penyakit CVPD. Sedangkan pada struktur dan bentuk sel xilem tidak terjadi perubahan (Gambar 6 dan Gambar 7).

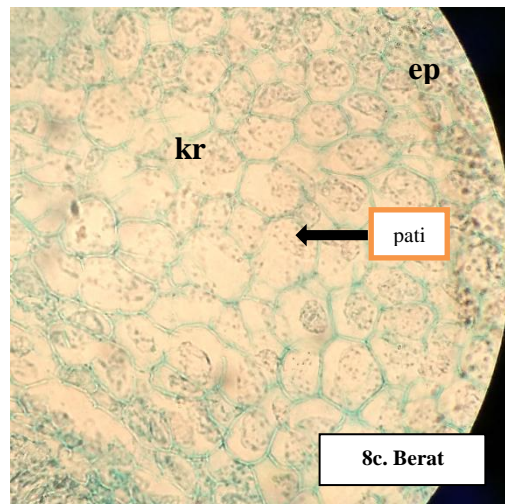




Gambar 7. Hasil foto preparat sayatan melintang tangkai daun jeruk siam
Keterangan: epidermis (**ep**), korteks (**kr**), floem (**fl**) dan xilem (**xl**).
Perbesaran 200x.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jaringan epidermis pada tangkai daun tanpa gejala CVPD tersusun atas selapis sel yang berbentuk lempengan dan memanjang sejajar pada permukaan terluar tangkai daun. Hidayat (1995) menyatakan bahwa jaringan epidermis memiliki bentuk sel yang beragam tetapi seringkali berbentuk lempengan. Anatomi jaringan epidermis pada tangkai daun jeruk bergejala CVPD ringan dan berat mengalami perubahan yaitu berupa penebalan dinding sel. Penebalan dinding sel yang terjadi merupakan mekanisme pertahanan tanaman terhadap patogen yang melakukan penetrasi pada organ tanaman tersebut. Agrios (1996) menyatakan bahwa ketebalan dan kekuatan dinding sel epidermis merupakan faktor penting untuk ketahanan tanaman karena epidermis adalah jaringan terluar dari tumbuhan sebagai tempat penetrasi patogen (gambar 8).





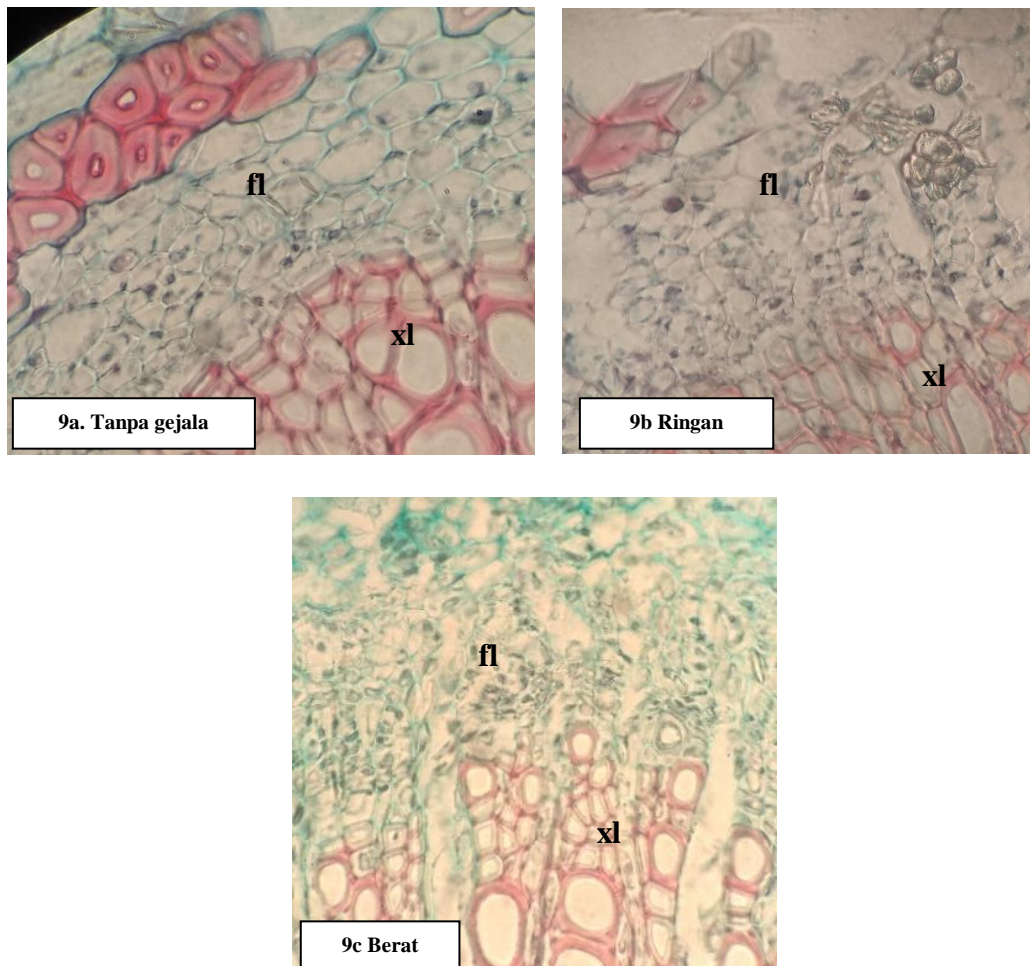
Gambar 8. Jaringan epidermis dan korteks tangkai daun jeruk siam

Keterangan: epidermis (**ep**), korteks (**kr**)

Perbesaran 100 x.

Jaringan korteks pada tangkai daun tanpa gejala CVPD berbentuk poligonal tanpa akumulasi pati. Jaringan korteks pada tangkai daun bergejala CVPD ringan masih berbentuk poligonal namun terdapat sedikit akumulasi pati ditandai dengan adanya titik titik hitam yang dapat dilihat pada gambar 8b. Sedangkan pada tangkai daun bergejala CVPD berat bentuk jaringan korteks mulai tidak beraturan, korteks sudah tidak berbentuk poligonal dan terdapat akumulasi pati dalam jumlah yang lebih banyak ditandai dengan adanya titik-titik hitam yang lebih tebal dan banyak pada jaringan korteks seperti yang tampak pada gambar 8c. Menurut Agrios (1996), perubahan bentuk jaringan korteks disebabkan oleh enzim yang dikeluarkan oleh bakteri patogen untuk masuk ke dalam sel.

Terjadinya pembentukan akumulasi pati di dalam jaringan korteks pada tangkai daun bergejala CVPD ringan dan berat merupakan akibat dari patogen yang menyumbat sel floem. Jumlah pati yang terdapat pada jaringan korteks akan meningkat seiring dengan peningkatan gejala. Pernyataan ini didukung oleh hasil penelitian Etxeberria *et al* (2009) dan Etxeberria and Narciso (2012) yang menyatakan bahwa pada batang dan tangkai jeruk manis (*Citrus sinensis*) yang terserang CVPD ditemukan adanya butiran-butiran pati pada jaringan korteks.



Gambar 9. Jaringan pembuluh floem dan xilem tangkai daun jeruk siam
Keterangan: floem (fl), xilem (xl). Perbesaran 1000 x.

Sel floem tangkai daun jeruk tanpa gejala penyakit CVPD berbentuk segi enam (heksagonal) yang tersusun rapi, seperti pada gambar 9a (fl). Pada tangkai daun bergejala penyakit CVPD ringan, sel floem tampak tidak beraturan dan abnormal, seperti yang ditunjukkan pada gambar 9b (fl). Sedangkan pada tangkai daun bergejala penyakit CVPD berat, sel floem tampak mengalami degenerasi sel dan sebagian sel telah mengalami nekrosis. Nekrosis yang terjadi adalah bentuk mekanisme kematian sel yang memiliki ciri-ciri yaitu sel-sel floem mengalami lisis atau rusaknya integritas membran sel. Hal ini mengakibatkan keluarnya organel-organel sel seperti yang tampak pada gambar 39c (fl) yaitu berupa titik titik hitam yang berdampingan dengan membran sel. Menurut Semangun (1996), gejala khas tanaman yang terserang penyakit CVPD adalah sel tanaman mengalami degenerasi floem hingga sampai menjadi nekrosis. Berdasarkan penelitian Achor *et al* (2010), perubahan anatomi pertama yang terjadi setelah invasi patogen pada jeruk manis yang terserang CVPD yaitu pembengkakan lamela tengah antara dinding sel di sekitar jaringan tapis. Pembengkakan tersebut menyebabkan pembuluh tapis tertekan, selanjutnya menyebabkan floem menjadi rusak hingga mengalami nekrosis.

Adiartayasa *et al* (2012), menyatakan bahwa bakteri *Liberibacter* hidup di dalam sel floem tanaman jeruk dan menimbulkan gejala kerusakan pada sel floem (Gambar 9).

Sel xilem tanpa gejala CVPD berbentuk cincin, tersusun rapat dan rapi antar selnya seperti pada gambar 9a (xl). Sel xilem bergejala CVPD ringan berbentuk cincin dan terdapat peregangan jarak antar sel pada beberapa bagian jaringan xilem dapat dilihat pada gambar 9b (xl). Sedangkan sel xilem bergejala CVPD berat berbentuk cincin namun susunan selnya tidak rapat karena rongga antar selnya terjadi peregangan yang signifikan dibandingkan dengan sel xilem tanpa gejala CVPD dan bergejala CVPD ringan seperti yang tampak pada gambar 9c (xl). Peregangan rongga antar sel yang terjadi pada sel xilem bergejala CVPD berat ini diduga akibat adanya penekanan dari jaringan floem dimana bakteri *Liberibacter asiaticus* hidup dan berkembang biak sehingga berdampak pada perubahan anatomi jaringan xilem. Pada penampang melintang tanaman yang terserang CVPD berat, tampak adanya ruang kosong dan jarak yang harusnya terisi jari-jari empulur. Pernyataan ini berbeda dengan hasil penelitian Achor *et al* (2010) yang menunjukkan bahwa sel xilem jeruk manis yang terserang CVPD tidak mengalami perubahan anatomi.

4. Kesimpulan dan Saran

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan:

1. Tangkai daun jeruk tanpa gejala CVPD memiliki jaringan epidermis yang berbentuk lempeng sejajar, sel korteks berbentuk poligonal tanpa akumulasi pati, sel floem berbentuk segi enam (heksagonal) dan sel xilem berbentuk cincin yang tersusun rapat.
2. Tangkai daun jeruk bergejala CVPD ringan memiliki jaringan epidermis berbentuk lempeng sejajar dengan penebalan dinding sel, sel korteks berbentuk poligonal yang berisi sedikit butir-butir pati, sel floem berbentuk tidak beraturan dan sel xilem berbentuk cincin yang tidak tersusun rapat pada beberapa bagian jaringan xilem.
3. Tangkai daun jeruk bergejala CVPD berat memiliki jaringan epidermis masih berbentuk lempeng sejajar namun terjadi penebalan dinding sel, sel korteks berbentuk tidak beraturan yang berisi butir-butir pati lebih banyak, sel floem mengalami lisis dan abnormal, dan sel xilem berbentuk cincin namun susunan selnya tidak rapat karena terdapat peregangan jarak pada rongga yang memisahkan antar sel xilem.

4.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian histopatologi dengan variasi jaringan tanaman yang berbeda.

Daftar Pustaka

- Achor, D.S., Etxeberria, E., Wang, N., Folimonova, S.Y., Chung, K.R., and Albrigo, L.G. 2010. Sequence of anatomical symptom observation in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathol. J.* 2:56-64.
- Adiartayasa, Wayan, I G P Wirawan, I N Wijaya and I G N Bagus. 2012. Kajian Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk di Kabupaten Karangasem. *Laporan Riset Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Udayana*: Denpasar.
- Agrios, GN. 1996. *Ilmu penyakit tumbuhan*. Universitas Gadjah Mada Press: Yogyakarta.
- BPS [Badan Pusat Statistik]. 2017. Produksi Jeruk Siam/ Keprok Provinsi Bali (*On-Line*) www.bps.go.id. Diakses pada tanggal 17 Agustus 2017.
- Etxeberria, DE and Narciso, C. 2012. Phloem anatomy of citrus trees: healthy vs. greening-affected. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 125: 67-70.
- Etxeberria, DE, Pedro, G, Diann, A, Gene A. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 30: 1-8.
- Fan, J, Chunxian C, Diann AS, Ron BH, Zheng LG, Fred GJ, 2013, Differential anatomical responses of tolerant and susceptible citrus species to the infection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', *Physiological and Molecular Plant Pathology* vol. 30, hal.1-6, diakses 17 Agustus 2018, <http://www.ScienceDirect.com/science/article/pii/S0885576513000313>.
- Helmiyesti RB, Hastuti, Prihastanti E. 2008. Pengaruh lama penyimpanan terhadap kadar gula dan vitamin C pada buah jeruk siam (*Citrus nobilis* var. *Microcarpa*). *Anatomi Fisiologi*. 16(2): 33-37.
- Hidayat, EB, 1995, *Anatomi tumbuhan berbiji*, ITB: Bandung.
- Jagoueix S. Bove J.M.& Garnier M. 1994. The Phloem Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus Is the Member of the α -subdivision of Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 379-386.
- Meitayani NPS, Adiartayasa W, Wijaya IN. 2014. Deteksi penyakit citrus vein phloem degeneration (CVPD) dengan teknik polymerase chain reaction (PCR) pada tanaman jeruk di Bali. *J Agroeko Trop.* 3(2):70-79.
- Savita, Virk GS, Nagpal A. 2012. Citrus diseases caused by *Phytophthora* species. *GERF Bull Biosci.* 3(1): 18-27.
- Semangun, H. 1996. Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan. Gadjah Mada University Press: Yogyakarta.
- Su, H.J., and Hung, A.L. 1990. The Nature of Likubin Organism, Life Cycle, Morphology, and Possible Strains. The 4th UNDP-FAO Regional Asian Pacific Citrus Conference. Feb 4-10, Chiangmai: Thailand.
- Taufik M, A Khaeruni, T Pakki, Giyanto. 2010. Deteksi keberadaan citrus vein phloem degeneration (CVPD) dengan teknik PCR (Polymerase Chain Reaction) di Sulawesi Tenggara. *J HPT Trop.* 10(1):73-79.
- 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.
- Timmer LW, Garnsey. Broadbent P. 2003. Diseases of citrus. Di dalam: Ploetz RC, editor. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. St. Paul (US): APS Press. hlm 163-195.

- 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, Lilik Sulistyowati dan I Nyoman Wijaya. 2003. Mekanisme tingkat molekul infeksi penyakit CVPD pada tanaman jeruk dan peran *Diaphorina citri* Kuw. sebagai serangga vektor. *Lemlit*. Universitas Udayana: Denpasar.