

# **Kultur *In vitro* Tanaman Jeruk Pamelo (*Citrus maxima* Merr.) Menggunakan *explant* Biji Serta Deteksi Keberadaan Bakteri *Liberobacter asiaticus* pada Kalus yang Dihasilkan**

PUTU BAMBANG IKA WINJALISTA  
I GEDE PUTU WIRAWAN\*)  
MADE SRITAMIN

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana  
Jl. PB. Sudirman Denpasar Bali 80231  
\*)Email: igpwirawan@unud.ac.id

## **ABSTRACT**

***In vitro* culture of citrus plant Pamelo (*Citrus maxima* Merr.) Using *Explant* seeds as well as the detection of the presence of Bacteria *Liberobacter asiaticus* at Shoots are produced**

This research was begun with doing sample approachment in Kapal Village, Mengwi Sub-District, Badung regency and Sumerta Klod Village, East Denpasar Sub-District, Denpasar City and the culture *in vitro* was done in Implementing Technical Unit (UPT) Sumberdaya Genetika dan Biologi Molekuler Laboratory since October 2018 until January 2019. This research aim to recognize the response of pamelo orange's seed *explant* rather it will grow in based MS media which has been richen and got pamelo orange seed that is free from the infection of *liberobcter asiaticus*. The approachment of sample was based on the visualization of the plant, the plant which shows any indication of CVPD disease next will be known as 1<sup>st</sup> Sample and 2<sup>nd</sup> sample would be the plant which shows no indication of cvpd disease. The seed of each sample be cultured with MS media which has been richen, was maintained for 8 weeks after it's planted (mst). By the results of this research, it concludes that there's seed *explant* from both samples which grows without showing any indication of cvpd disease, but the result of DNA amplification from 1<sup>st</sup> sample that has been cultured *in vitro* after got UV transluminator visualization shows the existence of 1160 bp DNA ribbon which is belong to *Liberobcter asiaticus*. This shows that the sample has been infected by *Liberobacter asiaticus*, whereas can't be found in 2<sup>nd</sup> sample.

Keywords: Seed, Bacterium *Liberobacter asiaticus*, citrus Pamelo, Culture *in vitro*, CVPD

## **1. Pendahuluan**

### **1.1 Latar Belakang**

Jeruk pamelo merupakan salah satu jenis buah-buahan yang sudah dikenal sejak lama di Indonesia. Kebutuhan akan buah jeruk pamelo meningkat dari tahun ke tahun

bersamaan dengan meningkatnya permintaan pasar baik dalam maupun luar negeri (Suharijanto, 2011).

CVPD disebut juga "*citrus greening*" atau "*huanglongbin*" (Wirawan, 2000), merupakan penyakit jeruk yang menyebabkan kerusakan hasil di Benua Asia, Afrika, dan Amerika (Jagoeux *et al.*, 1996). Penyakit CVPD di Indonesia ditularkan oleh serangga vektor *Diaphorina citri*. Penyakit CVPD mulai menyebar di Indonesia sejak tahun 1940-an (Aubert *et al.*, 1985), dan telah menyerang pertanaman jeruk hampir di seluruh provinsi dengan kehilangan hasil yang sangat signifikan (Wirawan, Sulistyowati dan Wijaya, 2004). Penyakit CVPD menyerang hampir semua kultivar jeruk yang menyebabkan produksi berkurang, mengalami gagal panen dan memperpendek masa hidup tanaman (Hung *et al.*, 2000; Su dan Hung, 2001), bahkan dapat mematikan tanaman dalam waktu 1-2 tahun (da Graca, 1991). Penyebaran penyakit CVPD di perkebunan jeruk di Bali mencapai 83% dan menurut Dwiastuti (2000) khususnya di Bali bagian Utara, penyakit CVPD menyebabkan penurunan produksi jeruk mencapai 60%.

Kultur jaringan tanaman merupakan suatu teknik untuk menumbuhkan sel, jaringan ataupun irisan organ tanaman di laboratorium pada suatu media buatan yang mengandung nutrisi yang aseptik (steril) untuk menjadi tanaman secara utuh. Adapun tujuan dari kultur jaringan yaitu untuk transformasi genetik/rekayasa genetika, memperbanyak tanaman transgenik dan perbanyak tanaman yang memiliki sifat-sifat unggul. (Rindang, 2015). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman jeruk pamelu (*Citrus maxima* Merr.) yang terbebas dari infeksi *Liberobacter asiaticus* yang tumbuh pada media dasar MS yang diperkaya.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sumberdaya Genetika dan Molekuler, Universitas Udayana di jalan P.B Sudirman, Denpasar. Penelitian ini dilakukan dari bulan Oktober 2018 hingga Januari 2019.

### 2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan digital, magnetik stirrer, autoclave, microwave/oven, *laminair air flow cabinet*, inkubator, mesin vortex, water bath, pestle, PCR tube, transiluminator UV, mesin elektroforesis, mesin PCR, kertas parafilm, spatula, kertas label, kamera digital, gelas ukur, gelas beker, gelas labu erlenmayer, botol kultur, pinset, pisau, gunting, mortar, mikropipet dan *ependorf* (tabung mikro).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun dan eksplan biji jeruk pamelu, aquades, sukrosa, media kultur murashige and skoog (MS), naphthaleneacetic acid (NAA), benzylamino purine (BAP), B5 vitamin stock (Myo-Inositol, Thiamine-HCL, Nicotinic Acid, Pyridoxine-HCL), diterjen, benlate, alcohol 70%, natrium hipoklorit, tween, agarose, TAE 100ml, genom DNA mini kit plant, PCR

*Master Mix Solution*, marker DNA 1 kb ladder, loading dye, etidium bromida, nitrogen cair, dan sepasang primer spesifik untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Liberobacter asiaticus* pada tanaman yang terserang CVPD yaitu Forward Primer OI1 (5' GCG CGT ATG CAA TAC GAG GGG C 3') dan Reverse Primer OI2C (5' GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T 3') dan gellan gum.

### 2.3 Pelaksanaan Penelitian

#### 2.3.1 Pengambilan Eksplan Jeruk Pamento

Penelitian ini dimulai dengan pengambilan sampel daun dan buah jeruk pamento di Badung dan Denpasar. Penentuan tanaman yang akan digunakan pada penelitian ini dilihat dari visual yang ditunjukkan oleh tanaman yang bergejala penyakit CVPD dan tidak. Untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Liberobacter asiaticus* diambil bagian tulang daun untuk isolasi DNA Totalnya. Baik tanaman yang terinfeksi ataupun tidak terinfeksi selanjutnya diambil bijinya untuk di kultur secara *in vitro*.

#### 2.3.2 Deteksi Penyakit CVPD dengan Teknik PCR

Deteksi penyakit CVPD dilakukan selama dua kali. Deteksi pertama untuk mengidentifikasi tanaman di lapangan apakah mengandung bakteri *Liberobacter asiaticus* atau tidak menggunakan bagian tulang daun tanaman. Deteksi kedua untuk mengidentifikasi tanaman hasil dari kultur *in vitro* biji jeruk pamento apakah masih mengandung bakteri *Liberobacter asiaticus* atau tidak menggunakan seluruh bagian tanaman. Seluruh sampel kemudian di isolasi DNANYA lalu dideteksi dengan teknik PCR. Isolasi DNA dilakukan dengan Genomic DNA Mini Kit Plant.

#### 2.3.3 Amplifikasi DNA

Analisis teknik PCR untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Liberobacter asiaticus* pada tanaman yang tidak menunjukkan gejala dan yang menunjukkan gejala serangan penyakit CVPD, dilakukan dengan menggunakan primer spesifik dari 16S rDNA, forward primer OI1 dan Reverse Primer OI2c. DNA hasil isolasi diamplifikasi sebanyak 20 µl dengan teknik PCR. Reaksi PCR terdiri dari 2 µl DNA sample, 1 µl Forward Primer, dan 1 µl Reserve Primer, 10 µl PCR Master Mix Solution, dan 6µl Buffer TE. Amplifikasi DNA dilakukan sebagai berikut (1) Perlakuan awal pada suhu 92°C selama 30 detik dengan satu siklus ulangan, (2) 40 siklus yang terdiri atas pemisahan utas DNA (Denaturasi) pada suhu 92°C selama 60 detik, penempelan primer pada DNA (Aneling) pada suhu 60°C selama 30 detik dan sintesis DNA (Elongation) pada suhu 72°C selama 90 detik dan (3) Penyesuaian utas atas dan bawah (Extension) pada suhu 72°C selama 90 detik dengan 4 siklus ulangan.

#### 2.3.4 Elektroforesis dan Visualisasi DNA Hasil PCR

Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR di elektroforesis pada gel Agarose 1%, penyangga untuk elektroforesis digunakan TAE 1% yang mengandung 40mM sodium

EDTA. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama satu jam, selanjutnya direndam dalam larutan EtBr selama  $\pm 15$  menit dan diamati dengan Transiluminator UV.

### 2.3.5 Persiapan Media dan Alat Kultur *In vitro*

Media yang digunakan adalah MS yang diperkaya, dengan komposisi: 4,3 g/l MS (murashige and skoog) di panaskan di oven dahulu dengan suhu 100°C selama 5 menit, ditambah 1 ml B5 vitamin stock (100 mg/ml myo-inositol, 10 mg/ml thiamine-HCL, 1 mg/ml nicotinic acid, 1 mg/ml pyridoxine-HCL), 30 g/l sucrose, 1.0  $\mu$ g/ml benzyladenine, 0.1  $\mu$ g/ml naphthaleneacetic acid dan 0,4% Gellum Gum agar kemudian diaduk dengan magnetic stirrer. Setelah media terlihat homogen lalu dituangkan ke masing-masing wadah (Botol Kultur) kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit.

### 2.3.6 Kultur *In vitro* Biji Jeruk Pameló

Eksplan diperoleh dari biji jeruk pameló yang telah dideteksi keberadaan bakteri *L. asiaticus*. Biji jeruk pameló yang akan ditanam dalam media dikupas dan disterilkan. Sterilisasi eksplan dilakukan tujuh tahap, yakni : 1) dicuci bersih dengan deterjen; 2) dicuci bersih dengan air mengalir; 3) direndam dengan fungisida banlite 2 g/l selama 10 menit; 4) dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali; 5) disterilkan dengan alkohol 70% selama 2-3 menit; 6) disterilkan 2 kali dengan 10% dan 20% natrium hipoklorit + Tween selama minimal 5 menit; 7) dibilas dengan aquades steril sebanyak lima kali. Penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow Cabinet* yang sudah disterilkan. Botol yang telah diisi eksplan diletakkan pada inkubator dengan suhu 28°C dan lampu fluorescent (digunakan sebagai sumber cahaya dalam ruang kultur).

Kalus dari tanaman hasil kultur *in vitro* kemudian diisolasi DNA totalnya untuk dilakukan deteksi kembali dengan teknik PCR, untuk membuktikan hasil dari kultur *in vitro* dari biji jeruk pameló bebas dari penyakit CVPD atau tidak.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Gejala Penyakit CVPD

Pengamatan tanaman bergejala CVPD dilakukan pada tanaman jeruk Pameló di Desa Kapal, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung dan Desa Dauh Puri, Kecamatan Denpasar Timur, Kabupaten Denpasar. 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 sesuai dengan pendapat yang dinyatakan oleh Wijaya, 2003.

Hasil pengamatan secara visual pada daun tanaman jeruk Pameló yang didapatkan di Desa Kapal, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung menunjukkan gejala klorosis ringan (Sampel I; Gambar 4.1 A), sedangkan daun tanaman jeruk Pameló yang didapatkan di Desa Sumerta Klod, Kecamatan Denpasar Timur, Kota Denpasar tidak menunjukkan gejala klorosis (Sampel II; Gambar 4.2 A).

Gejala yang tampak pada sampel adalah sebagai berikut:

1. Sampel I dengan ciri, daun tanaman menunjukkan gejala klorosis yang berat, warna lamina yang menjadi kuning pada semua permukaan daun, daun menjadi tebal dan kaku. Buah berukuran besar, kulit buah keras dan berwarna hijau (Gambar 1).



Gambar 1. Sampel Daun dan Buah Jeruk Pamelو yang Bergejala Penyakit CVPD (A) Daun jeruk Pamelو bergejala penyakit CVPD, (B) Buah dari tanaman bergejala.

2. Sampel II dengan ciri, daun tanaman tidak menunjukkan gejala klorosis (tanaman sehat), gejala klorosis tidak tampak pada daun, tulang daun masih berwarna hijau dengan lamina daun yang masih hijau, daun tidak tebal dan tidak kaku. Buah berukuran besar, kulit buah keras dan berwarna hijau (Gambar 2).

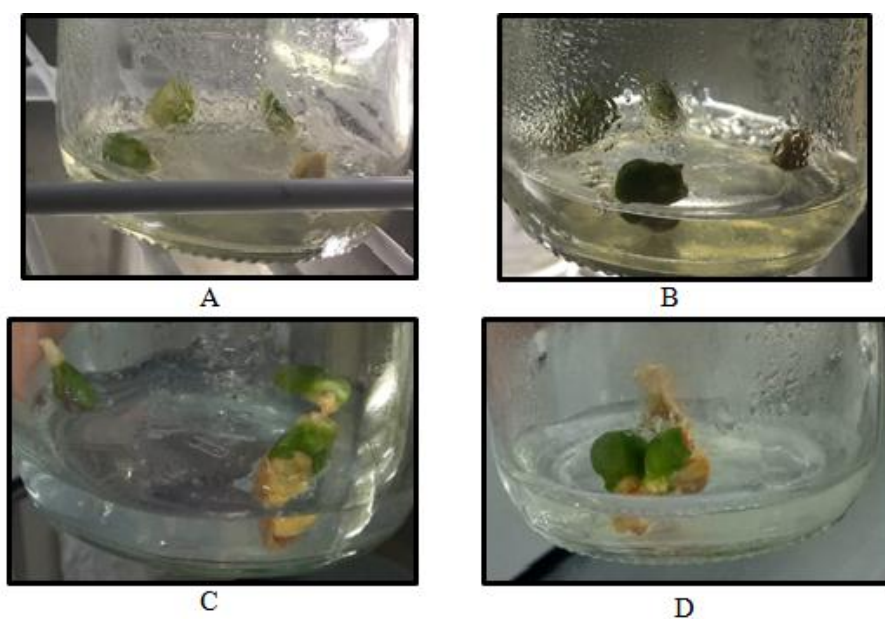


Gambar 2. Sampel Daun dan Buah Jeruk Pamelو yang Tidak Bergejala Penyakit CVPD. (A) Daun tanaman jeruk Pamelو tidak bergejala penyakit CVPD, (B) Buah dari tanaman sehat (tidak bergejala).

### 3.2 Kultur *In vitro* Eksplan Biji Jeruk Pamelo

Dari hasil penelitian ditemukan bahwa hasil kultur *in vitro* dengan eksplan biji jeruk pamelo menggunakan media MS yang diperkaya disajikan pada Gambar 3 dan Gambar 4. Hasil pengamatan sampel I dan II dilakukan pada 1 mst, 2 mst, 4 mst dan 8 mst. Pada sampel I eksplan masih berumur 1 minggu setelah tanam, kulit biji sudah mulai tumbuh akan tetapi ukurannya masih kecil. Saat berumur 2 minggu setelah tanam kulit biji mulai bertambah ukurannya dan semua eksplan terlihat mampu tumbuh (Gambar 3).

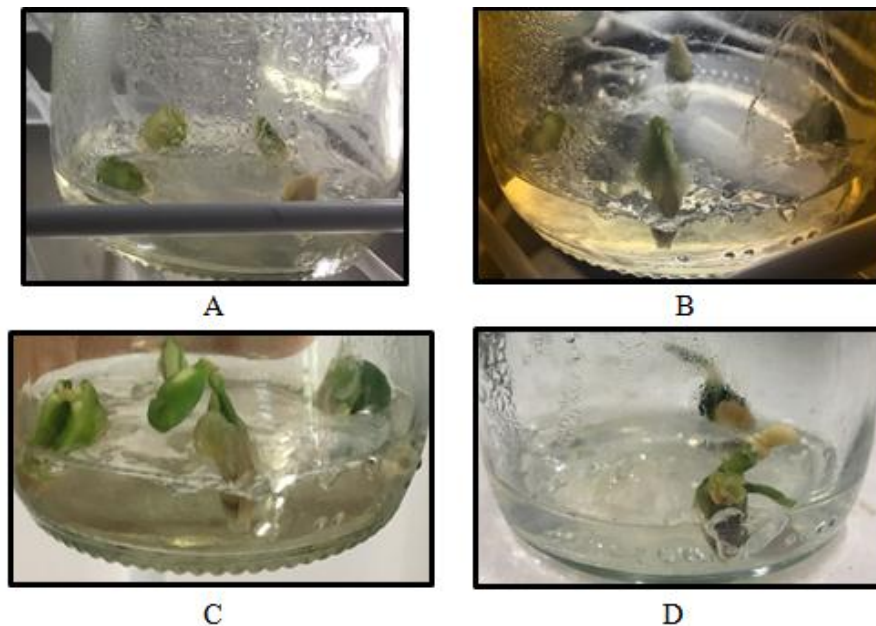
Kemudian saat eksplan berumur 4 minggu setelah tanam, eksplan mulai terlihat membelah dan mulai tumbuh kotiledon pada beberapa eksplan (Gambar 3). kotiledon merupakan daun pertama yang ada pada tumbuhan. Pada tumbuhan dikotil, kotiledon selain sebagai cadangan makanan dia juga merupakan fotosintetik yang berfungsi seperti daun. Selanjutnya pada 8 minggu setelah tanam dimana terlihat dari 4 eksplan biji yang ditanam hanya 1 eksplan biji saja yang sudah memiliki daun muda dan akar yang berukuran sangat kecil (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil kultur *in vitro* tanaman jeruk pamelo sampel I. (A) Hasil kultur 1 mst, (B) Hasil kultur 2 mst, (C) Hasil kultur 4 mst, (D) Hasil kultur 8 mst. Mst = minggu setelah tanam.

Pada pengamatan sampel II saat eksplan masih berumur 1 minggu setelah tanam, kulit biji sudah mulai tumbuh akan tetapi ukurannya masih kecil dan semua eksplan terlihat mampu tumbuh dan berkembang. Pengamatan selanjutnya pada 2 minggu setelah tanam, kulit biji mulai bertambah ukurannya. Pengamatan saat eksplan berumur 4 minggu setelah tanam, kulit biji sudah mulai meninggi dan eksplan tampak

aktif membelah. Pada umur 8 minggu setelah tanam, dari 4 eksplan hanya 2 saja yang mampu tumbuh, salah satunya sudah mulai muncul kalus setinggi 3 cm dengan 1 daun muda yang masih sangat kecil (Gambar 4).

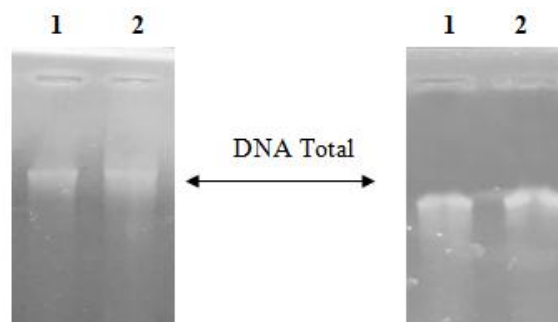


Gambar 4. Hasil *in vitro* tanaman jeruk pameلو sampel II. (A) Hasil kultur 1 mst, (B) Hasil kultur 2 mst, (C) Hasil kultur 4 mst, (D) Hasil kultur 8 mst. Mst = minggu setelah tanam.

### 3.3 Deteksi Patogen Penyebab CVPD

#### 3.3.1 Isolasi DNA Total

Isolasi DNA total dilakukan untuk memperoleh DNA template yang berkualitas baik untuk melakukan amplifikasi PCR, karena seperti yang dinyatakan oleh Taylor (1993), amplifikasi dengan teknik PCR memerlukan kualitas DNA yang baik dengan program yang sesuai (Ohtsu, 2002). Hasil dari isolasi DNA total yang telah dielektroporesis dengan gel agarose 1% dan visualisasi menggunakan UV



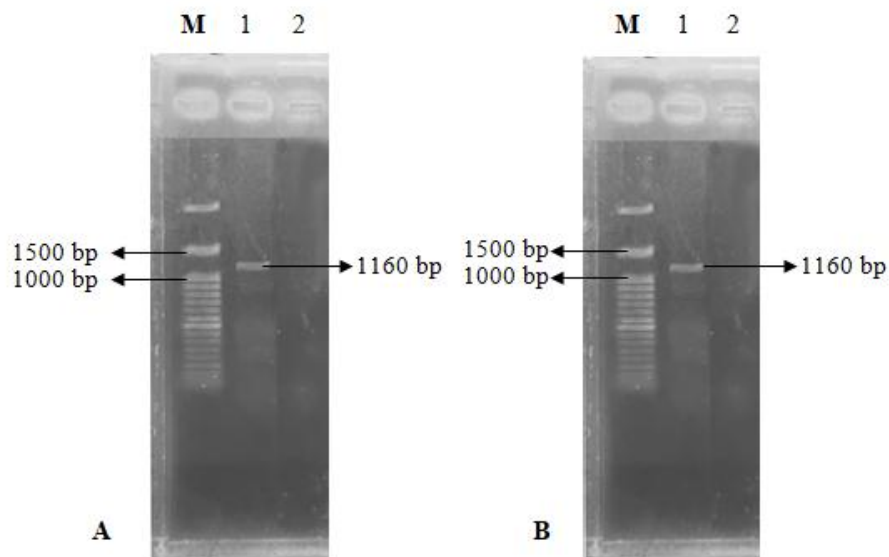
Gambar 5. Hasil elektroforesis DNA total dengan gel agarose 1%. (A) Tanaman jeruk Pameلو, (B) Tanaman jeruk Pameلو setelah di kultur *in vitro*, (1) Sampel I, (2) Samnel II.

transluminator menunjukkan bahwa DNA telah terisolasi. Hasil elektroforesis DNA total pada sampel I dan sampel II (sampel yang diambil dari lapangan) ditunjukkan pada Gambar 5.

Hasil elektroforesis DNA total pada sampel I dan sampel II (sampel dari hasil kultur *in vitro*) ditunjukkan pada Gambar 4.5 B. Menurut Irmawati (2003) pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang terlihat smear menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus menjadi bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik maupun kimiawi yang berlebihan pada saat proses ekstraksi seperti dalam proses pemipetan, pada saat dibolak-balik dalam *ependorf*, disentrifus, atau bahkan karena temperature yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu.

### 3.3.2 Amplifikasi DNA total dengan Teknik PCR

Teknik PCR digunakan untuk memperbanyak DNA dari bakteri *Liberobacter asiaticus* yang diduga terdapat pada tanaman jeruk pamelu. Hasil DNA total diperbanyak pada mesin PCR menggunakan primer spesifik dari 16S rDNA dengan Forward primer OI1 dan Reverse primer OI2C. Visualisasi hasil amplifikasi DNA dari lapangan dan hasil kultur *in vitro* dielektroforesis pada gel agarose 1% lalu diamati dengan UV transilluminator (Gambar 6).



Gambar 6. Hasil elektroforesis DNA teramplifikasi. (A) DNA hasil amplifikasi dengan PCR pada sampel lapangan, (B) DNA hasil amplifikasi dengan PCR pada sampel kultur *in vitro*, (M) Marker, (1) Sampel I, (2) Sampel II.



Berdasarkan visualisasi dengan UV transilluminator DNA dari hasil elektroforesis pada gel agarose 1% menunjukkan bahwa Gambar sampel A.1 pada kolom 1 (Sampel dari lapangan), dan Gambar B.1 kolom 1 (hasil kultur *in vitro*) menunjukkan DNA yang terbentuk memiliki ukuran sebesar 1160 bp, sedangkan Gambar sampel A.2 kolom 2 (Sampel dari lapangan) dan Gambar B.2 kolom 2 (hasil kultur *in vitro*) tidak terdapat DNA yang memiliki ukuran sebesar 1160 bp, ini berarti tanaman tersebut tidak terinfeksi penyakit CVPD, hal ini didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Jagoueix *et al.* (1996) menunjukkan DNA yang akan teramplifikasi dengan primer spesifik OI1 dan OI2c berukuran sekitar 1160 bp, yang merupakan 16S rDNA dari bakteri *Liberobacter asiaticus*. Nakashima *et al.* (1996) menegaskan bahwa dengan menggunakan primer spesifik CVPD OI1 dan OI2C sekuens 16S rDNA hanya bakteri *Liberobacter asiaticus* yang teramplifikasi, sedangkan dari bakteri lain, atau dari mitokondria dan khloroplas tanaman jeruk tidak teramplifikasi.

Hasil ini menunjukkan bahwa pada sumur 1 pada sampel I dan sampel II ditemukan DNA bakteri *Librobacter asiaticus* dengan ukuran DNA teramplifikasi 1160 bp, walaupun secara visual tanaman dilapangan menunjukkan gejala klorosis secara molekuler tanaman sampel I positif penyakit CVPD. Hasil sebaliknya ditunjukkan pada sumur 2 pada sampel I dan sampel II tidak ditemukan DNA bakteri *Liberobacter asiaticus*. Secara visual tanaman sampel II sama sekali tidak menunjukkan gejala klorosis dan secara molekuler tanaman sampel II negatif penyakit CVPD.

#### **4. Kesimpulan dan Saran**

##### **4.1 Kesimpulan**

1. Eksplan biji jeruk pamelos yang di kultur *in vitro* pada media dasar MS yang diperkaya mampu memberikan pertumbuhan sampai menjadi kalus.
2. Kalus yang berasal dari bibit terkontaminasi bakteri *Liberobacter asiaticus* terbawa sampai pada kalus hasil kultur *in vitro*.

##### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang kultur *in vitro* jeruk pamelos menggunakan variasi media sehingga diperoleh pertumbuhan yang lebih seragam dan penelitian hingga tahap aklimatisasi untuk melihat pertumbuhan tunas di media tanah.

#### **Daftar Pustaka**

- Aubert, B., M. Garnier, D. Guillaumin, B. Herbasyandono, L. Setiobudi and F. Nurhadi, 1985. Greening, a serious threat for the Citrus productions of the Indonesian archipelago, Future prospects of integrated control, *Fruits* 40 (9): 549-563
- da Graca, J.V. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20: 109 - 36.

- Dwiasuti, M.E. 2000. Evaluasi Ketahanan Varietas Jeruk Terhadap Penyakit CVPD Isolat Lumajang. *Jur. Hort.* Vol 10 no 2 : 131-136.
- Hung, T.H., Wu, M.L., and Su, H.J. 2000. Detection of fastidious bacteria causing citrus greening disease by nonradioactive DNA probes.
- Irmawati. 2003. Perubahan Keragaman Genetika Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok Hatchery. Thesis. Bogor: IPB.
- Jagoueix, S., J.M. Bove and M. Garnier. 1996. PCR Detection of Two Candidates Liberobacter Species Associated With Greening Disease of Citrus. *Molecular and Cellular 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. Nakhasima, M. koizumi, J. Imada, and K. Kawasima. 2002. *Partial Purification of the Thai Isolate of Citrus huanglongbing (greening) Bacterium and Antiserum Production for Serological Diagnosis.* *J. Gen. Plant Pathology.* 68:372-377.
- Rindang, D. 2015. Kultur Jaringan Tanaman. Pelawa Sari, Denpasar Barat. 75.
- Su, H.J., and Hung, T.H. 2001. Detection of Greening Fastidious Bacteria (GFB) Causing *Citrus* Greening by Dot Hybridization and *Polymerase ChainReaction* (PCR) with DNA Probes and Primer Pairs. *Plant Protection.*
- Suharijanto. 2011. Induksi Tunas Jeruk Pamelu (*Citrus Maxima* Merr.) Kultivar Bageng secara *in vitro* dengan Pemberian Jenis dan Konsentrasi Sitokinin. Program Studi Agronomi Fakultas Pasca Sarjana Universitas Sebelas Maret: Tesis.
- 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 University Press, New York.*
- Wijaya, I.N. 2003. *Diaphorina citri* KUW (Homoptera: Psyllidae) : Bioteknologi dan Peranannya sebagai Vektor Penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) pada Tanaman Jeruk Siam. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Disertasi.
- Wirawan IGP. 2000. Isolasi Resisten terhadap CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) dengan Metode Transformasi Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Laporan Riset Unggulan Terpadu V. Denpasar: Universitas Udayana.
- Wirawan, I.G.P., L. Sulistyowati, dan I.N. Wijaya, 2004. Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk. Analisis Baru Berbasis Bioteknologi. Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura, Departemen Pertanian.