

Aplikasi Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) Terhadap Variasi Gejala Penyakit Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) pada Beberapa Jenis Daun Tanaman Jeruk

GUSTI PUTU DINTYA PUTRA*)
WAYAN ADIARTAYASA
MADE SRITAMIN

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar 80232 Bali
) E-mail: adiartayasaw@gmail.com

ABSTRACT

Application *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Technique to Variation Symptoms Disease *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) on Several Types of Citrus Leaves

CVPD disease is one of the major diseases in citrus plant. CVPD disease spread from plant to plant by insect vectors *Diaphorina citri*, and from one region to another region infected by seed. CVPD disease causes symptoms, the leaves become chlorotic with veins remain green. This study aims to determine the PCR method can detect CVPD of citrus from mild to severe symptoms.

CVPD symptoms observed on several types of citrus leaves (Siam, Selayar, Besakih, Tejakula, Sweet, Purut, Lime, Lemo, and pomelo) showed chlorosis symptoms from mild to severe. Then the plants were symptomatic will be identified molecular in the Biotechnology Lab. After electrophoresis on almost all samples showed DNA bands with size 1160 bp. Therefore 1160 bp was had bakteri *Liberobakter*, the plants reacted positive with *Liberobakter asiaticum*

Keyword: CVPD, Liberobakter asiaticum, PCR

1. Pendahuluan

Jeruk merupakan komoditas buah-buahan terpenting di Indonesia setelah pisang, dan mangga. Salah satu upaya yang dilakukan untuk pemenuhan kebutuhan buah jeruk di Indonesia dengan melakukan peningkatan produksi jeruk, tetapi hal tersebut masih terkendala adanya serangan penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) (Adiartayasa, 2006)

Pengendalian penyakit CVPD telah banyak dilakukan, cara-cara pengendalian diantaranya pengendalian serangga vektor, pengadaan bibit bebas penyakit CVPD, dan eradikasi tanaman terserang CVPD. Walaupun telah dilakukan berbagai cara pengendalian, penyakit CVPD masih ditemukan di berbagai sentra pertanaman jeruk. Sampai saat ini belum ditemukan cara pengendalian penyakit CVPD yang tepat (Wirawan dkk, 2003).

Berdasarkan hasil pengamatan secara visual di lapang ditemukan adanya variasi gejala klorosis pada masing-masing jenis tanaman jeruk, sehingga perlu dilakukan deteksi terhadap bakteri *Liberobacter* dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dengan metode teknik PCR dapat mendeteksi tanaman jeruk yang terinfeksi CVPD dari gejala klorosis ringan sampai berat.

2. Bahan dan Metode

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Kecamatan Kintamani, dan Laboratorium Bioteknologi Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana, Denpasar mulai bulan April sampai September 2012

2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Sampel daun tanaman jeruk yang bergejala serangan CVPD dan daun tanaman jeruk sehat, aquadest, Buffer PL Mix, Buffer PB Mix, Wash buffer, Proteinase K, etanol 95%, elution buffer, penyangga TAE 1%, sepasang primer spesifik untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Liberobacter asiaticum* pada tanaman yang menunjukkan gejala serangan 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.

2.3 Pelaksanaan Penelitian

Pengamatan gejala serangan penyakit CVPD dilakukan secara visual dengan mengamati seluruh pertanaman jeruk seluas satu hektar di Desa Katung, Blancan, Bayung Gede, Pengotan, dan Catur. Jumlah tanaman jeruk yang diamati adalah 100 pohon per hektar, dengan umur tanaman berkisar antara 4 -10 tahun, parameter yang diamati adalah persentase tanaman jeruk yang menunjukkan gejala penyakit CVPD pada daun, dan intensitas serangan penyakit CVPD pada tanaman jeruk ditentukan secara random minimal 10 tanaman sakit pada masing-masing desa, persentase tanaman jeruk terserang CVPD dan Intensitas serangan penyakit CVPD dihitung dengan rumus.

Persentase tanaman terserang CVPD (Putra, 1986)

$$P = \frac{X}{N} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan

P = Persentase tanaman sakit

X = jumlah tanaman sakit

N = jumlah tanaman yang diamati

Intensitas serangan penyakit CVPD (Boggie & Hans, 1988)

$$I = \Sigma \frac{(n \times v)}{ZN} \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan

- I = Intensitas serangan penyakit CVPD
 n = Jumlah pucuk menunjukkan gejala CVPD
 v = Nilai harga numeric (Skor) dari Tiap Kategori
 Z = Nilai skor dari kategori tertinggi
 N = jumlah Pucuk tanaman sakit

Tabel 1. Persentase tanaman terserang CVPD

Nilai	Tingkat Serangan
0%	Tidak ada gejala CVPD
> 1% - 25%	Bergejala ringan
> 26% - 50%	Bergejala sedang
> 51% - 75%	Bergejala Berat
> 76% - 100%	Bergejala sangat berat / puso

Sumber : (Sarwono 1995)

Intensitas tanaman terserang CVPD di kelompokkan menjadi lima kelompok seperti pada table 2.

Tabel 2. Tabel skor (nilai numerik) intensitas tanaman jeruk terserang penyakit CVPD

Skor	Persentase Gejala CVPD dalam (%)
1	Tidak ada gejala CVPD 0% pucuk menunjukkan gejala CVPD
2	Bergejala ringan 1% - 25% pucuk menunjukkan gejala CVPD
3	Bergejala sedang 26% - 50% pucuk menunjukkan gejala CVPD
4	Bergejala berat 51% - 75% pucuk menunjukkan gejala CVPD
5	Bergejala sangat Berat / puso 76 % - 100% pucuk menunjukkan gejala CVPD

Sumber : (Sarwono 1995)

2.4 Deteksi Penyakit CVPD

Tanaman jeruk yang menunjukkan gejala klorosis dideteksi dengan teknik PCR melalui tahapan isolasi DNA total, amplifikasi DNA, dan visualisasi hasil PCR

Isolasi Total DNA

Isolasi DNA menggunakan metode yang dikembangkan oleh Rogers & Bendich (1991). Sampel daun jeruk yang ditumbuk sampai halus disuspensi dalam 280 µl Buffer PL Mix dan 20 µl proteinase kit. Suspensi ini ditaruh dalam tabung mikro (1,5 ml) dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam, selanjutnya disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit dan supernatan yang dihasilkan dipindahkan pada tabung mikro baru, kemudian dicampurkan dengan 600 µl Buffer PB Mix, dan diinkubasi pada suhu 65°C

selama 10 menit, selanjutnya supernatan ditambahkan 200 µl ethanol 95%. Pindahkan 900 µl supernatan tersebut ke dalam column pada collectum tube dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya ditambah dengan 750 µl wash buffer pada column, disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. kemudian disuspensi kembali dalam 50 µl elution buffer untuk mendapatkan pelet DNA.

Amplifikasi DNA

DNA hasil isolasi diamplifikasi sebanyak 20 µl dengan teknik PCR. Reaksi PCR terdiri dari 2µl DNA sampel, 1µl forward primer, dan 1µl reverse primer, 10 µl PCR master mix solution, dan 6 µl buffer TE. Amplifikasi DNA dilakukan sebagai berikut ; 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

Visualisasi Hasil PCR

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

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Keadaan Pertanaman Jeruk di Kecamatan Kintamani

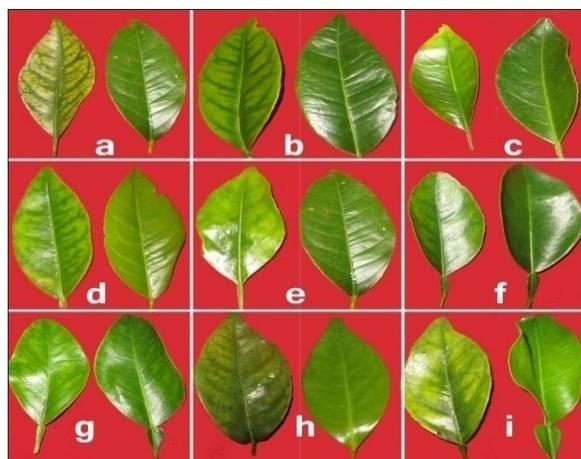
Hasil pengamatan pada areal pertanaman jeruk di Kecamatan Kintamani pada ketinggian 600 - 1300 m di atas permukaan laut (dpl) didapatkan sembilan jenis jeruk yaitu : 1) Keprok Besakih dari desa Blancan, 2) Keprok Tejakula dari desa Catur, 3) Selayar dari desa Katung, 4) Siam dari desa Pengotan, 5) jeruk Besar dari desa Bayung Gede, 6) jeruk Purut dari desa Blancan, 7) jeruk Nipis dari desa Pengotan, 8) jeruk Lemo dari desa Pengotan, dan 9) jeruk Manis dari desa Bayung Gede, selain itu pada pertanaman jeruk di kintamani juga ditemukan beberapa jenis tanaman lain seperti cabai, pisang, kopi, kubis, dan ubi jalar yang di tanam tumpang sari pada areal pertanaman jeruk.

Tanaman jeruk yang di tanam petani memiliki umur yang bervariasi antara 1-3 tahun dan 4-10 tahun, bibit tanaman jeruk yang ditanam berasal dari hasil mata tempel, hal ini menyebabkan penyebaran penyakit CVPD menjadi sangat cepat di pertanaman jeruk .

Wirawan, (2003) menyatakan bahwa penyebaran penyakit CVPD yang cepat di pertanaman jeruk dapat terjadi walaupun tidak dijumpai serangga vektor *Diaphorina citri* hal ini diduga karena adanya tanaman yang mengandung bakteri sejak bibit walaupun belum menunjukkan gejala penyakit.

3.2 Gejala Serangan Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk

Berdasarkan hasil pengamatan secara visual terhadap gejala serangan penyakit CVPD terdapat variasi gejala klorosis yang terjadi pada sampel daun tanaman jeruk. Tanaman jeruk Siam Pengotan dan Selayar Katung yang terserang CVPD memperlihatkan gejala klorosis berat dengan warna lamina yang menjadi kuning pada semua permukaan daun, dan warna tulang daun tetap hijau, serta daun menjadi kaku (Gambar 1a dan 1b), pada tanaman jeruk Tejakula dan jeruk Bali daun menunjukkan gejala klorosis sedang dengan warna lamina menjadi kuning pada sebagian permukaan daun, tulang daun warnanya tetap hijau, daun menjadi lebih tebal dan kaku (Gambar 1d dan 1i), sedang pada tanaman jeruk Besakih, Nipis, Purut, Lemo, dan Manis menunjukkan gejala klorosis ringan yang memiliki warna tulang daun hijau dengan lamina daun yang masih tetap hijau, daun menjadi tebal dan kaku (Gambar 1c, 1e, 1f, 1g, dan 1h).



Gambar 1 Daun tanaman jeruk L : Bergejala CVPD, R : Tidak bergejala CVPD, (a) Jeruk Siam Pengotan, (b) Jeruk Selayar Katung, (c) Jeruk Keprok Besakih Blancan, (d) jeruk Keprok Tejakula, (e) Jeruk Nipis Denpasar (f) Jeruk Purut Denpasar, (g) Jeruk Lemo Denpasar, (h) Jeruk Keprok Manis Bayung Gede, (i) jeruk Besar / Bali Bayung Gede

Menurut Wijaya (2003) menyatakan bahwa tanaman jeruk yang terserang CVPD memperlihatkan gejala daun menguning atau klorosis, warna tulang daun tetap hijau, ukuran daun menjadi kecil dan daun menjadi kaku. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Sarwono (1995) dan Soelarso (1996) bahwa klorosis terjadi karena pembentukan klorofil pada daun berkurang.

3.3 *Persentase dan Intensitas Serangan CVPD pada Tanaman Jeruk*

Hasil analisis rata-rata persentase tanaman jeruk yang menunjukkan gejala serangan penyakit CVPD di Kecamatan Kintamani berkisar antara 45–59% dapat dilihat pada Tabel 4, dengan jumlah persentase terbesar berada di desa Katung, dan persentase terendah berada di desa Bayung Gede, dan Blancan, sedang rata-rata intensitas serangan penyakit CVPD berkisar antara 7,58-9,44% (Tabel 3), dengan intensitas serangan penyakit CVPD terbesar berada di desa Bayung Gede, hal ini disebabkan karena tanaman yang terdapat di desa Bayung Gede sebagian besar merupakan tanaman jeruk yang

sudah berumur 4-10 yang telah terserang penyakit CVPD secara sistemik pada daun bagian cabang, atau pucuk tanaman, dan intensitas serangan penyakit CVPD terendah berada di desa Pengotan, yang banyak ditemukan tanaman jeruk yang berumur 1-3 tahun belum menunjukkan gejala serangan penyakit CVPD dan tanaman jeruk yang berumur lebih dari 3 tahun banyak menunjukkan gejala serangan parsial, dalam kondisi ini sebagian cabang atau ranting tanaman jeruk masih sehat

Menurut Adiartayasa, (2006) melaporkan bahwa jumlah persentase rata-rata tanaman jeruk yang menunjukkan gejala serangan penyakit CVPD pada tahun 2004 pada masing-masing petani sampel adalah berkisar 45-87% di desa Blancan, 65-97% di desa Katung, dan 57-89% di desa Bayung Gede. Sedang Intensitas serangan tanaman jeruk akibat serangan penyakit CVPD di masing-masing desa Blancan, Katung, dan Bayung Gede berturut-turut adalah 8,85 - 19,85%, 3,53 - 17,90%, 11,10 - 20,00%.

Tabel 3. Rataan Persentase dan Intensitas Tanaman Jeruk Terserang CVPD di Kecamatan Kintamani

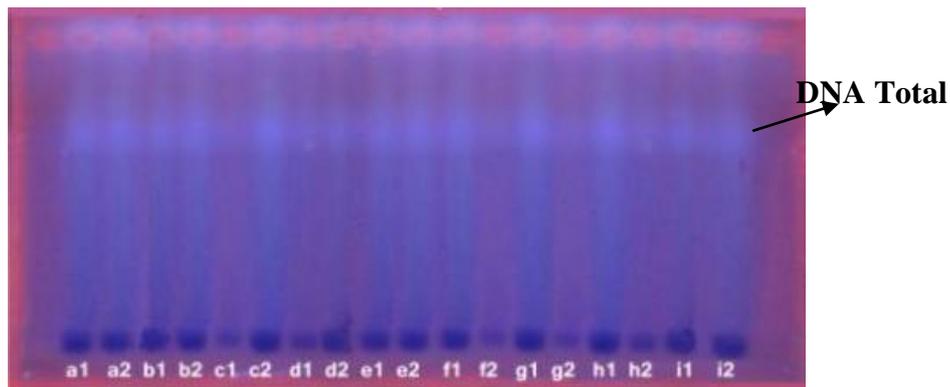
Areal Pertanaman di Kecamatan Kintamani	Tanaman Jeruk Terserang CVPD (%)	
	Persentase	Intensitas
Katung	59	8,44
Bayung Gede	45	9,44
Pengotan	54	7,58
Catur	48	7,80
Blancan	45	8,04
Rata - rata	50	8,26

Sumber : Hasil Penelitian, 2012

3.4 Isolasi Total DNA pada Daun Tanaman Jeruk

Isolasi total DNA tanaman dilakukan untuk mendapatkan pelet DNA yang akan dipergunakan dalam analisis PCR. Hasil isolasi DNA pada beberapa daun tanaman jeruk yang bergejala CVPD maupun yang tidak bergejala di Kecamatan Kintamani terlihat adanya pita DNA pada elektroforesis gel agarose 1% (Gambar 2), hal ini menunjukkan bahwa DNA tanaman sudah terisolasi dengan baik. Isolasi total DNA pada daun tanaman jeruk perlu dilakukan untuk memperoleh DNA template berkualitas baik dari daun tanaman jeruk yang akan digunakan dalam analisis PCR.

Menurut Taylor (1993), menyatakan bahwa amplifikasi dengan menggunakan PCR memerlukan kualitas DNA yang baik dengan program yang sesuai, selanjutnya dilaporkan juga oleh Ohtsu, *et al.* (2002), bahwa bakteri CVPD masih belum bisa dikultur sehingga tidak memungkinkan untuk mengisolasi DNA saja, maka dilakukan pendekatan dengan isolasi DNA total tanaman yang diinginkan untuk dideteksi

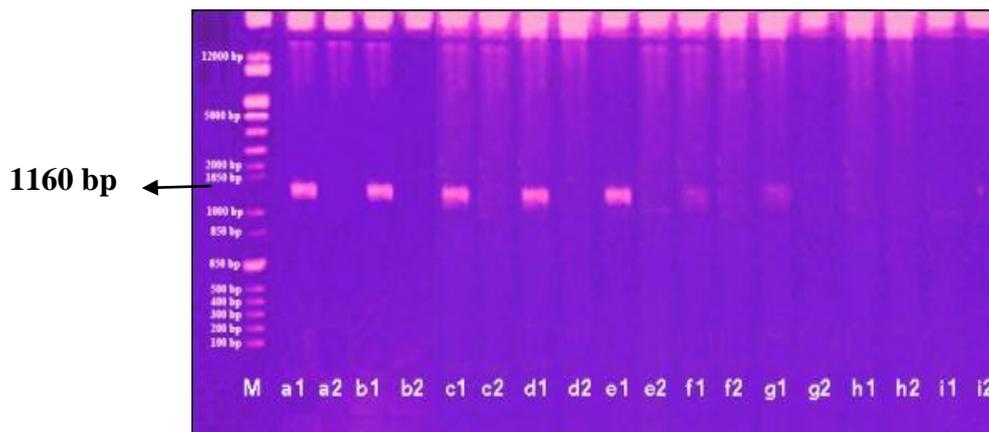


Gambar 2 Hasil Isolasi DNA total daun tanaman jeruk (**a1**) DNA jeruk Siam Pengotan bergejala CVPD, (**a2**) DNA jeruk Siam Pengotan tidak bergejala CVPD (**b1**) DNA jeruk Selayar Katung bergejala CVPD, (**b2**) DNA jeruk Selayar Katung tidak bergejala CVPD (**c1**) DNA jeruk Besakih Blancan bergejala CVPD, (**c2**) DNA jeruk Besakih Blancan tidak bergejala CVPD, (**d1**) DNA jeruk Tejakula bergejala CVPD, (**d2**) DNA jeruk keprok Tejakula tidak bergejala CVPD, (**e1**) DNA jeruk Manis Bayung Gede bergejala CVPD, (**e2**) DNA jeruk Manis Bayung Gede tidak bergejala CVPD, (**f1**) DNA jeruk Nipis Denpasar bergejala CVPD, (**f2**) DNA jeruk Nipis Denpasar tidak bergejala CVPD, (**g1**) DNA jeruk Purut Denpasar bergejala CVPD, (**g2**) DNA jeruk Purut Denpasar tidak bergejala CVPD (**h1**) DNA jeruk Lemo Denpasar bergejala CVPD, (**h2**) DNA jeruk Lemo Denpasar tidak bergejala CVPD, (**i1**) DNA jeruk Besar/Bali Bayung Gede bergejala CVPD, (**i2**) DNA jeruk Besar/Bali Bayung Gede tidak bergejala CVPD

3.5 Aplikasi Teknik PCR pada Daun Tanaman Jeruk

Hasil Analisis PCR terhadap tanaman jeruk sehat dan tanaman jeruk yang terserang CVPD dengan menggunakan primer spesifik CVPD pada elektroforesis gel agarose 1 %. Sampel daun tanaman jeruk yang memiliki variasi gejala klorosis dari ringan sampai berat menghasilkan pita DNA pada 1160 bp (Gambar 3a1, 3b1, 3c1, 3d1, 3e1, 3f1, 3g1, dan 3h1). Oleh karena bakteri *Liberobakter asiaticum* memiliki pita DNA pada 1160 bp, maka tanaman jeruk yang dideteksi adalah positif terhadap bakteri *Liberobakter asiaticum*. Berdasarkan hasil analisis terdapat beberapa sampel daun yang menghasilkan pita DNA yang sangat tipis seperti jeruk Nipis, Purut, dan Lemo, (Gambar 3f1, 3g1, dan 3 h1), selain itu daun tanaman jeruk yang tidak menunjukkan gejala klorosis dapat mengandung bakteri *Liberobakter asiaticum*.

Menurut Jagoueix et al. (1994) menyatakan bahwa berdasarkan sekuens spesifik pada fragmen 16S rDNA hasil PCR dari sampel tanaman sakit strain *Liberobakter asiaticum* yang mengamplifikasi DNA sekitar 1160 bp. Selanjutnya Nakashima et al. (1996) melaporkan bahwa dengan menggunakan primer spesifik CVPD dengan sekuens 16S rDNA hanya bakteri *Liberobakter asiaticum* yang mengamplifikasi, sedang dari bakteri lain, atau dari mitokondria dan kloroplas tanaman jeruk tidak mengamplifikasi.



Gambar 3 Hasil amplifikasi DNA daun jeruk dengan PCR (**M**) Marker DNA, (**a1**) DNA daun jeruk Siam bergejala CVPD, (**a2**) DNA daun jeruk siam tidak bergejala CVPD (**b1**) DNA daun jeruk Selayar bergejala CVPD, (**b2**) DNA daun jeruk selayar tidak bergejala CVPD (**c1**) DNA daun jeruk Besakih bergejala CVPD, (**c2**) DNA daun jeruk Besakih tidak bergejala CVPD, (**d1**) DNA daun jeruk Keprok Tejakula bergejala CVPD, (**d2**) DNA daun jeruk keprok Tejakula tidak bergejala CVPD, (**e1**) DNA daun jeruk Manis bergejala CVPD, (**e2**) DNA daun jeruk Manis tidak bergejala CVPD, (**f1**) DNA daun jeruk Nipis bergejala CVPD, (**f2**) DNA daun jeruk Nipis tidak bergejala CVPD, (**g1**) DNA daun jeruk Purut bergejala CVPD, (**g2**) DNA daun jeruk Purut tidak bergejala CVPD (**h1**) DNA daun jeruk Lemo bergejala CVPD, (**h2**) DNA daun jeruk Lemo tidak bergejala CVPD, (**i1**) DNA daun jeruk Besar/Bali bergejala CVPD, (**i2**) DNA daun jeruk Besar/Bali tidak bergejala CVPD

4. Kesimpulan

4.1 Simpulan

Berdasarkan hasil pengamatan tanaman secara morfologi di Kecamatan Kintamani dan sekitarnya didapatkan 9 jenis tanaman jeruk yaitu jeruk Siam, Selayar, Besakih, Tejakula, Manis, Nipis, Purut, Lemo, dan jeruk Bali, dengan gejala penyakit CVPD secara visual pada masing-masing tanaman jeruk memiliki variasi gejala klorosis dari ringan sampai berat. Persentase tanaman yang menunjukkan gejala serangan CVPD berkisar antara 45-59%, dengan intensitas serangan ringan (7,58-9,44%). Hasil deteksi penyakit CVPD pada masing-masing jenis tanaman jeruk yang memiliki variasi gejala klorosis dari ringan sampai berat pada elektroforesis 1% gel agarose menghasilkan pita DNA pada 1160 bp. Oleh karena bakteri *Liberobakter asiaticum* memiliki pita DNA pada 1160 bp, maka tanaman jeruk yang dideteksi dikatakan bereaksi positif terhadap bakteri *Liberobakter asiaticum*.

4.2 Saran

Berdasarkan hasil pengamatan gejala serangan penyakit CVPD di lapang, maka disarankan perlu dilakukan konfirmasi penyakit CVPD pada berbagai variasi gejala klorosis yang terjadi pada tiap jenis tanaman jeruk.

Daftar Pustaka

- Adiartayasa, W. 2006. Identifikasi Beberapa Varietas Jeruk dan Deteksi Patogen CVPD dengan PCR di Kecamatan Kintamani. [Tesis]. Program Pascasarjana Universitas Udayana.
- Boggie, L.M; & H, Person. 1988. Plant Roots and Their Environment. Development in Agricultural and Manajed, Forest, Uppsala Sweden. 560p.
- Jagoueix; J.M. Bove; & M. Garnier, 1994. PCR Detection of the Two "Candidatus"*Liberobacter* Spesies Assosiated with Greening Disease of Citrus Moleculer and Cellular Probes
- Nakashima, K; M, Prommintara; Y, Ohtsu; T, Kano; J, Imada; & M, Koizumi. 1996. Detection of 16S rDNA of Thai Isolates of Bacterium-Like Organisms associated with Greening disease of citrus. JIRCAS. No.3.
- Ohtsu, Y; M. Prommintara; S. Okuda; T. Goto; T. Kano; K. Nakashima, M.Koiszwni; J. Imada; & K. Kawashima 2002. Partial Purification of Thai Isolate of *Citrus Huanglongbing* (greening) Bacteriwn and Antiserum Production for Serological Diagnosis. J. Plant Phato!. 68: 372-377
- Putra, I.G.P.D. 1986. Cara Penilaian Serangan Penyakit di Lapangan. Petunjuk Praktikum Penyakit tumbuhan. Fakultas Pertanian, Universitas Udayana. Bali. 26 hal
- Rogers, SO, & AJ, Bendich. 1991. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Moleculer Biology Manual. USA : Kluwr Academic Publisher
- Sarwono, B. 1995. Jeruk dan Kerabatnya, PT. Penebar Swadaya, Jakarta
- Soelarso, R.B. 1996. Budidaya Jeruk Bebas Penyakit. Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- 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.
- Tirtawidjaja, S; & R. Suharsodjo, 1990. Penyakit CVPD merupakan bahaya laten bagi tanaman jeruk di Indonesia. Perlindungan Tanaman Menunjang Terwujudnya Pertanian Tangguh dan Kelestarian Lingkungan, PT Agricon 299-310
- Wijaya, IN. 2003. *Diaphorina citri* KUW (*Homoptera : Psyllidae*) : Bioteknologi dan Peranannya Sebagai Vektor Penyakit CVPD (*Citrus Veinj Phloem Degeneration*) Pada Tanaman Jeruk Siam. [Disertasi] Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor

Wirawan, I.G.P; L. Sulistyowati; & N. Wijaya, 2003. Mekanisme Tingkat Molekul Infeksi Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk dan Peran *Diaphorina citri* KUW sebagai Vektor. Denpasar Lemlit Universitas Udayana