

**Deteksi Keberadaan Penyakit CVPD (*Citrus Vein
Phloem Degeneration*) dengan Teknik PCR
(*Polymerase Chain Reaction*) di Dusun Untalan
Desa Jungutan Kecamatan Bebandem
Kabupaten Karangasem**

I KADEK PURNAWIRAWAN PUTRA
WAYAN ADIARTAYASA*)
I MADE MEGA ADNYANA

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

ABSTRACT

**Detection of CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) Disease Using PCR
Technique of Citrus from Untalan Sub Village, Jungutan Village, Bebandem
District, Karangasem Regency.**

This research aims to know about presentation of CVPD disease on citrus plants and detect CVPD disease using PCR technique with specific primer called 16S rDNA. This research was conducted at Laboratory of Genetics Resource and Biology Moleculer, Udayana University. Result for visual monitoring of presentation in CVPD symptom in four locations is 25%, 37%, 27%, 19%, and the average is 27%. The result for average the presentation of CVPD symptom in the shoot of citrus in each locations is 7.9%, 15.73%, 8.9%, and 7.07%. The isolation of leaves citrus DNA were appeared on 1% agarose in electrophoresis showed DNA band. The result of DNA amplified that were appeared on 1% agarose in electrophoresis showed DNA bands 1160 bp. 3 samples from 4 with specific symptom of CVPD gave positive PCR reaction. DNA Bands 1160 bp is expression by *Liberobacter asiaticum*, than the sample from Untalan Sub Village were detected positive for the *Liberobacter asiaticum* and the samples were infected by CVPD disease.

Keywords: CVPD, Untalan Sub Village, *Liberobakter asiaticum*, PCR

1. Pendahuluan

Penyakit CVPD disebabkan oleh Bakteri gram negatif *Liberobacter asiaticum* (Sandrine, *et al.*, 1996). Penularan penyakit CVPD dilakukan oleh serangga vektor *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera : Psyllidae) (Tirtawidjaja & Suharsojo, 1990; Wirawan, 2000). Penyakit ini diketahui berasal dari China sejak tahun 1919 (da Graca, 1991). Penyakit CVPD saat ini secara internasional namanya telah dibakukan menjadi *huang lung bin* (HLB) (Jaquouis *et al.* 1994; 1996).

Penyebaran penyakit CVPD di perkebunan jeruk di Bali mencapai 83% karena menggunakan bibit dengan mata tempel atau dengan batang bawah yang telah terinfeksi penyakit CVPD. Dusun Untalan merupakan salah satu Dusun yang terletak di Desa Jungutan, Kecamatan Bebandem Kabupaten Karangasem. Tahun 2013, produksi jeruk di Desa Jungutan adalah 78 ton, 80% diantaranya disumbangkan oleh Dusun Untalan yaitu sebesar 60 ton (BPS Kab. Karangasem, 2014). Berdasarkan hasil pengamatan secara visual di Dusun Untalan, didapatkan gejala yang mirip dengan gejala penyakit CVPD yaitu klorosis pada bagian daun namun tulang daun masih tetap berwarna hijau. Untuk memastikan tanaman tersebut terserang penyakit CVPD, maka perlu dilakukan deteksi secara molekuler dengan menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan penyakit CVPD pada tanaman jeruk di Dusun Untalan dan untuk mengetahui persentase serangannya.

2. Metode Penelitian

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2015 sampai Januari 2016 di Dusun Untalan, dan UPT Laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biologi Molekuler Pascasarjana Universitas Udayana.

2.2 Bahan dan Alat yang Digunakan

Bahan yang digunakan adalah sampel tanaman jeruk, nitrogen cair, DNA Kit, PCR Kit, agarose, TAE 1%, primer spesifik 16S rDNA 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 1160bp. Alat yang digunakan adalah eppendorf tube, mortar, sentrifugator, vortex, UV Transluminator, Mesin PCR dan Elektroforesis, timbangan, kamera, buku, label, pipet.

2.3 Pelaksanaan Penelitian

2.3.1 Penelitian Lapangan

Penelitian pengamatan gejala penyakit CVPD dilakukan secara visual pada pertanaman jeruk di Dusun Untalan, yaitu (1) menghitung jumlah tanaman menunjukkan gejala penyakit CVPD per 100 pohon dan (2) menghitung jumlah pucuk tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD dalam satu tanaman.

a. Persentase jumlah tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD

Jumlah tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD dilakukan secara visual dengan mengamati pertanaman jeruk di empat areal pertanaman jeruk di Dusun Untalan. Umur tanaman yang diamati berkisar antara 3-4 tahun. Kemudian jumlah tanaman jeruk dihitung baik yang menunjukkan gejala klorosis maupun tidak

menunjukkan gejala klorosis penyakit CVPD dari 100 tanaman per areal. Persentase tanaman yang terserang penyakit CVPD adalah jumlah tanaman yang menunjukkan gejala klorosis dibagi dengan jumlah tanaman yang diamati dan dikali 100%.

Persentase tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD dihitung dengan rumus :

$$P = \frac{a}{b} \times 100\% \quad \dots(1)$$

Keterangan : P = persentase tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD

a = jumlah tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD

b = jumlah tanaman yang diamati (100 tanaman)

b. Persentase pucuk tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD per tanaman

Sampel dipilih sebanyak 9 tanaman pada masing-masing areal dan ditentukan secara diagonal sampling. Jumlah pucuk tanaman dihitung seluruhnya, kemudian dihitung dan diamati secara visual jumlah pucuk yang menunjukkan gejala klorosis per tanaman, sehingga dapat dihitung persentase pucuk tanaman yang menunjukkan gejala klorosis penyakit CVPD dengan rumus :

$$P = \frac{x}{y} \times 100\% \dots\dots(2)$$

Keterangan : P = persentase tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD per tanaman

x = jumlah pucuk tanaman yang menunjukkan gejala klorosis per tanaman

y = jumlah pucuk tanaman per tanaman yang diamati

2.3.2 Deteksi secara Molekuler Penyebab Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk

Sampel daun dan tanaman yang menunjukkan gejala klorosis diambil secara random atau acak dari sampel tanaman yang dihitung persentase pucuk yang menunjukkan gejala, kemudian dideteksi secara molekuler dengan teknik PCR. Tahapan teknik PCR terdiri dari tiga tahapan yaitu isolasi total DNA, amplifikasi DNA, dan visualisasi hasil PCR.

Isolasi total DNA dilakukan dengan menghaluskan tulang 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

2.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati adalah persentase tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD, persentase pucuk yang menunjukkan gejala penyakit CVPD per tanaman, dan deteksi penyakit CVPD dengan teknik PCR dengan menggunakan primer 16S rDNA.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Kondisi Umum Dusun Untalan, Desa Jungutan

Desa Jungutan merupakan salah satu desa dari delapan desa yang berada di Kecamatan Bebandem, Kabupaten Karangasem. Luas wilayah Desa Jungutan yaitu 19,36 km² dengan ketinggian 500-700 mdpl. Batas wilayah Desa Jungutan yaitu di sebelah utara berbatasan dengan Gunung Agung, sebelah selatan dengan Desa Sibetan, sebelah timur dengan Desa Bebandem dan sebelah barat dengan Duda Utara. Desa Jungutan terdiri dari 2015 KK dengan jumlah penduduk seluruhnya 7589 orang (BPS Kabupaten Karangasem, 2014).

Dusun Untalan adalah salah satu dari 12 Dusun yang berada di Desa Jungutan. Berada pada ketinggian 700 mdpl. Dusun Untalan terdiri dari 159 KK yang sebagian besar bermata pencaharian sebagai petani. Wilayah Dusun Untalan terbagi atas wilayah perkebunan dan pemukiman. Tanaman yang dibudidayakan adalah tanaman salak, jeruk, cengkeh, dan pisang. Sebagian besar didominasi oleh tanaman salak dan tanaman jeruk. Penanaman jeruk di Dusun Untalan dimulai sejak tahun 2011. Luas daerah penanaman jeruk yaitu ±8 Ha. Petani jeruk di Dusun Untalan membentuk kelompok tani bernama subak abian Tunas Mekar dengan jumlah anggota 39 orang.

Hasil pengamatan pada pertanaman jeruk di Dusun Untalan didapatkan dua jenis jeruk yaitu jeruk siam (*Citrus nobilis microcarpa* (Lour) Hassk.) dan jeruk selayar (*Citrus nobilis chysocarpa* (Lour) Holsk.) yang dapat dilihat pada gambar 1. Ciri morfologi jeruk siam adalah tinggi tanaman sekitar 1-2 meter (Gambar 1 B), batang tanaman tidak memiliki duri. Warna daun bagian atas hijau mengkilat. Lebar daun sekitar 2-4 cm dan panjang daun sekitar 3-6 cm. Ciri morfologi jeruk selayar adalah tinggi tanaman sekitar 1-3 meter (Gambar 1 D), batang berduri dengan

panjang duri sekitar 2-5 cm. Pohon berbentuk menunjang, percabangan mulai dari 20 cm di atas tanah. Warna daun bagian atas hijau tua mengkilat. Lebar daun sekitar 2-4 cm dan panjang daun sekitar 3-6 cm. Umur tanaman jeruk di beberapa areal pertanaman jeruk di setiap lokasi berkisar antara 3 – 4 tahun. Hasil pengamatan visual pada pertanaman jeruk di Dusun Untalan ditemukan gejala klorosis pada daun jeruk yang menyerupai gejala khas CVPD.



A



B



C



D

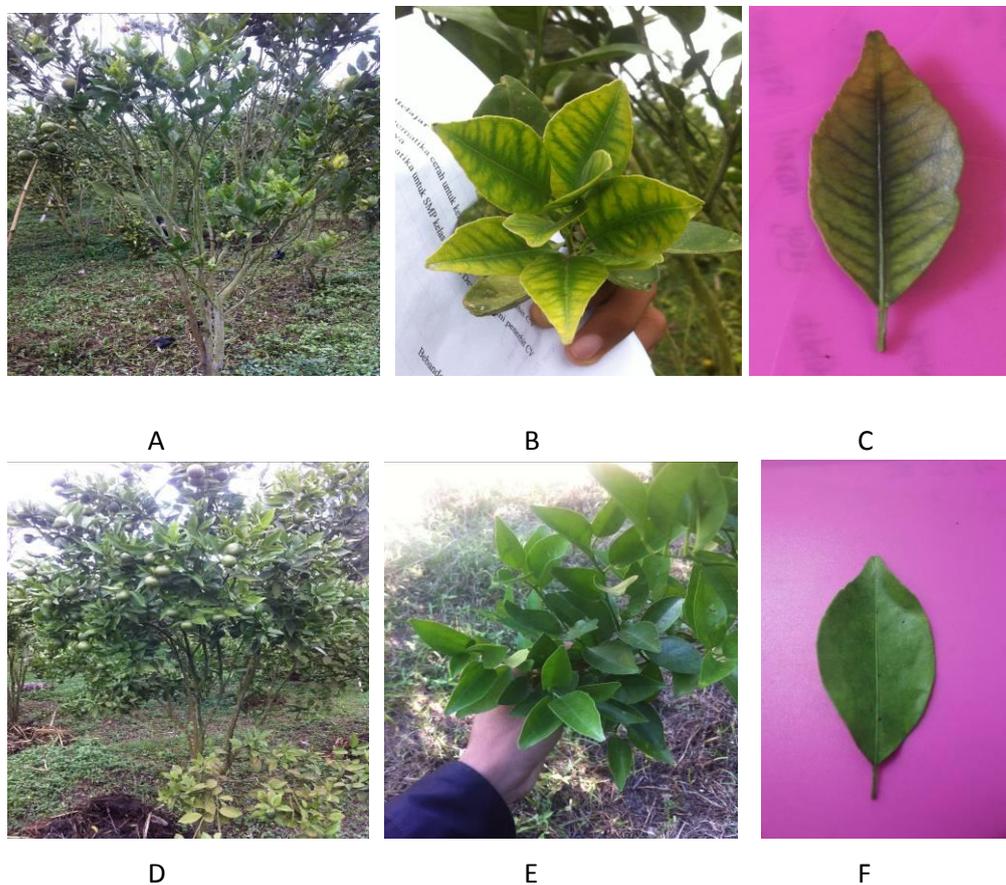
Gambar 1. Hasil pengamatan lokasi pertanaman jeruk. A. Lokasi penanaman jeruk siam, B. Pohon jeruk siam, C. Lokasi penanaman jeruk selayer, D. Pohon jeruk selayer

3.2 Gejala Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk

Hasil pengamatan secara visual ditemukan adanya gejala penyakit CVPD pada pertanaman jeruk siam dan jeruk selayer di Dusun Untalan. Gejala yang timbul pada jeruk siam yaitu gejala pada pohon yang diamati terjadi secara parsial atau sebagian tanaman jeruk (Gambar 2 A). Gejala klorosis pada bagian pucuk daun jeruk siam sangat terlihat jelas (Gambar 2 B). Daun jeruk siam yang menunjukkan gejala klorosis pada lamina daun yang nampak berwarna kuning sedangkan pada tulang daun berwarna hijau (Gambar 2 C). Sedangkan gejala yang timbul pada jeruk selayer, pohon jeruk selayer masih mengalami gejala parsial atau hanya sebagian tanaman yang menunjukkan gejala klorosis (gambar 2 D). Bagian pucuk yang

diamati pada daun jeruk selayar masih berwarna hijau dan belum terlihat jelas gejala klorosis yang muncul (Gambar 2 E). pengamatan yang dilakukan pada daun jeruk selayar yaitu terlihat bahwa daun jeruk selayar mengalami gejala ringan, lamina daun masih berwarna hijau, tulang daun juga masih berwarna hijau (Gambar 2 F).

Menurut Adiantayasa (2006), gejala penyakit CVPD yang tampak pada daun jeruk muda, sedang dan tua tidak menunjukkan perbedaan yang jelas karena gejala tampak pada semua tingkat umur. Daun bergejala berat warnanya menjadi klorosis (kuning) pada seluruh permukaan daun, tulang daun warnanya hijau tua atau lebih tua dan daunnya menjadi lebih kaku dan lebih tebal. Daun yang bergejala sedang, terjadi klorosis pada sebagian permukaan daun, daun menjadi tebal dan tulang daun lebih tua dan daun menjadi kaku. Daun bergela ringan warna daun masih terlihat hijau, tulang daun lebih tua, dan daun menjadi kaku.



Gambar 2. Gejala klorosis pada tanaman jeruk di Dusun Untalan. A. Pohon jeruk siam, B. Pucuk daun jeruk siam, C. Daun jeruk siam yang menunjukkan gejala klorosis sangat jelas, D. Pohon jeruk selayar, E. Pucuk daun jeruk selayar F. Daun jeruk selayar yang menunjukkan gejala klorosis ringan.

3.3 *Persentase Tanaman Jeruk yang Menunjukkan Gejala Penyakit CVPD*

Hasil rata-rata persentase tanaman jeruk yang menunjukkan gejala serangan penyakit CVPD di Dusun Untalan yaitu sebesar 27% dapat dilihat pada tabel 1, dengan jumlah persentase terbesar berada di lokasi 2 yaitu sebesar 37 %, dan persentase terendah berada di lokasi 4 yaitu sebesar 19 %.

Tabel 1. Rata-rata Persentase Tanaman Jeruk Terserang CVPD di Dusun Untalan

No	Nama Sampel	Jumlah tanaman terserang	Jumlah Tanaman yang diamati	Persentase serangan
1	Lokasi 1	25	100	25%
2	Lokasi 2	37	100	37%
3	Lokasi 3	27	100	27%
4	Lokasi 4	19	100	19%
Rata-rata		27	100	27%

3.4 *Persentase Pucuk Tanaman Jeruk yang Menunjukkan Gejala Penyakit CVPD per Tanaman*

Hasil rata rata persentase pucuk tanaman per tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD di masing masing tanaman di setiap lokasi yaitu berturut turut 7.9%, 15.73%, 8.9%, dan 7.07%, persentase pucuk tanaman yang menunjukkan gejala paling tinggi adalah pada lokasi ke-2 sampel jeruk ke-5 sebesar 29.79% dan yang memiliki persentase terendah adalah pada lokasi ke-4, sampel jeruk ke-6 yaitu sebesar 5.46%. untuk lebih jelasnya bisa dilihat pada tabel berikut.

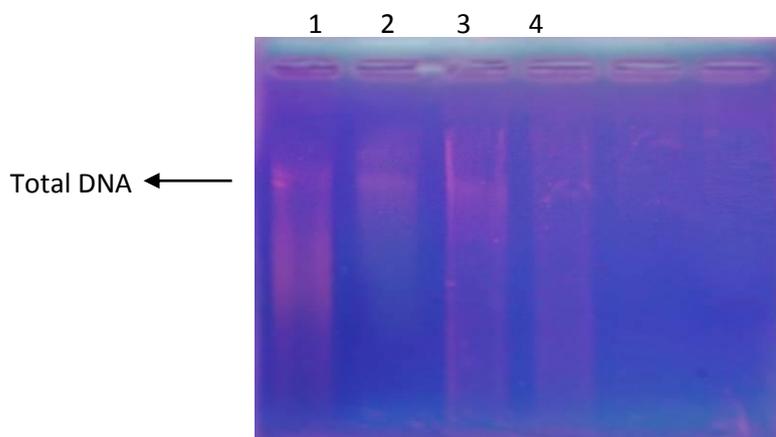
Tabel 2. Persentase pucuk tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD per tanaman

Nama Lokasi	Persentase (%)									Rata-rata
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	
Lokasi 1	8,3	9,04	5,73	11,55	6,02	6,8	9,54	8,3	6,22	7,9
Lokasi 2	11,01	9,44	14,34	24,3	29,79	11,64	12,23	10,61	18,22	15,73
Lokasi 3	10,45	7,89	8,19	8,97	7,3	9,97	10	8,2	9,52	8,9
Lokasi 4	6,99	6,14	9,78	10,58	6,6	5,46	6,9	6,01	5,16	7,07

3.5 *Deteksi secara Molekuler Penyebab Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk*

Hasil isolasi total DNA sampel daun tanaman jeruk pada elektroforesis gel agarose 1%, didapatkan adanya pita total DNA pada kolom 1,2,3,4, namun tampak

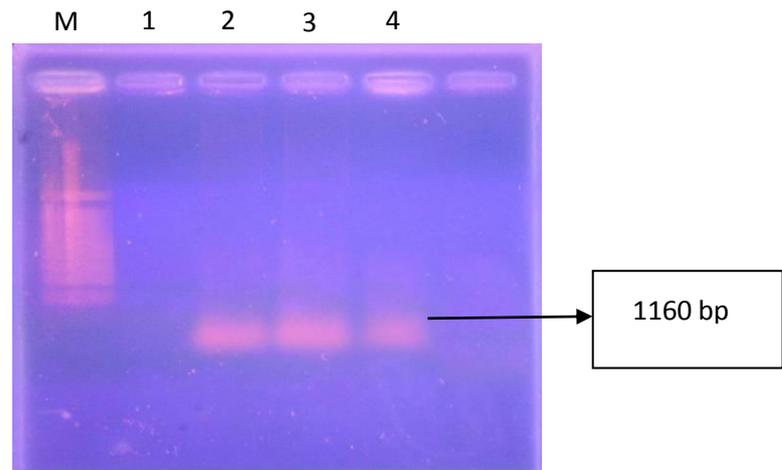
semir dan hampir pada kolom tersebut terlihat masih adanya RNA (Gambar 3). Isolasi total DNA tanaman perlu dilakukan karena bakteri penyebab penyakit CVPD belum bisa dikultur dan untuk memperoleh kualitas DNA template yang baik. Adanya pita DNA hasil isolasi total DNA daun tanaman jeruk yang dielektroforesis menggunakan gel agarose, menunjukkan bahwa DNA tanaman sudah terisolasi dengan baik. Dalam amplifikasi dengan PCR diperlukan kualitas DNA template yang baik dan program yang sesuai (Taylor, 1993). Menurut Ohtsu *et al.* (2002), oleh karena bakteri CVPD masih belum dikultur sehingga tidak memungkinkan untuk mengisolasi DNANYA saja, maka dilakukan pendekatan dengan isolasi total DNA tanaman yang diinginkan untuk dideteksi. Hasil isolasi total DNA tanaman kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR.



Gambar 3. Hasil elektroforesis isolasi total DNA, 1. Lokasi pertanaman jeruk 1, 2. Lokasi pertanaman jeruk 2, 3. Lokasi pertanaman jeruk 3, 4. Lokasi pertanaman jeruk 4

Hasil elektroforesis pada gel agarose 1% dari DNA teramplifikasi menggunakan primer spesifik untuk penyakit CVPD 16S rDNA didapatkan pita DNA 1160 bp pada kolom 2, 3, dan 4. (Gambar 4). Oleh karena bakteri *L. asiaticum* memiliki pita pada 1160 bp, maka sampel pada kolom 2, 3, dan 4 bereaksi positif dengan bakteri tersebut dan dapat dikatakan bahwa sampel 2, 3, dan 4 positif terserang penyakit CVPD. Hal ini telah dilaporkan oleh Jagoeuix *et al.* (1994) bahwa sekuen spesifik pada fragmen 16S rDNA hasil PCR dari sampel tanaman sakit menggunakan primer OI1 (*forward*) dan OI2C (*reverse*) untuk strain Asia akan mengamplifikasi DNA sekitar 1160 bp. Pita DNA 1160 bp tidak ditemukan pada kolom 1, maka pada sampel tersebut bereaksi negatif dengan bakteri *L. asiaticum* walaupun daun tersebut sudah menunjukkan gejala klorosis hal ini dikarenakan kemungkinan bahwa konsentrasi bakteri dalam daun yang rendah sehingga disaat isolasi, DNA bakteri tidak ikut terisolasi hanya DNA tanaman saja yang terisolasi dengan baik. Hal ini juga didukung hasil penelitian Meitayani, dkk (2014) yang

melaporkan bahwa sampel daun jeruk baik Selayar maupun Siam yang bergejala CVPD akan menunjukkan pita DNA dengan ukuran 1160 bp pada hasil PCR yang berarti sampel tersebut positif mengandung bakteri *Liberobacter*, patogen penyebab penyakit CVPD, namun tidak semua sampel daun jeruk yang bergejala penyakit CVPD berhasil diamplifikasi, ada beberapa sampel daun jeruk yang secara visual menunjukkan gejala khas CVPD tetapi pada saat di amplifikasi hasil visualisasi PCR tidak menunjukkan adanya pita DNA, berarti pada sampel tersebut tidak ditemukan keberadaan bakteri *L. asiaticum*.



Gambar 4. Hasil elektroforesis pada gel agarose 1% dari DNA teramplifikasi : M = DNA Marker, 1 = Sampel daun tanaman jeruk Lokasi 1, 2 = Sampel daun tanaman jeruk Lokasi 2, 3 = Sampel daun tanaman jeruk Lokasi 3, 4 = Sampel daun tanaman jeruk Lokasi 4.

4. Kesimpulan dan Saran

4.1 Kesimpulan

1. Gejala klorosis ditemukan pada jeruk siam dan jeruk selayar di Dusun Untalan.
2. Persentase tanaman terserang penyakit CVPD berkisar antara 19% sampai dengan 37%. Hasil rata-rata persentase tanaman jeruk yang menunjukkan gejala serangan CVPD sebesar 27%.
3. Hasil rata-rata persentase pucuk tanaman terserang penyakit CVPD per tanaman di lokasi 1, lokasi 2, lokasi 3, dan lokasi 4 yaitu berturut-turut 7.9%, 15.73%, 8.9%, dan 7.07%.
4. Hasil elektroforesis gel agarose 1% DNA teramplifikasi ditemukan adanya pita DNA 1160 bp. Oleh karena pita DNA 1160 bp adalah milik *L. asiaticum* maka dapat dikatakan bahwa tanaman jeruk di Dusun Untalan terserang penyakit CVPD

4.2 Saran

Berdasarkan hasil pengamatan jenis jeruk, gejala penyakit CVPD, dan deteksi dengan teknik PCR dapat disarankan perlu dilakukan budidaya yang baik untuk menekan distribusi *L. asiaticum* dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai keberadaan *Diaphorina citri* sebagai vektor penyakit CVPD.

Daftar Pustaka

- Adiartayasa, W. 2006. Identifikasi Beberapa Varietas Jeruk dan Deteksi Patogen CVPD dengan PCR di Kecamatan Kintamani. [Tesis]. Universitas Udayana. Denpasar
- Adiartayasa, W., I G P Wirawan, I N Wijaya, I G N Bagus. 2012. *Laporan Akhir Kajian Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk di Kabupaten Karangasem*. Kerjasama Penelitian Dinas Pertanian TPH Kabupaten Karangasem dengan LPPM UNUD. Denpasar
- BPS Kabupaten Karangasem. 2014. Kecamatan Bebandem dalam Angka Tahun 2014. Katalog BPS : 1102001.5107060. Kabupaten Karangasem
- da Graca, J.V. 1991. *Citrus Greening Disease*. Annu. Rev. Phytopathol. 29 :109-136.
- Jaquoeix S., J.M Bove, and M. Garnier. 1994. The phloem limited bacterium of greening disease of citrus is as member of the alpha subdivision of protobacteria. *International J. Systemic Bacteriol.* 44:397-86.
- Meitayani, Swari N. P., W. Adiartayasa, I. N. Wijaya. 2014. Deteksi Penyakit Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) pada Tanaman Jeruk di Bali. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika* Vol. 3 No. 2. FP UNUD. Denpasar.
- Ohtsu, Y., Prommintara, M., M. Okuda, S., Goto, T., Kano, T., Nakashima, K., Koizumi, M. Imada, J., and Kawashima, K. 2002. Partial Purification of Thai Isolate of Citrus Huanglongbing (greening) Bacterium and Anticardiolipin Production For Serological Diagnosis. *J. Gen. Plant Pathol.* 68 : 372-377
- Rogers, SO, & AJ, Bendich. 1991. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*. USA : Kluwer Academic Publisher
- Sandrine, J., Bove, J.M., and Garnier, M. 1996. PCR Detection of Two Candidates Liberobacter Species Associated With Greening Disease of Citrus. *Molecular and Cellular Probes.* 10:43-50.
- Sarwono, B. 1995. *Jeruk dan Kerabatnya*, PT. Penebar Swadaya, Jakarta
- Taylor, G.R. 1993. *Polymerase Chain Reaction. Basic Principles and Automation*. Dalam *PCR A Practical Approach*. Editors : J. M Mc Pherson; Quirke M J.R. Taylor. Oxford. Oxford University Press.
- 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, I. N. 2003. *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera : Psyllidae): Bioteknologi dan Perannya Sebagai Vektor Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk Siam. (Disertasi). Bogor : Program Pascasarjana IPB. 114 Hal.
- 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.