

Deteksi Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Tanaman Jeruk di Bali

NI PUTU SWARI MEITAYANI
WAYAN ADIARTAYASA*)
I NYOMAN WIJAYA

Program Study Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar 80362 Bali
*) E-mail: adiartayasaw@gmail.com

ABSTRACTS

Detection of *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) Disease by *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Technique on Citrus Plant in Bali

CVPD disease is one of many important disease on citrus plant caused by *Liberobacter asiaticum*. The mechanism of infection is not yet known, so that the efforts to control the disease have not been adequately. In the research, we tried to detect CVPD disease on citrus plant at several locations in the centre of the citrus plantation in Bali used the PCR technique. The results of reseach showed eleven from eighteen sample is positive have contain for the *L. asiaticum* that show size of DNA 1160 bp, because the size of 1160 bp DNA bands is expression by *L. asiaticum*, then the citrus leaf samples were detected positive for the *L. asiaticum*. Based on the results of the calculation incidence of the disease with percentage of attack is 54,38% and the intensity of CVPD diseased plants was 9,86% showed CVPD disease was spread over eight villages consist of Katung, Belancan, Bayung Gede, Awan, Catur, Pengotan, Pelaga and Petang.

Keyword: *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD), *Liberobacter asiaticum*, *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Jeruk merupakan salah satu komoditas buah-buahan penting di Indonesia selain pisang dan mangga. Saat ini usaha untuk meningkatkan produksi jeruk masih mengalami hambatan terutama akibat adanya serangan CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) yang menghancurkan tanaman jeruk yang ada di sentra-sentra penghasil jeruk. Penyakit CVPD disebabkan oleh *Liberobacter* yang merupakan bakteri gram negatif yang tergolong subdivisi Protobacteria (Sandrine *et al.*, 1996). Menurut Dwiastuti (2000), serangan penyakit CVPD di Bali Utara menyebabkan penurunan produksi jeruk sampai 60%.

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. Dalam penanggulangan penyakit CVPD ini telah banyak dilakukan cara-cara pengendalian, walaupun demikian penyakit CVPD masih ditemukan di berbagai sentra pertanaman jeruk dan sampai saat ini belum ditemukan cara pengendalian penyakit CVPD yang tepat (Wirawan dkk, 2003).

Berdasarkan hasil pengamatan secara visual di lapang penyakit CVPD telah menyerang pertanaman jeruk di setiap lokasi berdasarkan pengamatan secara visual ditemukan sehingga perlu dilakukan deteksi terhadap bakteri penyakit CVPD dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seberapa besar tingkat persentase serangan dan intensitas tanaman yang terserang penyakit CVPD serta mendeteksi penyakit CVPD dengan menggunakan primer spesifik untuk bakteri CVPD di setiap lokasi.

2. Bahan dan Metode

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana, Denpasar. Pengambilan sampel jeruk yang bergejala CVPD dilakukan di sentra-sentra pertanaman jeruk di Bali yaitu di kecamatan Kintamani (desa Katung, Belancan, Awan, Bayung Gede, Catur), Bangli (desa Pengotan) dan Petang (desa Petang dan Pelaga). Penelitian dilakukan sejak bulan April sampai Juli 2012.

2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah daun tanaman jeruk yang bergejala di beberapa sentra pertanaman jeruk di Kabupaten Bangli dan Badung. Bahan lain yang diperlukan : Aquabides, Vivantis – GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Buffer PL, Buffer PB, Wash Buffer, Elution Buffer), Proteinase K, Ethanol, PCR Kit (2x PCR Master Solution (*i*-Taq™), *i*-Taq™ DNA Polymerase (5µ/µl), PCR Reaction Buffer), F Primer OI1 dan R Primer OI2c, Etidium Bromida, Loading Dye, TAE Buffer, TE Buffer, Agarose.

2.3 Pelaksanaan Penelitian

2.3.1 Persentase Serangan dan Intensitas Tanaman Terserang CVPD

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode diskriptif, melalui pengamatan persentase dan intensitas serangan penyakit CVPD di lapangan. Pengamatan pertanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD dilakukan dengan mengamati 100 pohon tanaman jeruk dalam satu hamparan di masing-masing lokasi. Peubah yang diamati adalah persentase tanaman yang menunjukkan gejala penyakit CVPD dan intensitas kerusakan tanaman terserang. Persentase tanaman

jeruk yang terserang CVPD dan intensitas kerusakan tanaman yang terserang CVPD dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Persentase serangan penyakit CVPD (Boggie dan Hans, 1995)

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

Keterangan :

- P = Persentase tanaman jeruk yang terserang CVPD
- X = Jumlah tanaman yang terserang CVPD
- N = Jumlah tanaman yang diamati

Intensitas kerusakan tanaman yang terserang CVPD (Putra, 1986)

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

Keterangan :

- I = Intensitas tanaman jeruk yang terserang CVPD
- n = Jumlah pucuk tanaman yang terserang CVPD
- v = Nilai skala (harga numerik) dari setiap kategori
- Z = Nilai skala dari kategori tertinggi
- N = Jumlah pucuk tanaman keseluruhan yang diamati

Tabel 1. Intensitas Tanaman Terserang CVPD

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

Sumber : Sarwono, 1995

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 25% - 50% pucuk menunjukkan gejala CVPD
4	Bergejala berat 50% - 75% pucuk menunjukkan gejala CVPD
5	Bergejala sangat Berat / puso 75 % - 100% pucuk menunjukkan gejala CVPD

Sumber : Sarwono, 1995

2.3.2 Deteksi Penyakit CVPD

Deteksi penyakit CVPD dilakukan dengan menggunakan primer 16S rDNA (Bove *et al.*, 1996), 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') melalui beberapa tahap, tahapan tersebut antara lain:

Isolasi Total DNA Tanaman Jeruk

Isolasi DNA dilakukan dengan metode sebagai berikut : 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 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 dengan PCR

Analisis PCR untuk mendeteksi keberadaan penyakit CVPD dilakukan dengan menggunakan primer spesifik dari 16S rDNA. DNA hasil isolasi diamplifikasikan dengan reaksi PCR sebagai berikut: 2µl DNA sampel, 1µl forward primer OI1, dan 1µl reverse primer OI2c, 10 µl PCR master mix solution, dan 6 µl buffer TE. Menggunakan primer OI1 dan OI2c ukuran DNA yang teramplifikasi adalah 1160bp. Amplifikasi DNA dilakukan dengan program sebagai berikut: Pre-treatment pada suhu 92°C selama 30 detik dengan 1 siklus ulangan, Bagian kedua menggunakan 40 siklus ulangan: 1) Denaturasi pada suhu 92°C selama 60 detik, 2) Annealing pada suhu 60°C selama 30 detik dan, 3) Elongation pada suhu 72°C selama 90 detik dan Extension pada suhu 72°C selama 90 detik dengan 1 siklus ulangan.

Elektroforesis Gel Agarose dan Visualisasi Hasil PCR

Gel agarose terdiri dari 1% agarose dilarutkan dalam 100 ml TAE *buffer* (terdiri dari 40 mM tris asetat pH 7,9; 2 mM Sodium EDTA). Sampel DNA (8µl DNA + 2µl loading dye) masing-masing diisikan pada sumuran gel. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 volt selama ± 20 menit. Rendam dalam larutan EtBr selama ± 15 menit. Kemudian hasil elektroforesis divisualisasikan dengan UV transiluminator untuk melihat posisi pita (band) DNA dari tiap sampel kemudian di dokumentasikan.

3. Hasil Dan Pembahasan

3.1 Keadaan Umum Pertanaman Jeruk

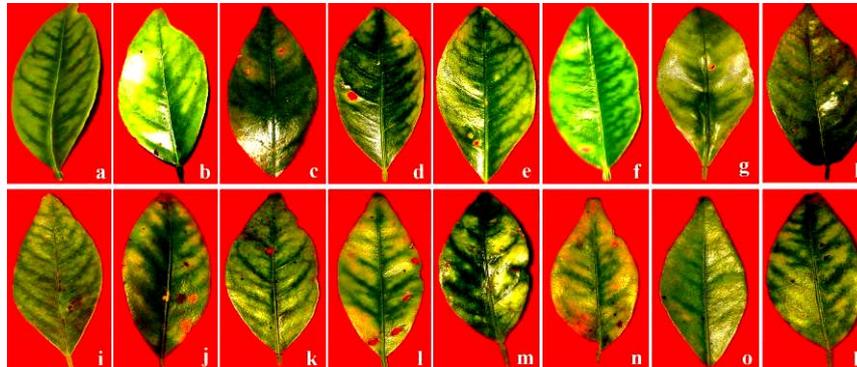
Berdasarkan hasil pengamatan lapang di setiap lokasi didapatkan beberapa jenis tanaman jeruk seperti jeruk Keprok Besakih, Keprok Tejakula, jeruk Selayar, jeruk Siam, jeruk Besar, jeruk Purut, jeruk Nipis, jeruk Lemo, jeruk Manis namun jeruk Siam merupakan jenis yang mendominasi pertanaman jeruk di tiap lokasi. Umumnya petani lebih senang menanam jenis Siam karena lebih cepat berbuah dan produktivitasnya lebih tinggi serta rasa buahnya yang manis. Usia tanaman jeruk di beberapa areal pertanaman jeruk di setiap lokasi berkisar antara 2 – 15 tahun.

Di desa Katung, Belancan, Bayung Gede, Catur, Awan, Pengotan, Pelaga dan Petang menunjukkan bahwa penyakit CVPD telah menyerang pertanaman jeruk di setiap lokasi. Hal ini terjadi karena para petani setempat menggunakan bibit dengan mata tempel yang kemungkinan bibit tersebut diambil dari tanaman induk yang telah terinfeksi penyakit CVPD. Hal tersebut didukung oleh Adiartayasa (2006) yang melaporkan bahwa pada tahun 2004 di desa Katung dan Belancan petani membuat bibit jeruk sebanyak 10.000 pohon yang terdiri dari jeruk Selayar, jeruk Siam, jeruk Mulung, jeruk Batur, dan jeruk Besakih yang akan ditanam pada perkebunan di desa Katung dan Belancan.

3.2 Gejala Serangan Penyakit CVPD Pada Tanaman Jeruk (*Citrus sp.*)

Berdasarkan hasil pengamatan secara visual, gejala serangan penyakit CVPD pada daun jeruk Selayar dan Siam di masing-masing lokasi tampak gejala klorosis yang bervariasi. Daun jeruk Selayar Katung, Belancan dan Pengotan (Gambar 1 a, b dan f) dan Siam Belancan, Awan, Catur, Pengotan dan Petang (Gambar 1 j, l, m, n dan p) yang terserang CVPD memperlihatkan gejala klorosis berat dengan warna lamina yang menguning pada semua permukaan daun, dan warna tulang daun tetap hijau, serta daun menjadi tebal dan kaku. Pada daun jeruk Selayar Awan dan Catur (Gambar 1 d dan e) dan Siam Katung dan Bayung Gede (Gambar 1 i dan k) daun menunjukkan gejala klorosis sedang dengan warna lamina menguning pada sebagian permukaan daun, tulang daun warnanya tetap hijau, daun menjadi lebih tebal dan kaku, sedangkan pada daun jeruk Selayar Bayung Gede, Pelaga dan Petang (Gambar 1 c, g, dan h) dan Siam Pelaga (Gambar 1 o) menunjukkan gejala klorosis ringan

yang memiliki warna tulang daun hijau dengan lamina daun yang masih tetap hijau, daun menjadi tebal dan kaku.



Gambar 1. Gejala CVPD pada daun jeruk Selayar di desa Katung (a), desa Belancan (b), desa Bayung Gede (c), desa Awan (d), desa Catur (e), desa Pengotan (f), desa Pelaga (g), desa Petang (h). Gejala CVPD pada daun jeruk Siam di desa Katung (i), desa Belancan (j), desa Bayung Gede (k), desa Awan (l), desa Catur (m), desa Pengotan (n), desa Pelaga (o), desa Petang (p).

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) bahwa klorosis terjadi karena pembentukan klorofil pada daun berkurang.

3.3 Persentase Serangan dan Intensitas Tanaman Terserang CVPD

Berdasarkan hasil pengamatan gejala di sentra pertanaman jeruk di masing-masing lokasi persentase serangan CVPD berkisar antara 45% sampai dengan 68%. Hasil rata-rata persentase tanaman jeruk yang menunjukkan gejala serangan CVPD sebesar 54,38%, persentase terendah di desa Belancan dan Bayung Gede (45%) dan tertinggi di desa Pelaga (68%) (Tabel 3).

Tabel 3. Rataan Persentase dan Intensitas Tanaman Jeruk Terserang CVPD

Areal Pertanaman di Bali	Tanaman Jeruk Terserang CVPD (%)	
	Persentase Serangan (%)	Intensitas Serangan (%)
Katung	59	8,44
Belancan	45	8,04
Bayung gede	45	9,44
Awan	59	12,14
Catur	48	7,80
Pengotan	54	7,58
Pelaga	68	13,23
Petang	57	12,26
Rata-rata	54,38	9,86

Sumber : Hasil Penelitian tahun 2012

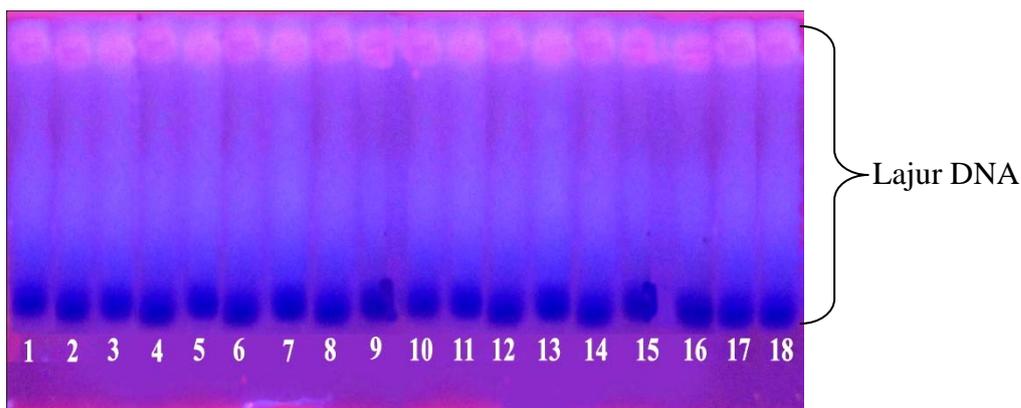
Intensitas tanaman terserang penyakit antara 7,58% sampai dengan 13,23%. Hasil rataannya sebesar 9,86%, persentase terendah di desa Pengotan (7,58%) dan tertinggi di desa Pelaga (13,23%) (Tabel 3).

Berdasarkan data tersebut dapat dilihat bahwa penyakit CVPD telah menyerang sebagian besar pertanaman jeruk di masing-masing lokasi, oleh sebab itu sebaiknya segera dilakukan tindakan pengendalian untuk mencegah penyebaran penyakit semakin luas.

3.4 Deteksi Penyakit CVPD Pada Tanaman Jeruk dengan PCR

3.4.1 Isolasi Total DNA

Hasil isolasi total DNA pada beberapa daun tanaman jeruk di beberapa lokasi terlihat adanya lajur pita DNA pada elektroforesis gel agarose 1% (Gambar 2). Isolasi total DNA 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).



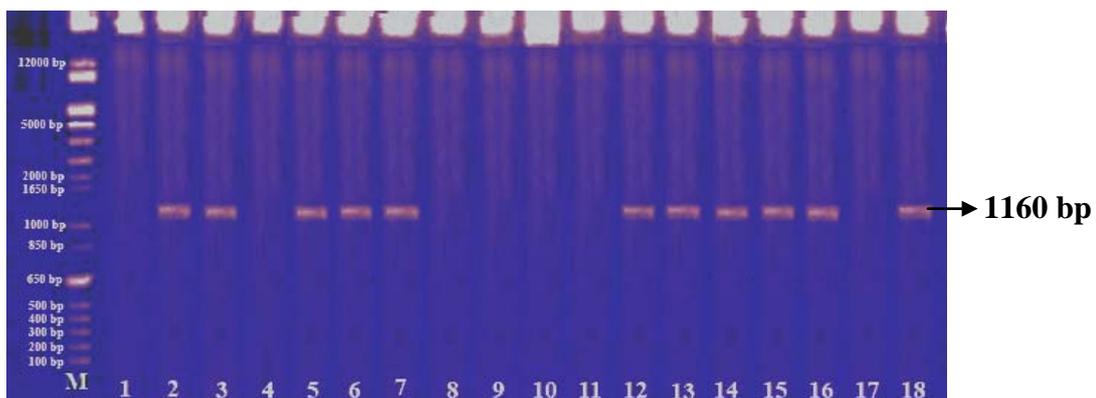
Gambar 2. DNA total daun jeruk. Selayar: Tidak bergejala (1); Desa Katung (2); Desa Belancan (3); Desa Bayung Gede (4); Desa Awan (5); Desa Catur (6); Desa Pengotan (7); Desa Pelaga (8); Desa Petang (9). Siam: Tidak bergejala (10); Desa Katung (11); Desa Belancan (12); Desa Bayung Gede (13); Desa Awan (14); Desa Catur (15); Desa Pengotan (16); Desa Pelaga (17); Desa Petang (18).

3.4.2 Visualisasi Hasil Amplifikasi PCR

Hasil amplifikasi PCR terhadap DNA yang diisolasi dari sampel daun tanaman jeruk tidak bergejala dan yang bergejala penyakit CVPD menunjukkan bahwa sebelas dari delapan belas sampel tanaman jeruk Selayar dan Siam yang digunakan menunjukkan terlihat adanya pita DNA dengan ukuran 1160 bp yakni pada kolom 2, 3, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 16 dan 18 (Gambar 3), hal itu berarti sebelas sampel tersebut mengandung bakteri *Liberobacter* dimana patogen penyebab penyakit CVPD di Bali adalah bakteri *L. asiaticum* karena keberadaan bakteri ini terdeteksi

dengan primer 16S rDNA. Berdasarkan hasil amplifikasi PCR tersebut sampel yang positif mengandung bakteri *L. asiaticum* ditemukan pada sampel daun jeruk Selayar desa Katung, Belancan, Bayung Gede, Awan, Catur, Pengotan serta pada sampel daun jeruk Siam desa Belancan, Bayung Gede, Awan, Catur, Pengotan, Bayung Gede, Petang.

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* yakni sampel daun jeruk Selayar desa Bayung Gede, Pelaga, Petang dan sampel daun jeruk Siam desa Katung serta Pelaga (kolom 4, 8, 9, 11 dan 17).



Gambar 3. Visualisasi DNA hasil deteksi penyakit CVPD pada sampel daun tanaman jeruk di tiap lokasi. Selayar tidak bergejala CVPD (1). Selayar bergejala CVPD : Desa Katung (2), Desa Belancan (3), Desa Bayung Gede (4), Desa Awan (5), Desa Catur (6), Pengotan (7), Pelaga (8), Desa Petang (9). Siam tidak bergejala CVPD (10). Siam bergejala CVPD : Desa Katung (11), Desa Belancan (12), Desa Bayung Gede (13), Desa Awan (14), Desa Catur (15), Pengotan (16), Pelaga (17), Desa Petang (18).

Hal tersebut didukung oleh Wirawan, *dkk* (2003) yang menyatakan bahwa tidak semua daun-daun pada ranting yang menunjukkan gejala serangan CVPD positif mengandung bakteri *L. asiaticum*. Dapat terjadi daun bagian atas positif mengandung bakteri sedangkan daun bagian bawahnya negatif. Wirawan, *dkk* (2003) juga menyatakan bahwa penemuan ini menunjukkan bahwa tidak diperlukan adanya patogen pada bagian daun tanaman untuk memunculkan gejala penyakit atau dengan kata lain patogen yang berada pada daun tanaman lain dapat menyebabkan munculnya gejala pada daun disebelahnya atau diatas dan dibagian bawahnya.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Terdapat sembilan varietas jeruk di lokasi pertanaman jeruk namun varietas Siam merupakan jenis jeruk yang mendominasi.
2. Penyakit CVPD masih tersebar luas di delapan desa lokasi penelitian yakni desa Katung, Belancan, Bayung Gede, Awan, Catur, Pengotan, Petang dan Pelaga. Gejala serangan penyakit CVPD pada daun tanaman jeruk Selayar dan Siam di setiap lokasi menunjukkan gejala klorosis yang bervariasi.
3. Rata-rata persentase serangan adalah 54,38% dan rata-rata intensitas tanaman terserang penyakit CVPD adalah 9,86%.
4. Hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa sebelas dari delapan belas sampel daun tanaman terdapat pita DNA di ukuran 1.160 bp dan dapat dikatakan bereaksi positif dengan bakteri *L. asiaticum*.
5. Daun jeruk yang bergejala penyakit CVPD tidak selalu positif mengandung bakteri *L. asiaticum* seperti pada sampel daun jeruk Selayar desa Bayung Gede, Pelaga, Petang dan sampel daun jeruk Siam desa Katung serta Pelaga.

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, and Hans, Person. 1998. Plant Root and Their Environment Development in Agricultural and Manajed, Forest, Uppsala Sweden. 560p.
- Dwiatuti, M.E. 2000. Evaluation Ketahanan Varietas Jeruk Terhadap Penyakit CVPD Isolat Lumajang. J. Hort.
- 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. 26hal.
- Sandrine, J., J.M. Bove and M. Garnier. 1996. PCR Detection of Two Candidatus *Liberobacter* Species Assosiated with Greening Disease of *Citrus*. Molecular and Cellular Probes. 10:43-50.
- Sarwono, B. 1995. Jeruk dan Kerabatnya. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Taylor, G. R. 1993. Polymerase Chain Reaction. Basic Priciples and Automation. PCR A Practical Approach, editors: J.M. Mc. Pherson; Quirke ang G.R. Taylor. Oxford University Press.
- 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., Sulistyowati, L. dan Wijaya, I. N. 2003. Mekanisme Tingkat Molekul Infeksi Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk dan Peran *Diaphorina citri* Kuw. Sebagai Serangga Vektor. Denpasar. Lemlit. Universitas Udayana.