

**DETEKSI PATOGEN PENYEBAB PENYAKIT CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) PADA BEBERAPA JENIS TANAMAN JERUK (*Citrus spp.*) DENGAN PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

Oleh :  
SRI M JULYASIH<sup>1)</sup>

**Abstract**

**CVPD is an important disease and a major cause of citrus trees yield loose in many parts of Asia and Africa. CVPD is caused by gram negative bacteria, they can detected by using the Polymerase Chain Reaction (PCR) of 16S rDNA and electron microscopy.**

**The mechanism of interaction of causal pathogen CVPD with plant is poorly known, so that this reseatch aimed to detect the pathogen in various citrus plant by PCR.**

**The research resulted that the pathogen in various citrus plant is *L. asiaticum*, they can detected by PCR at 1160 bp.**

**Key word : CVPD, PCR**

**A. PENDAHULUAN**

CVPD merupakan penyakit terpenting dan penyebab utama kehilangan hasil perkebunan jeruk di hampir semua negara terutama Asia dan Afrika (Jagouix *et al.*, 1997). Gejala yang khas dari serangan penyakit CVPD adalah daun menjadi menguning dengan tulang-tulang daun berwarna hijau tua, daun menjadi lebih kaku dan lebih tebal dari daun sehat dan kecil-kecil (Mead, 1998 ; Knapp *et al.*, 1999). Sedangkan pada buah akibat infeksi patogen CVPD, buah menjadi kecil-kecil dan keras serta kulit buah menjadi cepat menguning (Wirawan *et al.*, 1998).

Penyebab penyakit CVPD adalah bakteri gram negatif yang diberi nama *Liberobacter* (Sandrine *et al.*, 1996). Patogen tidak dapat ditumbuhkan secara *in vitro*, tetapi dapat dideteksi dengan PCR pada 16S rDNA dan mikroskop elektron (Hoy, 1998). Deteksi penyakit CVPD secara visual tergolong sulit karena gejala khasnya adalah klorosis pada daun yang menyerupai gejala defisiensi mineral, sehingga memerlukan cara deteksi khusus.

Deteksi yang sensitif, cepat dan akurat saat ini adalah dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*), menggunakan sepasang primer spesifik *forward primer* O11 dan *reverse primer* O12c untuk mengamplifikasi 16S rDNA *L. asiaticum* yang berukuran sekitar 1160 bp (Jagoueix *et al.*, 1994).

Amplifikasi PCR memerlukan kualitas DNA *template* yang baik dan program yang sesuai (Taylor, 1993). Bakteri CVPD masih belum bisa dikultur, sehingga tidak memungkinkan untuk mengisolasi DNANYA saja, maka dilakukan pendekatan dengan isolasi DNA total tanaman yang diinginkan untuk dideteksi (Ohtsu *et al.*, 2002).

Penyebaran penyakit terjadi terutama oleh serangga vektor *Diaphorina citri* Kuwayama. Penyebaran penyakit juga dapat disebabkan oleh penyebaran bibit tanaman jeruk yang telah terinfeksi oleh patogen penyakit CVPD (tissue graft) (Capoor *et al.*, 1974 dalam Mead, 1998).

Pengetahuan tentang interaksi patogen penyebab penyakit CVPD dengan tanaman belum banyak diketahui. Dewasa ini belum ditemukan cara pengendalian penyakit

<sup>1)</sup> Staf Jurusan HPT - Fakultas Pertanian, UPN "Veteran" Jatim

CVPD secara baik karena berbagai kendala yang dihadapi seperti belum dapat dibiakkannya patogen penyebab penyakit CVPD pada media buatan dan kurangnya informasi mengenai mekanisme infeksi tanaman oleh patogen. Berbagai upaya pengendalian CVPD telah dilakukan diantaranya dengan penginfusan antibiotik oksitetrasiklin, pemotongan bagian tanaman bergejala, pemasangan perangkap kuning untuk serangga vektor, penyemprotan insektisida, eradikasi total diikuti dengan masa tanpa jeruk dan tanaman Rutaceae lainnya, pelarangan pengangkutan bibit antar pulau, dan pengadaan bibit bebas CVPD. Meski demikian, sampai saat ini CVPD masih menginfeksi secara sporadis di berbagai sentra jeruk. Untuk itu pendekatan pada aspek molekuler perlu dilakukan yakni dalam penelitian ini dilakukan deteksi terhadap patogen penyebab penyakit CVPD pada beberapa jenis tanaman jeruk.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi patogen penyebab penyakit CVPD pada beberapa jenis tanaman jeruk bergejala dan tidak bergejala CVPD.

#### **METODE PENELITIAN**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Udayana. Pengambilan sampel daun tanaman jeruk di desa Kintamani, kabupaten Bangli

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun tanaman jeruk jenis Keprok (*Citrus nobilis*), Siam (*C. microcarpa*) dan jeruk besar Bali (*C. maxima*) yang menunjukkan gejala penyakit CVPD dan sehat. Bahan untuk isolasi DNA yaitu 2% CTAB (w/v), 100 mM Tris HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 mM NaCl, 1% PVP, 1% Mercaptoethanol, Isopropanol, Kloroform, Isoamylalkohol, Etanol 70%, TE buffer pH 8,0. Bahan untuk elektroforesis DNA yaitu gel agarose 1%, TAE buffer. Bahan untuk isolasi protein meliputi 0,01 M Tris, 2,5% SDS, 5% Mercaptoethanol, 25% Sucrose,

Coomasie Brilliant Blue, Methanol, Acetic Acid, Acrylamide Mix, 1,5 M Tris pH 8,8, 10% SDS, Amonium Persulphate, Temed. Bahan untuk amplifikasi DNA dengan PCR yaitu dNTP mix, primer F, primer R, taq polymerase, DNA template, buffer dan dH<sub>2</sub>O.

Alat yang digunakan adalah mesin PCR, seperangkat alat Elektroforesis (BioRad), sentrifuge (Biofuge 13), UV transilluminator thermometer, tabung eppendorf, shaker, microwave, alat vortex, penangas air (water bath) dan erlenmeyer.

#### **Isolasi Total DNA Tanaman Jeruk**

Pada prinsipnya cara ini adalah menggunakan prosedur dari Rogers dan Bendich, 1991 (Wirawan, 1999).

Potongan tulang daun dari 2-3 helai daun tanaman jeruk dipotong kecil-kecil, lalu ditaruh di dalam mortar dan disimpan selama 30 menit dalam lemari pendingin -80° C. Potongan tulang daun tersebut kemudian dihancurkan sampai halus dan disuspensi dalam 0,5 ml buffer ekstraksi yang mengandung 2% CTAB (w/v), 100 mM Tris HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% PVP dan 1% Mercaptoethanol. Suspensi ini ditaruh dalam mikrotube (1,5 ml) dan diinkubasi pada suhu 65° C selama 10 menit. Kemudian disentrifuge pada 5000 rpm selama 5 menit dan supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke dalam mikrotube baru. Campuran kloroform : isoamylalkohol (24 : 1) ditambahkan ke dalam supernatan dengan volume yang sama kemudian divorteks dan disentrifuge pada 15000 rpm selama 5 menit.

Cairan pada lapisan atas diambil dan dipindahkan ke mikrotube baru dan ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama. Campuran ini diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit dan kemudian disentrifuge pada 15000 rpm selama 10 menit. Pellet DNA yang dihasilkan dicuci dengan etanol 70% dan kemudian dikeringkan. Pellet DNA ini kemudian

disuspensi dengan 200 µl–300 µl TE pH 8,0.

**Analisis PCR**

Analisis PCR untuk mendeteksi serangan penyakit CVPD dilakukan dengan menggunakan primer spesifik dari 16S rDNA untuk mendeteksi keberadaan patogen bakteri *Liberobacter asiaticum* pada tanaman yang menunjukkan gejala serangan penyakit. Isolasi DNA template dilakukan dari daun tanaman yang menunjukkan gejala serangan penyakit dengan cara seperti di atas. Sekuen primer yang digunakan adalah sekuen primer yang spesifik untuk patogen CVPD, yaitu O11 dan O12. Menggunakan primer ini ukuran DNA yang teramplifikasi adalah 1160 pasang basa. Sekuen primer yang digunakan adalah :

Primer F : 5'- GCG CGT ATG CAATAC  
GAG CGG CA – 3'

Primer R : 5'- GCC TCG CGA CTT  
CGC AAC CCA T- 3'

Program PCR yang digunakan adalah :

1. Pre-treatmen pada suhu 92°C selama 30 detik dengan satu siklus ulangan.
2. a. Denaturation pada suhu 92°C selama 60 detik.  
b. Annealing pada suhu 60°C selama 30 detik.

c. Elongation pada suhu 72°C selama 90 detik.

Tahap ini dengan 40 siklus ulangan.

3. Extention pada suhu 72°C selama 90 detik dengan satu siklus ulangan.

**Pemisahan Molekul DNA dengan Elektroforesis Gel Agarose**

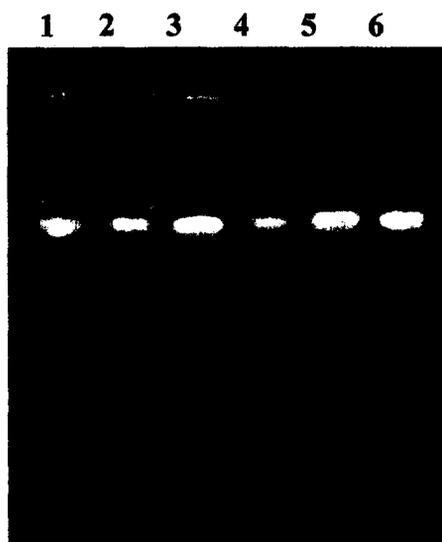
Gel agarose yang digunakan adalah 1 %. Buffer untuk elektroforesis digunakan TAE Buffer yang mengandung 40 mM Tris Acetate, pH 7,9 dan 2 mM Sodium EDTA. Elektroforesis dilaksanakan pada 100 V selama 30-45 menit (Sambrook *et al.*, 2001)

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

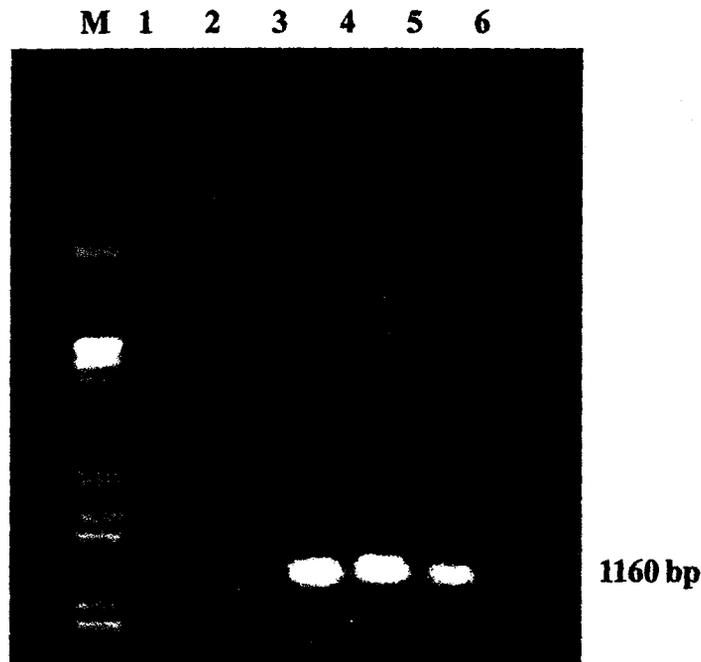
**1. Isolasi Total DNA Tanaman**

Isolasi total DNA tanaman dilakukan untuk mendapatkan pelet DNA yang akan dipergunakan dalam analisis PCR. Deteksi hasil isolasi total DNA tanaman jeruk keprok, siem dan jeruk besar yang menunjukkan gejala penyakit CVPD dan sehat terlihat adanya pita DNA pada elektroforesis gel agarose 1%(Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa DNA tanaman sudah terisolasi dengan baik.

Isolasi total DNA tanaman perlu dilakukan karena bakteri CVPD belum bisa



Gambar 1. Isolasi total DNA Tanaman Beberapa Jenis Jeruk Bergejala CVPD dan Sehat. Lajur : 1. Jeruk siem sehat, 2. Jeruk Keprok sehat, 3. Jeruk besar sehat, 4. Jeruk Siem bergejala CVPD, 5. Keprok bergejala CVPD, 6. Jeruk besar bergejala CVPD



Gambar 2. Deteksi patogen bakteri CVPD (*Liberobacter asiaticum*) pada Beberapa Jenis tanaman jeruk. Lajur : 1. DNA dari tanaman jeruk siem sehat, 2. jeruk keprok sehat, 3. jeruk besar terserang CVPD, 4. jeruk siem terserang CVPD, 5. jeruk keprok terserang CVPD, 6. jeruk besar sehat

dikultur dan untuk memperoleh kualitas DNA template yang baik. Menurut Taylor (1993), dalam amplifikasi dengan PCR diperlukan kualitas DNA template yang baik dan program yang sesuai. Sedangkan Ohtsu *et al.* (2002), oleh karena bakteri CVPD masih belum bisa dikultur sehingga tidak memungkinkan untuk mengisolasi DNA nya saja, maka dilakukan pendekatan dengan isolasi DNA total tanaman yang diinginkan untuk dideteksi.

## 2. Deteksi Bakteri *Liberobacter* dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Analisis PCR terhadap jeruk siem, keprok dan jeruk besar yang sehat dan bergejala CVPD dengan menggunakan primer spesifik untuk CVPD diperoleh hasil bahwa tanaman yang terserang CVPD pada hasil elektroforesis gel agarose 1% terdapat adanya pita DNA pada 1160 bp, sedangkan pada tanaman yang sehat tidak terlihat pita DNA (Gambar 2).

Hal ini menunjukkan bahwa pada tanaman yang terserang CVPD mengandung bakteri *Liberobacter asiaticum*, karena keberadaan bakteri ini terdeteksi dengan primer 16S rDNA yang merupakan conserved sequence (sekuen yang harus ada). Sedangkan pada tanaman yang sehat tidak ditemukan adanya bakteri *Liberobacter*. Menurut Jagoueix *et al.* (1994), deteksi yang sensitif, cepat dan akurat saat ini adalah dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan sepasang primer spesifik forward primer O11 dan reverse primer O12c untuk mengamplifikasi 16S rDNA *Liberobacter asiaticum* yang berukuran sekitar 1160 bp.

## KESIMPULAN

Patogen penyebab penyakit CVPD pada jeruk siem, keprok dan jeruk besar adalah *L. asiaticum* yang terdeteksi pada 1160 bp

## DAFTAR PUSTAKA

- Hoy, A. Marjorie. 1998. Citrus Psylla. Entomology and Nematology Department University of Florida, p.5. <http://extlab7.entnem.ufl.edu/PestAlert.html>
- Jagoueix, S; J.M Bove and M Garnier. 1997. Comparison of The 16S/23S Ribosomal Intergenic Region of Candidatus *Liberobacter asiaticum* and Candidatus *Liberobacter africanum*, The Two Species Associated with Citrus Huanglongbing (greening) Disease. Int. J of Syst. Bacteriology. Jan. p 224-227.
- Knapp, L. Joseph; S Halbert; R Lee; M Hoy; R Clark and M Kesinger. 1999. The Asian Citrus Psyllia and Citrus Greening Disease. Integrated Pest Management Florida.
- Mead, F.W. 1998. Asiatic Citrus Psyllid *Diaphorina Citri* Kuwayama. University of Florida, Cooperative Extension Service. Institut of Food and Agricultural Services. <http://creaturesifas.ufl.edu>
- Ohtsu, Y; M. Prommintara; S. Okuda; T. Goto; T. Kano; K. Nakashima, M. Koizumi; J. Imada; and K. Kawashima. 2002. Partial Purification of Thai Isolate of Citrus Huanglongbing (greening) Bacterium and Antiserum Production for Serological Diagnosis. J. Plant Phatol. 68: 372-377.
- Sambrook, J., E.F. Miniatis., T. Miniatis. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manu. 3 nd Ed. Cold Spring Harbour New York. Cold Spring Harbour Press.
- Sandrine, J., J.M Bove and Garnier. 1994. The Phloem Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus is a Member of the a Subdivision of the Proteobacteria. Journal of Systematic Bacteriology, 44:370-386.p.
- Sandrine, J., J.M Bove and Garnier. 1996. PCR Detection of The Two Candidatus *Liberobacter* Species Associated with Greening Disease of Citrus, Molecular and Cellular probes, 10:43-50.
- 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. Oxford University Press.
- Wirawan, I.G.P., N. Arya; S. Subandiyah. 1998. Isolasi Loci Resisten Terhadap CVPD dengan Metode Transformasi Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Laporan Riset Unggulan Terpadu V. Kantor Menteri Negara Riset Teknologi. Dewan Riset Nasional. Jakarta.
- Wirawan, I.G.P. 1999. Metode Penelitian Bioteknologi. Beberapa Teknik dan Protokol. PS Pasca Sarjana (S2) Bioteknologi Pertanian. Universitas Udayana. 22 hal.