

Deteksi Bakteri Penyebab CVPD pada Jeruk Menggunakan DNA Asal Tulang Daun

Detection of Bacteria Causing CVPD on Citrus Using DNA Extracted from Leaf Midrib

Ummu Salamah Rustiani^{1*}, Ariningsih Salji Endah²,
Nurjanah², Andi Prasetiawan², Nurmaida²

¹Balai Uji Terap Teknik dan Metode Karantina Pertanian, Bekasi 17520

²Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian, Jakarta 13220

ABSTRAK

Uji terhadap bakteri *Candidatus liberibacter asiaticus*, penyebab *citrus vein phloem degeneration* (CVPD), secara PCR telah rutin dilakukan dari tulang daun jeruk, namun metode deteksi ini hingga kini belum divalidasi. Oleh karena itu, dilakukan penelitian yang bertujuan memvalidasi metode identifikasi terhadap bakteri penyebab penyakit CVPD sebagai konfirmasi bahwa metode yang digunakan telah sesuai dengan tujuan penggunaannya. Contoh tanaman uji bergejala klorosis daun diambil dari Bogor dan Bekasi. Contoh uji dipisahkan terlebih dulu antara lamina daun dan tulang daun. Validasi metode meliputi beberapa tahap, yaitu homogenitas contoh uji, ketersalinan (reprodusibilitas), dan keterulangan (repetabilitas) metode uji. Hasil uji validasi dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya sebagai metode standar. Hasil validasi menunjukkan bahwa tulang daun jeruk lebih baik digunakan untuk deteksi dan identifikasi bakteri penyebab penyakit CVPD dibandingkan dengan bagian lamina daun. Metode ini direkomendasikan sebagai metode rutin untuk deteksi bakteri CVPD.

Kata kunci: *Candidatus liberibacter asiaticus*, karantina, metode deteksi CPVD

ABSTRACT

A method for identification of the causal bacteria of citrus vein phloem degeneration (CVPD) based on polymerase chain reaction (PCR) technique using template DNA extracted from leaf midrib of citrus has been implemented routinely. The method has not been validated, therefore it is necessary to validate the method to confirm that the method fit for its intended use. Leaf samples showing chlorotic symptom was obtained from Bogor and Bekasi, West Java and used for test samples. These samples was differentiated into 2 groups, i.e. leaf midrib and leaf mesophyll. Validation test involved homogeneity, and reproducibility test; each test was replicated 2 times. The test showed that using leaf midrib gave better result for detection of bacteria causing CVPD disease than using leaf mesophyll. Therefore, this method is recommended as routine detection method for bacteria causing CVPD disease.

Key words: *Candidatus liberibacter asiaticus*, karantina, metode deteksi CPVD

*Alamat penulis korespondensi: Balai Uji Terap Teknik dan Metode Karantina Pertanian, Jalan Raya Setu Km. 06, Cikarang Barat, Bekasi 17520
Tel: 021-82618923, Faks: 021-82618923, Surel: ummurustiani@gmail.com

PENDAHULUAN

Citrus vein phloem degeneration (CVPD) merupakan salah satu penyebab penurunan produksi jeruk di beberapa negara. Kehilangan hasil akibat penyakit ini bervariasi bergantung lokasi dan kultivar yang ditanam, dilaporkan mencapai 100% di Afrika Selatan, Cina, dan Thailand. Sekitar 3 juta pohon jeruk di Indonesia mengalami kerusakan berat selama tahun 1960–1970 (Gottwald 2007). Penyakit CVPD atau dikenal juga dengan nama *citrus greening* atau *huanglongbing*, pada awalnya diduga disebabkan oleh virus atau *mycoplasma-like organism* (MLO). Pada tahun 1984 penyebabnya telah dikonfirmasi sebagai bakteri yang tidak bisa dibiakkan pada medium buatan, yaitu *Candidatus liberibacter asiaticus* di Asia dan *C. liberibacter africanus* di Afrika (Bovè 2006).

Deteksi dan identifikasi bakteri penyebab CVPD menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) berkembang sejak awal tahun 1990-an. Jagoueix *et al.* (1996) pertama kali mengembangkan primer spesifik OI1/OI2c, selanjutnya primer spesifik tersebut telah banyak digunakan untuk mendeteksi bakteri penyebab CVPD termasuk di Indonesia. Taufik *et al.* (2010) dan Meitayani *et al.* (2014) menggunakan primer tersebut untuk mendeteksi sampel jeruk dari Sulawesi Tenggara dan Bali. Status distribusi CVPD di Indonesia perlu diawasi dengan ketat karena bakteri penyebab CVPD termasuk salah satu organisme pengganggu tanaman karantina (OPTK) golongan A2 yang penyebarannya masih terbatas di Jawa, Sumatra, dan Kalimantan (BKP 2009). Diperlukan teknik deteksi yang akurat dan cepat untuk mencegah penyebaran penyakit ini ke daerah pertanaman jeruk yang masih bebas CVPD.

Teknik PCR untuk identifikasi bakteri penyebab CVPD sudah digunakan sebagai metode rutin di laboratorium karantina tumbuhan. Penelitian dilakukan untuk memvalidasi metode deteksi *C. liberibacter asiaticus* pada tanaman jeruk sehingga metode tersebut dapat diadopsi oleh semua unit laboratorium karantina tumbuhan di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Contoh Daun

Daun tanaman dengan gejala spesifik CVPD, yaitu klorosis, diambil dari beberapa lokasi pertanaman jeruk di Bogor dan Bekasi. Daun tersebut disimpan dalam botol yang telah diisi gel silika yang di atasnya dilapisi kertas tisu. Contoh daun dibawa ke laboratorium, masing-masing contoh daun dipisahkan antara tulang daun (T) dan lamina daun (L), kemudian disimpan di dalam botol terpisah. Contoh daun tersebut disimpan pada suhu 4 °C sampai siap digunakan pada tahapan selanjutnya.

Ekstraksi DNA Total

Ekstraksi DNA total dari tulang daun dan lamina daun jeruk diproses mengikuti metode ekstraksi *Dneasy Plant Mini Kit* (Qiagen). Ekstraksi DNA total untuk masing-masing contoh dari lokasi yang berbeda diulang 3 kali. Setelah diperoleh DNA total hasil ekstraksi, masing-masing DNA contoh uji dibagi menjadi 3 bagian untuk 3 keperluan, yaitu untuk uji pendahuluan (P), uji validasi (V), dan arsip contoh (A). Enam jenis contoh ekstrak DNA ialah lamina daun untuk uji pendahuluan (LP), lamina daun untuk uji validasi (LV), lamina daun untuk arsip contoh (LA), tulang daun untuk uji pendahuluan (TP), tulang daun untuk uji validasi (TV), dan tulang daun untuk arsip contoh (TA). Ekstrak DNA arsip contoh disimpan pada suhu 4 °C sampai siap untuk digunakan.

Kualitas ekstrak DNA diukur menggunakan spektrofotometer (NanoDrop 2000 Thermo Scientific) pada panjang gelombang 260/280. Nilai densitas optik pada kisaran 1.7–2.0 dikategorikan sebagai DNA dengan kemurnian tinggi (Sambrook dan Russle 1989). Ekstrak DNA uji pendahuluan dan validasi disimpan pada suhu -20 °C sampai siap untuk tahap amplifikasi.

Amplifikasi DNA Bakteri dengan PCR

Tahap amplifikasi DNA dilakukan sebagai uji pendahuluan, yaitu menggunakan semua contoh berlabel LP dan TP. Contoh uji dengan hasil positif pada uji pendahuluan selanjutnya digunakan untuk tahap validasi, yaitu uji

ketersalinan dan keterulangan. Contoh uji untuk tahap validasi menggunakan contoh berlabel LV dan TV.

Proses amplifikasi dilakukan menggunakan sepasang primer spesifik untuk deteksi *C. liberibacter asiaticus*, yaitu primer OI1 (5'-GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG C-3') dan OI2c (5'-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3') dengan target produk berukuran 1160 pb (Gopal *et al.* 2007). Reaksi amplifikasi menggunakan *ready-to go-PCR bead* (GE Healthcare) dengan siklus amplifikasi, yaitu denaturasi awal pada suhu 92 °C selama 30 detik, dilanjutkan 40 siklus dengan tahapan denaturasi pada suhu 92 °C selama 60 detik, tahapan aneling pada suhu 60 °C selama 30 detik, dan sintesis pada suhu 72 °C selama 90 detik. Siklus terakhir merupakan tahap penyempurnaan sintesis DNA pada suhu 72 °C selama 90 detik. Sebagai kontrol positif digunakan DNA asal tanaman jeruk dari Jawa Timur koleksi BBUSKP, sedangkan sebagai kontrol negatif digunakan air bebas nuklease sebagai DNA templet. Visualisasi fragmen DNA hasil amplifikasi dilakukan melalui elektroforesis pada gel agarosa 1.5% dengan bufer TAE yang mengandung 40 mM natrium EDTA. Elektroforesis menggunakan *Biorad powerpack 300*, dilaksanakan pada 75 volt selama 45 menit.

Uji Ketersalinan (*Reproducibility*) dan Keterulangan (*Repeatibility*)

Pengujian ketersalinan dilakukan untuk tahap amplifikasi dengan 5 kali ulangan, yaitu masing-masing dilakukan oleh 5 orang analis laboratorium pada waktu yang sama. Pengujian keterulangan juga dilakukan untuk tahap amplifikasi dengan 5 kali ulangan, yaitu masing-masing dilakukan oleh 5 orang analis laboratorium pada waktu yang berbeda. Pengulangan dilakukan 2 kali untuk masing-masing analis pada setiap tahap ketersalinan dan keterulangan.

HASIL

Gejala Penyakit

Gejala CVPD di lapangan berupa daun klorosis (Gambar 1), terjadi hampir lebih dari



Gambar 1 Gejala CVPD berupa klorosis pada daun di salah satu lokasi di Bogor.

separuh bagian tanaman jeruk yang diamati. Walaupun contoh daun dari semua lokasi di Bogor dan Bekasi menunjukkan gejala klorosis, namun tidak semua contoh daun tersebut menunjukkan hasil deteksi yang positif (Tabel 1). Contoh daun LP dan TP dari Dramaga, Bogor menunjukkan hasil deteksi yang negatif sehingga contoh daun tersebut tidak digunakan lebih lanjut pada tahap uji validasi.

Konsentrasi DNA pada Uji Validasi

Pengukuran kualitas DNA total hasil ekstraksi masing-masing contoh uji menunjukkan tingkat kemurnian yang bervariasi. Contoh daun asal Bekasi dan 4 contoh asal Bogor dari lamina daun mempunyai nilai kurang dari 1.7 sehingga tidak digunakan untuk tahap amplifikasi. Konsentrasi DNA contoh daun dengan kemurnian yang tinggi berkisar antara 14.5 ng μL^{-1} dan 52.8 ng μL^{-1} . Konsentrasi DNA contoh asal tulang daun mempunyai nilai lebih tinggi dibandingkan dengan lamina daun, kecuali untuk contoh asal Cibeureum Bogor (Tabel 2).

Pita DNA berukuran 1160 pb berhasil diamplifikasi dari contoh DNA asal tulang daun jeruk dari lokasi Bekasi, Situgede1, Situgede2, dan Cibeureum1 (Gambar 2). Hasil uji ketersalinan yang dilakukan 5 analis menunjukkan bahwa ekstrak DNA asal tulang daun lebih konsisten menunjukkan hasil positif dibandingkan dengan asal lamina

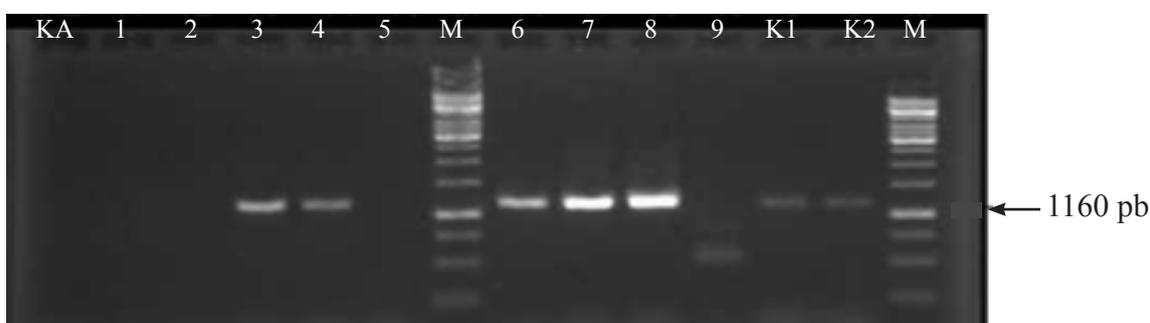
Tabel 1 Hasil uji pendahuluan contoh daun jeruk bergejala CPVD dari Bekasi dan Bogor dengan metode *polymerase chain reaction*

Asal contoh daun	Hasil uji pada 2 jenis contoh daun	
	Lamina daun	Tulang daun
Bekasi	negatif	positif
Bogor, Dramaga	negatif	negatif
Bogor, Situgede 1	negatif	positif
Bogor, Situgede 2	negatif	positif
Bogor, Gunung Bunder	positif	positif
Bogor, Cibeureum 1	negatif	positif
Bogor, Cibeureum 2	positif	positif

Tabel 2 Konsentrasi dan kemurnian DNA total hasil ekstraksi dari contoh daun jeruk bergejala CVPD untuk persiapan uji validasi

Asal contoh	Konsentrasi DNA (ng μL^{-1})		Kemurnian DNA ($\lambda_{260}/\lambda_{280}$)	
	Lamina daun	Tulang daun	Lamina daun	Tulang daun
Bekasi	3.8	40.2	1.6	1.7
Bogor, Situgede 1	14.5	15.9	1.8	1.8
Bogor, Situgede 2	25.7	29.4	1.8	1.8
Bogor, Gunung Bunder	32.2	42.3	1.8	1.8
Bogor, Cibeureum 1	24.5	32.0	1.5	1.8
Bogor, Cibeureum 2	52.8	46.6	1.8	1.8

Pengukuran dilakukan menggunakan *NanoDrop* 2000 (Thermo Scientific) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm

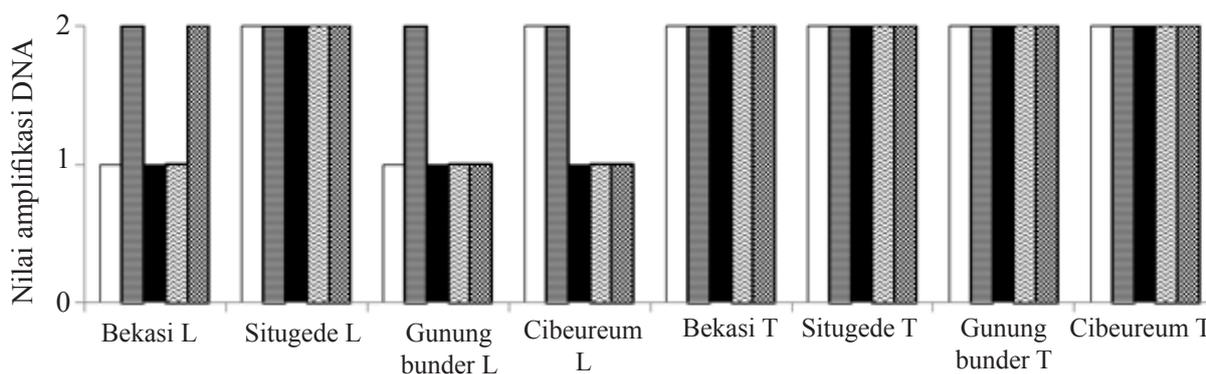


Gambar 2 Visualisasi DNA *Candidatus liberibacter asiaticus* pada beberapa contoh daun jeruk bergejala klorosis pada uji ketersalinan dan keterulangan yang dilakukan oleh analis ke-1. KA, kontrol negatif; 1, Bekasi LV; 2, Situgede1 LV; 3, Bekasi TV; 4, Situgede1 TV; 5, Situgede2 LV; 6, Gunung Bunder TV; 7, Cibeureum1 TV; 8, Cibeureum2 TV; 9, Cibeureum1 LV; K1, kontrol positif 1; K2, kontrol positif 2; M, Penanda 1 Kpb (Fermentas).

daun. Demikian pula pada uji keterulangan menunjukkan bahwa DNA asal tulang daun lebih efektif digunakan untuk deteksi *C. liberibacter asiaticus* dibandingkan dengan DNA asal lamina daun. Hasil visualisasi DNA contoh tulang daun dari 5 lokasi menunjukkan tidak berbeda dengan pita DNA yang ditunjukkan oleh kontrol positif (Gambar 3).

PEMBAHASAN

Gejala klorosis yang disebabkan oleh penyakit CVPD tidak bersifat spesifik, karena gejala yang serupa juga dapat disebabkan oleh infeksi patogen lain, yaitu *Spiroplasma citri*, *Citrus tristeza virus*, dan *Phytophthora* sp., atau disebabkan oleh defisiensi atau



Gambar 3 Konsistensi uji ketersalinan semua analis terhadap contoh homogen daun jeruk dari tulang daun. Nilai 1 menunjukkan hasil amplifikasi DNA negatif; Nilai 2 menunjukkan hasil amplifikasi DNA positif. □, analisis ke-1; ▨, analisis ke-2; ■, analisis ke-3, ▩, analisis ke-4; ▤, analisis ke-5.

keracunan unsur hara Fe dan Zn (Bovè 2006). Gejala klorosis yang disebabkan oleh infeksi *C. liberibacter asiaticus* menunjukkan adanya gangguan fisiologi pada tanaman. Gangguan fisiologi terjadi karena massa bakteri menyebabkan penghambatan transportasi nutrisi dari dan ke jaringan floem. Susanti *et al.* (2014) mengemukakan bahwa jaringan floem pada daun dan petiol akan mengalami abnormalitas sel akibat infeksi CVPD. Jaringan floem terinfeksi CVPD tertutupi oleh massa bakteri dan akan menyebabkan degenerasi sel-sel floem sehingga terjadi hambatan nutrisi dari daun ke seluruh jaringan tanaman lainnya. Selain massa bakteri, aktivitas floem juga mengalami gangguan oleh kalosa dan protein yang terbentuk sebagai respons adanya abnormalitas sel jaringan. Tanaka *et al.* (2006) mengonfirmasi melalui pengamatan menggunakan mikroskop elektron bahwa bakteri penyebab *citrus greening* ditemukan pada jaringan pembuluh floem daun bergejala, namun tidak dijumpai pada daun yang tidak bergejala. Pengumpulan massa bakteri di jaringan floem menyebabkan konsentrasi DNA asal tulang daun di sebagian besar lokasi pengambilan contoh lebih tinggi dibandingkan dengan lamina daun. Bakteri *C. liberibacter asiaticus* yang terakumulasi di dalam floem akan ditranslokasikan ke bagian tanaman. Pergerakan bakteri ke bagian lain berlangsung lambat sehingga gejala baru terlihat 4–6 bulan setelah tanaman terinfeksi. Akibatnya bibit

jeruk yang terinfeksi sering kali tidak dapat dikenali. Oleh karena itu, metode deteksi yang akurat dan sensitif diperlukan untuk memastikan bibit jeruk bebas penyakit.

Deteksi dengan metode PCR menggunakan primer untuk target gen 16S rRNA telah digunakan untuk mengidentifikasi *C. liberibacter asiaticus* yang tersebar di kawasan Asia termasuk Indonesia. Metode yang sama juga digunakan untuk diagnosis penyakit CVPD di Afrika Selatan, dan berhasil mengidentifikasi *C. liberibacter africanus* (Garnier *et al.* 2000; Razi *et al.* 2014). Hasil uji validasi yang dilakukan menunjukkan bahwa metode ekstraksi DNA dari ibu tulang daun jeruk merupakan metode yang paling efektif. Lebih lanjut, hasil uji ketersalinan dan keterulangan menunjukkan bahwa templat DNA yang berasal dari ekstraksi tulang daun mempunyai tingkat konsistensi yang memadai. Das (2004) dan Gopal *et al.* (2007) meng-ekstraksi DNA dari ibu tulang daun dan batang tanaman jeruk asal India dan mengamplifikasi DNA *C. liberibacter africanus* dengan primer OI1/OI2c. Amplifikasi mendapatkan hasil yang sama, yaitu target DNA berukuran 1160 pb. Hasil validasi metode deteksi bakteri secara PCR menggunakan tulang daun telah memadai sebagai uji rutin pada laboratorium penyakit tanaman.

Penyebaran penyakit CVPD dapat terjadi melalui penanaman bibit terinfeksi sehingga diperlukan penguatan sistem karantina

domestik dalam mencegah penyebaran penyakit CVPD dari daerah endemik ke daerah bebas. Salah satu penguatan sistem tersebut ialah melalui pengujian di laboratorium penyakit tanaman lingkup Badan Karantina Pertanian di Indonesia guna menjamin bibit bebas CVPD di tempat-tempat pengeluaran.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada BBUSKP yang telah memberi dana kegiatan validasi metode ini pada tahun anggaran 2010.

DAFTAR PUSTAKA

- [BKP] Badan Karantina Pertanian. 2009. *Himpunan Peraturan Karantina Tumbuhan*. Jakarta (ID): BKP.
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J Plant Pathol.* 88(1):7–37.
- Das AK. 2004. Rapid detection of *Candidatus liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus huanglongbing (greening) using PCR. *Cur Sci.* 87(9):122–134.
- Garnier M, Bové JM, Jagoueix-Eveillard S, Cronje PR, Sanders GM, Korsten L, Roux HFL. 2000. Presence of “*Candidatus liberibacter africanus*” in the western cape province of South Africa. Di dalam: Graça JV, Lee RF, Yokomi RK, editor. *Proceedings of the Fourteenth Conference of the International Organization of Citrus Virologists*; 1998 Sep 13–18; Campinas-São Paulo State (BR): International Organization of Citrus Virologists. hlm 369–372.
- Gopal K, Gopi V, Palanivel S, Sreenivasulu Y. 2007. Molecular detection of greening disease in citrus by PCR: tissue source and time of detection molecular diagnosis laboratory, AICRP on tropical fruits (citrus) Citrus Research Station (ANGRAU), Tirupati, India. *Cur Sci.* 87(9):1183–1185.
- Gottwald TR, da Graça JV, Bassanezi RB. 2007. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-2007-0906-01-RV>.
- Jagoueix S, Bové JM, Garnier M. 1996. PCR detection of two ‘candidatus’ liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Mol Cell Probes.* (10):43–50. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/mcpr.1996.0006>.
- Meitayani NPS, Adiartayasa W, Wijaya IN. 2014. Deteksi penyakit *citrus vein phloem degeneration* (CVPD) dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) pada tanaman jeruk di Bali. *J Agroeko Trop.* 3(2):70–79.
- Razi MF, Manjunath L, Keremane, Ramadugu C, Roose M, Khan IA, Lee RF. 2014. Detection of citrus, huanglongbing-associated *Candidatus liberibacter asiaticus* in citrus and *Diaphorina citri* in Pakistan, seasonal variability, and implications for disease management. *Phytopathol.* 104(3):257–268. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-08-13-0224-R>.
- Sambrook J, Russle DW. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed Ke-2. New York (US): Cold-Spring Harbor Laboratory Pr.
- Saptowo JP. 2009. *Materi Inhouse Training: Validasi Metode Uji PCR Di Laboratorium Terakreditasi ISO/EIC 17025*. Jakarta (ID): BBUSKP.
- Susanti H, Mukarlina, Linda R. 2014. Anatomi daun dan ranting *Citrus nobilis* L. var. *microcarpa* yang terserang *citrus vein phloem degeneration*. *Protobiont.* 3(3):51–55.
- Tanaka FAO, Kitajima EW, Jesus JWC, Ayres AJ, Nelson GF, Bové J. 2006. First report of the electron micrograph of “*Candidatus Liberibacter*” particles on citrus in Brazil. *Fitopatol Bras.* 31(1):99. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000100018>.
- Taufik M, Khaeruni A, Pakki T, Giyanto. 2010. Deteksi keberadaan *citrus vein phloem degeneration* (CVPD) dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) di Sulawesi Tenggara. *J HPT Trop.* 10(1):73–79.