

Karakterisasi Patogen CVPD pada Tanaman Jeruk dan Vektor CVPD Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction*

Asaad, M.

Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sulawesi Selatan Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 17,5 Makassar, 90243
Naskah diterima tanggal 15 Desember 2004 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 25 April 2006

ABSTRAK. Penyakit CVPD yang disebabkan oleh bakteri *Liberobacter asiaticum* merupakan penyakit yang paling merusak pada tanaman jeruk di banyak negara penghasil jeruk di Asia dan Afrika. Fragmen 16S rDNA patogen CVPD dideteksi pada daun-daun jeruk yang terinfeksi CVPD dengan berbagai tipe gejala menggunakan teknik PCR. Penelitian bertujuan mendeteksi keberadaan patogen CVPD pada tanaman jeruk dan vektor di Malaysia dan Indonesia menggunakan teknik PCR. Penelitian dilakukan di laboratorium Penyakit Tanaman dan Biologi Molekular, Universitas Putra Malaysia dari bulan Januari - September 2001. Sampel daun dari pohon jeruk terinfeksi CVPD dikumpulkan dari beberapa sentra jeruk yaitu Bertam Valley, Serdang, dan Marang (Malaysia), serta Jeneponto, Sidrap, dan Selayar (Sulawesi Selatan, Indonesia). Hasil penelitian menunjukkan bahwa 4 tipe gejala khas penyakit CVPD yang ditemukan adalah belang-belang (tipe I), klorosis sedang dengan tulang daun hijau (tipe II), klorosis keras dengan tulang daun hijau (tipe III), dan klorosis dengan tulang daun menguning (tipe IV). Tipe gejala II dan III paling banyak ditemukan pada pohon jeruk terinfeksi, kemudian diikuti tipe I. Fragmen 16S rDNA patogen CVPD pada ukuran yang diharapkan, yaitu 1160 pb, dideteksi pada setiap tipe gejala yang dikumpulkan dari semua daerah sentra. Fragmen ini juga dideteksi pada vektor CVPD (*Diaphorina citri*) yang dikumpulkan dari pohon jeruk yang terinfeksi CVPD. Analisis enzim restriksi DNA yang teramplifikasi menunjukkan bahwa patogen CVPD di Malaysia dan Indonesia adalah spesies *L. asiaticum*

Katakunci: *Citrus* spp.; Patogen CVPD; Vektor; PCR

ABSTRACT. Asaad, M. 2006. **Detection of greening organisms in citrus plants and vector by polymerase chain reaction technique.** Greening disease caused by greening organism (GO: *L. asiaticum*) is one of the most destructive disease of citrus in many parts of Asia and Africa. The 16S rDNA fragments of the GO were detected by PCR technique in leaves of infected mandarin trees showing one of the various typical symptoms. The objective of the experiment was to detect the presence of GO on citrus plants and vectors in Malaysia and Indonesia by PCR. The experiment was conducted in Phytopathology and Molecular Biology Laboratory, University of Putra Malaysia from January to September 2001. Leaves were collected from GO-infected mandarin trees at Bertam Valley, Serdang, Marang (Malaysia), and Jeneponto, Sidrap, and Selayar (South Sulawesi, Indonesia). Results of experiment indicated that 4 kinds of symptoms, namely mottling (type I), mild chlorosis with green vein (type II), severe chlorosis with green vein (type III), and vein yellowing (type IV) on leaves were observed in GO-infected mandarin trees. Symptoms of types II and III were the most common found in mandarin trees, followed by type I. The 16S rDNA fragments of the GO in expected size of 1160 bp were detected in each of the typical symptoms (type I, II, III) collected from each citrus area. These fragments were also detected in an insect vector (*D. citri*) collected from GO-infected mandarin trees. Restriction enzyme analysis of amplified DNA revealed that GO in Malaysia and Indonesia was *L. asiaticum*.

Keywords: *Citrus* spp.; Greening organisms; Vector; PCR

Jeruk (*Citrus* spp.) merupakan salah satu komoditas penting dunia, baik sebagai buah segar maupun dalam bentuk olahan. Salah satu jenis penyakit yang paling merusak pada tanaman jeruk di banyak negara penghasil jeruk di Asia dan Afrika adalah penyakit *greening* atau CVPD (da Graca 1991). Di Indonesia, CVPD menyebabkan kehancuran beberapa sentra produksi jeruk antara lain

Garut (Jawa Barat), Tawangmangu (Jawa Tengah), Puntan (Jawa Timur), dan Tejakula (Bali) (Ekowarso 1994).

Sebelum diidentifikasi sebagai suatu penyakit, CVPD dikenal dengan beberapa nama yaitu *huanglungbin* di Cina, *likubin* di Taiwan, *dieback* di India, *leaf mottle* di Filipina, dan *yellow branch* di Afrika Selatan (da Graca 1991).

Penyakit CVPD disebabkan oleh bakteri yang berada pada jaringan phloem dan tidak dapat dibiakkan dalam media buatan, dengan nama *L. asiaticum* di Asia dan *L. africanum* di Afrika (Jagoueix *et al.* 1994). Bakteri tersebut dikenal sebagai *greening organisms* (GO) dan ditularkan oleh 2 serangga vektor (kutu loncat) yaitu *D. citri* dan *Trioza erytrae* (Nakashima *et al.* 1996).

Dalam upaya pengendalian penyakit CVPD,

pengembangan metode deteksi yang tepat merupakan tahap penting yang pertama. Deteksi penyakit CVPD dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti pengamatan gejala di lapangan, pengamatan patogen dengan mikroskop elektron, penularan melalui penyambungan dan vektor (Roistacher 1991). Metode deteksi tersebut, khususnya dengan mikroskop elektron dan cara penularan, membutuhkan keterampilan dan fasilitas khusus, serta membutuhkan waktu yang cukup lama dan mahal.

Perkembangan dalam metode deteksi patogen CVPD diperoleh melalui uji serologi, setelah didapatkan antibodi monoklonal dari strain India dan Cina (Garnier *et al.* 1992). Akan tetapi, antibodi tersebut tidak bereaksi positif terhadap beberapa strain/isolat lainnya, karena sangat spesifik strain. Oleh karena itu, metode deteksi patogen CVPD yang cepat, akurat, dan efisien sangat diperlukan dalam upaya pengendalian dan karakterisasi patogen.

Untuk mendeteksi patogen CVPD secara efektif dan tepat, telah dikembangkan teknik hibridisasi menggunakan DNA *probe* yang spesifik patogen CVPD (Villechanoux *et al.* 1992), namun teknik ini membutuhkan sekurang-kurangnya 2 hari untuk mendeteksi patogen CVPD (Hung *et al.* 1999). Oleh karena itu telah dikembangkan suatu teknik yang lebih peka dan cepat yaitu teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer spesifik patogen CVPD (Nakashima *et al.* 1996; Jagoueix *et al.* 1996; Hung *et al.* 1999). PCR merupakan suatu teknik *in vitro*, di mana sekuen/urutan DNA diamplifikasi secara cepat dengan kekhususan dan ketelitian yang sangat tinggi, menggunakan primer oligonukleotida dan enzim *Tag DNA polymerase* dalam suatu reaksi sederhana yang otomatis (Hadidi *et al.* 1995). Teknik PCR diharapkan dapat mempercepat deteksi patogen CVPD di beberapa sentra produksi jeruk di Indonesia yang diduga terinfeksi CVPD.

Tujuan dari penelitian ini adalah mendeteksi keberadaan patogen atau penyakit CVPD pada tanaman jeruk dan vektor di Malaysia dan Indonesia menggunakan teknik PCR.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian dan Laboratorium Biologi Molekular, Fakultas Bioteknologi, Universitas Putra Malaysia dari bulan Januari sampai September 2001.

Pengumpulan sampel

Daun-daun yang memperlihatkan tipe gejala seperti belang-belang (*mottling/blotching*), klorosis sedang dengan tulang daun tetap hijau, dan klorosis dengan tulang daun menguning dikumpulkan dari tanaman jeruk keprok/siam (*Citrus reticulata* Blanco) yang berumur 2-6 tahun yang diduga terinfeksi CVPD. Sampel dikumpulkan dari sentra jeruk di Malaysia (Bertam Valley, Serdang, dan Marang) dan Sulawesi Selatan, Indonesia (Kabupaten Sidrap, Jeneponto, dan Selayar). Sampel yang terkumpul disimpan dalam kantong plastik bening dan diberi nomor dan nama daerah. Sementara vektor CVPD dikumpulkan dari tanaman jeruk yang terinfeksi CVPD menggunakan aspirator.

Ekstraksi DNA

DNA sampel tanaman diekstrak menggunakan metode *Cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) (Nakashima *et al.* 1996, 1998). Prosedur metode CTAB sebagai berikut: Potongan-potongan tulang daun utama dan tangkai daun (petiole) ± 25 mg dimasukkan ke dalam 500 ml larutan CTAB {2% (w/v) *cetyl trimethyl ammonium bromide*, 100 mM Tris HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 1% (w/v) *polyvinylpyrrolidone-40*, 1% *b-mercaptoethanol*}, kemudian dihomogenkan, dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 5 menit. Larutan dicampur dengan *chloroform-isoamyl alcohol* (24:1) dengan volume yang sama. Kemudian disentrifus pada kecepatan 15.000 x g selama 5 menit. Supernatan (cairan bening bagian atas) dituang ke dalam tabung plastik ependorf yang mengandung volume 0,7 *ice-cold isopropanol*. DNA diendapkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 15.000 x g selama 5 menit, kemudian padatan DNA (pellet) dicuci dengan etanol 70% yang dingin dan selanjutnya dikeringanginkan selama 15 menit. Pada tahap akhir, DNA disuspensikan kembali dengan 50 ml air steril.

DNA vektor CVPD dipersiapkan dengan prosedur ekstraksi seperti ekstraksi jaringan

tanaman. Padatan DNA (pellet) vektor CVPD disuspensikan kembali dengan 10 ml air steril (*deionized water*).

Amplifikasi DNA

Fragmen 16 S rDNA patogen CVPD diamplifikasi dengan metode PCR yang dimodifikasi menggunakan 2 set primer oligonukleotida yang spesifik patogen CVPD, yaitu OI1: 5' GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA 3' dan OI2c : 5' GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T 3'. Campuran reaksi PCR (\pm 25 ml) mengandung 1 ml *template* DNA, kedua primer pada konsentrasi 0,4 mM, masing-masing 4 dNTP pada konsentrasi 0,2 mM (Promega), 1 unit *Tag polymerase* (Promega), 78 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1,5 mM MgCl₂, 17 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM b-mercaptoethanol, dan 200 mg BSA per ml. Program mesin PCR (*thermocycler*) yang digunakan untuk PCR adalah pemanasan awal (*initial denaturation*) pada suhu 92°C selama 30 detik, diikuti oleh 40 siklus, di mana setiap siklus terdiri dari 92°C selama 60 detik (*denaturation*), 55°C selama 30 detik (*annealing*), dan 72°C selama 90 detik (*extension*) serta siklus terakhir 72°C selama 10 menit.

Elektroforesis dan pewarnaan (*Staining*)

Produk amplifikasi (sebanyak 5-8 ml) dianalisis dengan elektroforesis menggunakan 1% (w/v) gel agarose, kemudian dideteksi dengan pewarnaan *ethidium bromide*, dan difotograf di bawah cahaya UV. Sampel-sampel dinyatakan positif, jika duplikat target DNA menghasilkan pita (*band*) yang tampak jelas pada ukuran yang benar bila dibandingkan dengan 1 kb penanda DNA (*DNA ladder*).

Analisis enzim restriksi DNA yang teramplifikasi

Urutan fragmen 16S rDNA patogen CVPD yang diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik (OI1 dan OI2c), dianalisis dengan enzim restriksi *Xba* I. Sepuluh μ l dari setiap DNA yang teramplifikasi dipotong (*digested*) secara terpisah dengan 20 unit enzim *Xba* I (Promega) dalam volume akhir 25 ml pada suhu 37°C selama 24 jam. Produk kemudian dipisahkan dengan elektroforesis menggunakan 1,5% gel

agarose, selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan *ethidium bromide*, dan terakhir difotograf di bawah cahaya UV menggunakan Gel Doc 2000 Biorad.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala penyakit CVPD

Gejala khas penyakit CVPD pada jeruk keprok/siam adalah daun-daun menguning, ukurannya kecil, dan tumbuh tegak, mati ranting (*die-back*) dan buah kecil dan bijinya abortif. Aubert (1992) melaporkan bahwa gejala khas CVPD pada tanaman jeruk keprok yang terinfeksi berat yaitu mati ranting sektoral, gejala yang mirip defisiensi mangan dan besi pada daun-daun, buah tidak simetris (*lopsided*), biji abortif, daun tebal/kaku dan tulang daun mengeras (*vein corking*).

Empat tipe gejala (tipe I–IV) pada daun-daun jeruk didapatkan pada pertanaman jeruk yang terinfeksi CVPD di Bertam Valley, Serdang, Marang (Malaysia) dan Sidrap, Jenepono, Selayar (Sulawesi Selatan, Indonesia) (Tabel 1). Penyakit CVPD dapat diketahui melalui beberapa tipe gejala seperti belang-belang, klorosis sedang, klorosis keras, klorosis dengan tulang daun menguning, dan tulang daun mengeras (Schneider 1968, Roistacher 1991, Ohtsu *et al.* 1998). Di Indonesia, kultivar jeruk komersial terutama mandarin (keprok) dan jeruk manis rentan terhadap penyakit CVPD berdasarkan penampakan gejala, seperti tunas-tunas menguning, mirip gejala defisiensi Zn, buah berguguran, buah tidak simetris dan berisi biji yang abortif (Muharam dan Whittle 1992). Aubert (1992) melaporkan bahwa di Malaysia, gejala khas penyakit *greening* pada tanaman jeruk siam yang terinfeksi berat adalah mati ranting sektoral, gejala mirip defisiensi Zn, daun-daun menebal dan keras.

Gejala tipe I (belang-belang), tipe II (klorosis sedang dengan tulang daun tetap hijau), tipe III (klorosis keras dengan tulang daun tetap hijau) dan tipe IV (klorosis dengan tulang daun menguning) ditemukan di Bertam Valley, Serdang, dan Marang (Malaysia), sementara di Indonesia

Tabel 1. Gejala khas CVPD pada daun-daun yang dikumpulkan di beberapa daerah sentra jeruk (*The typical symptoms of CVPD on leaves collected from several citrus areas*)

Kelompok Kabupaten	Kabupaten (District)	Gejala (Symptoms)	Hasil PCR (PCR results)
Bertam Valley	Sido	- Belang-belang (Mottling)	+
		- Klorosis sedang dengan tulang daun tetap hijau (Moderate chlorosis with green vein)	+
Sido	Sido	- Klorosis berat dengan tulang daun tetap hijau (Severe chlorosis with green vein)	+++
		- Klorosis sedang dengan tulang daun tetap hijau (Moderate chlorosis with green vein)	+++
Mado	Sido	- Klorosis berat dengan tulang daun tetap hijau (Severe chlorosis with green vein)	+++
		- Klorosis sedang dengan tulang daun tetap hijau (Moderate chlorosis with green vein)	+++
Sidrap dan Pangpang (Sidrap)	Sido	- Belang-belang (Mottling)	+
		- Klorosis sedang dengan tulang daun tetap hijau (Moderate chlorosis with green vein)	+
		- Klorosis berat dengan tulang daun tetap hijau (Severe chlorosis with green vein)	+++
		- Klorosis dengan tulang daun menguning (Panic yellowing)	+
Jeneponto	Kopet	- Belang-belang (Mottling)	++++
		- Klorosis sedang dengan tulang daun tetap hijau (Moderate chlorosis with green vein)	+++
		- Klorosis berat dengan tulang daun tetap hijau (Severe chlorosis with green vein)	+++
Selayar	Kopet	- Klorosis sedang dengan tulang daun tetap hijau (Moderate chlorosis with green vein)	+++
		- Klorosis berat dengan tulang daun tetap hijau (Severe chlorosis with green vein)	++++

Keterangan :
 +++++ : Hasil PCR sangat jelas (PCR very clear)
 ++++ : Hasil PCR jelas (PCR clear)
 +++ : Hasil PCR sedang (PCR moderately clear)
 ++ : Hasil PCR kurang jelas (PCR less clear)

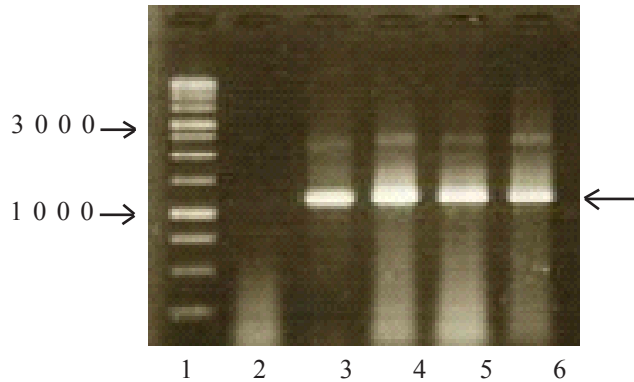
ditemukan di kabupaten Sidrap. Di kabupaten Jeneponto ditemukan gejala tipe I, II, dan III, sedangkan di kabupaten Selayar hanya ditemukan gejala tipe II dan III. Klorosis sedang dengan tulang daun tetap hijau (tipe II) dan klorosis keras dengan tulang daun tetap hijau (tipe III) paling banyak ditemukan pada tanaman jeruk yang terinfeksi di lapang, kemudian diikuti belang-belang (tipe I). Gejala tipe III umumnya ditemukan pada daun-daun muda, sementara gejala tipe I dan II ditemukan pada daun-daun tua.

Deteksi patogen CVPD pada daun-daun jeruk

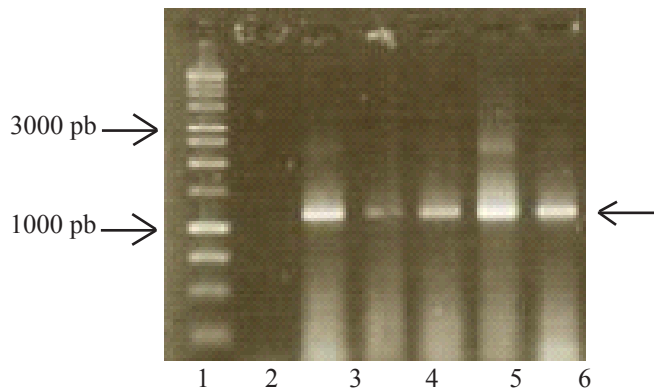
Fragmen 16S rDNA patogen CVPD dideteksi pada setiap gejala khas (tipe I, II, III, IV) yang dikumpulkan dari beberapa sentra jeruk di Malaysia dan Indonesia (Gambar 1-4). Fragmen ini tidak dideteksi pada daun-daun tanaman jeruk yang

sehat. Setelah divisualisasi dengan elektroforesis, hasil PCR berupa pita fragmen 16S rDNA patogen CVPD tampak jelas dan tebal pada sampel-sampel daun, dengan gejala tipe III (+4) dan tipe I (+4) dari Serdang, Selayar, dan Jeneponto. Sementara pita fragmen of 16S rDNA patogen CVPD tampak jelas namun kurang tebal, pada sampel-sampel daun dengan gejala tipe II (+1) dan tipe I (+1) dari Bertam Valley dan Sidrap.

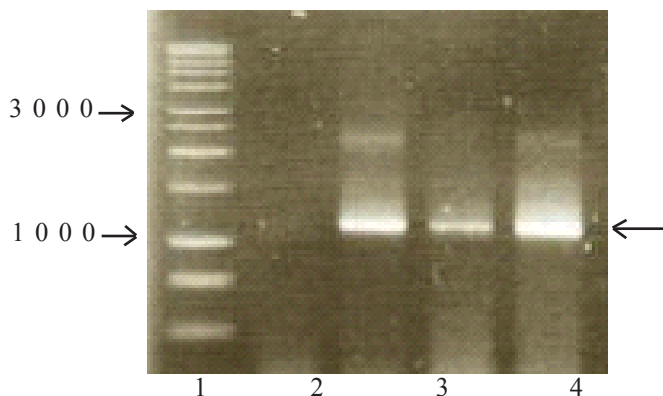
Fragmen 16S rDNA patogen CVPD pada ukuran yang diharapkan, yaitu 1160 pasangan basa (pb) diamplifikasi dari DNA yang diekstrak dari tanaman jeruk yang terinfeksi CVPD di beberapa sentra jeruk. Hal ini menunjukkan bahwa penyakit CVPD dipastikan sudah ada di daerah-daerah tersebut. Nakashima *et al.* (1998) melaporkan bahwa fragmen 16S rDNA patogen CVPD (GO) dideteksi pada daun-daun yang dikumpulkan dari pertanaman jeruk yang terinfeksi di Thailand



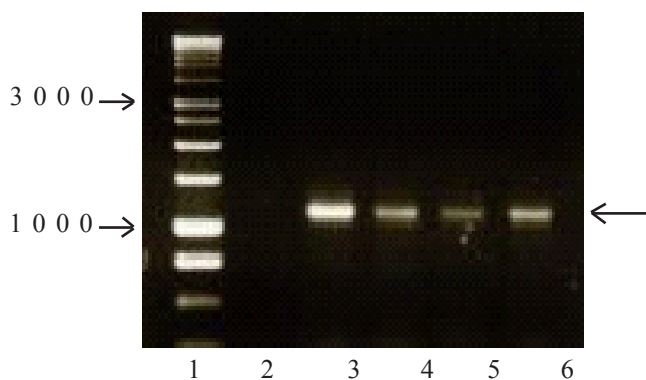
Gambar 1. Elektroforesis gel agarose DNA patogen CVPD yang diamplifikasi dengan primer spesifik OI1 dan OI2c dari tanaman jeruk terinfeksi CVPD di kabupaten Jenepono. Jalur 1 = 1 kb DNA ladder, Jalur 2 = sampel tanaman sehat (kontrol negatif), Jalur 3 = DNA yang diekstrak dari bibit sakit (kontrol positif), Jalur 4 = gejala belang-belang, Jalur 5 = gejala klorosis sedang dan Jalur 6 = gejala klorosis keras. Tanda panah menunjukkan posisi fragmen 16S rDNA patogen CVPD pada ukuran 1160 pb (*Agarose gel electrophoresis of DNA amplified with specific primer, OI1 and OI2c from GO-infected mandarin trees at Jenepono. Lane 1 = 1 kb DNA ladder, Lane 2 = healthy plant (negative control), Lane 3 = DNA extracted from GO-infected seedling (positive control), Lane 4 = mottling symptom, Lane 5 = mild chlorosis with green vein, Lane 6 = severe chlorosis with green vein. Arrowheads indicate the position of the amplified 16S rDNA fragments of GOs*)



Gambar 2. Elektroforesis gel agarose DNA patogen CVPD yang diamplifikasi dengan primer spesifik OI1 dan OI2c dari tanaman jeruk terinfeksi CVPD di kabupaten Sidrap. Jalur 1 = 1 kb DNA ladder, Jalur 2 = sampel tanaman sehat (kontrol negatif), Jalur 3 = DNA yang diekstrak dari bibit sakit (kontrol positif), Jalur 4 = gejala belang-belang, Jalur 5 = gejala klorosis sedang dan Jalur 6 = gejala klorosis keras, Jalur 7 = gejala klorosis dengan tulang daun menguning. Tanda panah menunjukkan posisi fragmen 16S rDNA patogen CVPD pada ukuran 1160 pb (*Agarose gel electrophoresis of DNA amplified with specific primer, OI1 and OI2c from GO-infected mandarin trees at Sidrap. Lane 1 = 1 kb DNA ladder, Lane 2 = healthy plant (negative control), Lane 3 = DNA extracted from GO-infected seedling (positive control), Lane 4 = mottling symptom, Lane 5 = mild chlorosis with green vein, Lane 6 = severe chlorosis with green vein, Lane 7 = vein yellowing. Arrowheads indicate the position of the amplified 16S rDNA fragments of GOs*)



Gambar 3. Elektroforesis gel agarose DNA patogen CVPD yang diamplifikasi dengan primer spesifik OI1 dan OI2c dari tanaman jeruk terinfeksi CVPD di Serdang (Malaysia). Jalur 1 = 1 kb DNA ladder, Jalur 2 = sampel tanaman sehat (kontrol negatif), Jalur 3 = DNA yang diekstrak dari bibit sakit (kontrol positif), Jalur 4 = gejala klorosis sedang dan Jalur 5 = gejala klorosis keras. Tanda panah menunjukkan posisi fragmen 16S rDNA patogen CVPD pada ukuran 1160 pb (*Agarose gel electrophoresis of DNA amplified with specific primer, OI1 and OI2c from GO-infected mandarin trees at Serdang (Malaysia). Lane 1 = 1 kb DNA ladder, Lane 2 = healthy plant (negative control), Lane 3 = DNA extracted from GO-infected seedling (positive control), Lane 4 = mild chlorosis with green vein, Lane 5 = severe chlorosis with green vein. Arrowheads indicate the position of the amplified 16S rDNA fragments of GOs*)



Gambar 4. Elektroforesis gel agarose DNA patogen CVPD yang diamplifikasi dengan primer spesifik OI1 dan OI2c dari tanaman jeruk terinfeksi CVPD di Bertam Valley (Malaysia). Jalur 1 = 1 kb DNA ladder, Jalur 2 = sampel tanaman sehat (kontrol negatif), Jalur 3 = DNA yang diekstrak dari bibit sakit (kontrol positif), Jalur 4 = gejala belang-belang, Jalur 5 = gejala klorosis sedang dan Jalur 6 = gejala klorosis keras. Tanda panah menunjukkan posisi fragmen 16S rDNA patogen CVPD pada ukuran 1160 pb (*Agarose gel electrophoresis of DNA amplified with specific primer, OI1 and OI2c from GO-infected mandarin trees at Bertam Valley (Malaysia). Lane 1 = 1 kb DNA ladder, Lane 2 = healthy plant (negative control), Lane 3 = DNA extracted from GO-infected seedling (positive control), Lane 4 = mottling symptom, Lane 5 = mild chlorosis with green vein, Lane 6 = severe chlorosis with green vein. Arrowheads indicate the position of the amplified 16S rDNA fragments of GOs*)

yang memperlihatkan gejala-gejala khas seperti belang-belang, klorosis sedang dan keras dengan tulang daun tetap hijau, hijau pucat pada daun-daun muda klorosis dengan tulang daun menguning dan tulang daun mengeras.

Deteksi patogen CVPD pada vektor (*D. Citri*)

Fragmen 16S rDNA patogen CVPD pada ukuran basa yang diharapkan yaitu 1160 pb juga dideteksi dari DNA yang diekstrak dari vektor CVPD (*D. citri*). Vektor ini dikumpulkan dari tanaman jeruk yang terinfeksi CVPD di Serdang (Gambar 5). Fragmen tersebut tidak dideteksi dari DNA yang diekstrak dari vektor yang dipelihara pada tanaman kemuning (*Murayya paniculata*).

Hasil deteksi juga menunjukkan bahwa fragmen 16S rDNA patogen CVPD (1160 pb) masih diamplifikasi dengan jelas dari DNA yang diekstrak dari 1 individu vektor. Nakashima *et al.* (1998) sebelumnya melaporkan bahwa DNA patogen CVPD (GO DNA) dapat dideteksi dari vektor menggunakan teknik PCR, baik menggunakan metode ekstraksi CTAB (*Cetyltrimethyl*

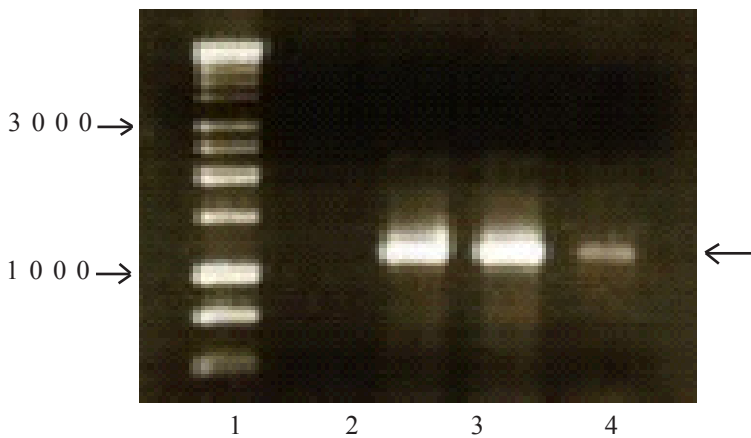
ammonium bromide) maupun metode Mannitol.

Karakterisasi DNA yang teramplifikasi

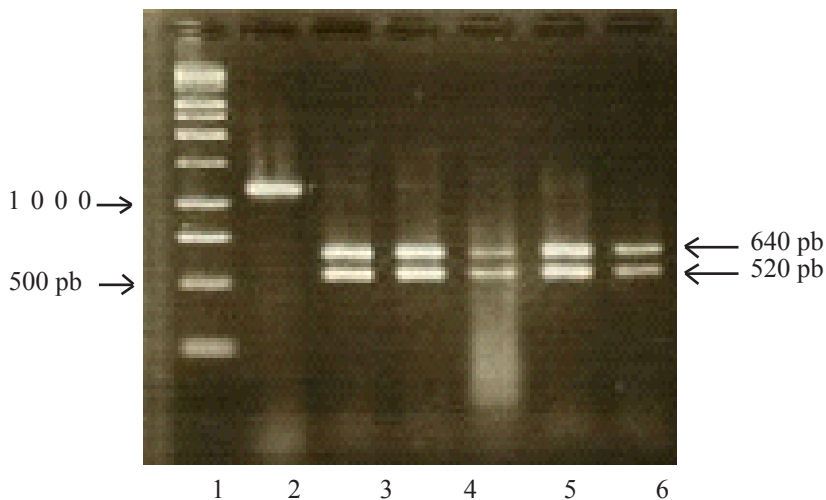
Sampel-sampel tanaman jeruk yang mewakili sentra jeruk di Malaysia (Serdang, Marang, Bertam Valley) dan Sulawesi Selatan (Sidrap, Jenepono) menunjukkan bahwa fragmen 16S rDNA patogen CVPD dari semua sampel dapat dipotong menjadi 2 fragmen pada ukuran basa yang diharapkan, yaitu 640 dan 520 pb menggunakan enzim restriksi XbaI (Gambar 6).

Hasil tersebut memastikan bahwa spesies bakteri (patogen CVPD) yang menyerang pertanaman jeruk di Malaysia dan Sulawesi Selatan adalah kelompok tipe Asia (*Asian greening type*), *L. asiaticum*. Menurut Jagoueix *et al.* (1996), enzim restriksi Xba I dapat menghidrolisa fragmen 16S rDNA *L. asiaticum* menjadi 2 fragmen pada ukuran basa 640 dan 520 pb, sementara *L. africanum* (tipe Afrika) terpotong menjadi 3 fragmen pada ukuran basa 520, 506, dan 130 pb.

KESIMPULAN



Gambar 5. Elektroforesis gel agarose DNA patogen CVPD yang diamplifikasi dengan primer spesifik OI1 dan OI2c dari vektor CVPD. Jalur 1 = 1 kb DNA ladder, Jalur 2 = lima vektor sehat (kontrol negatif), Jalur 3 = lima vektor dari tanaman terinfeksi, Jalur 4 = tiga vektor dari tanaman terinfeksi dan Jalur 5 = satu vektor dari tanaman terinfeksi. Tanda panah menunjukkan posisi fragmen 16S rDNA patogen CVPD pada ukuran 1160 pb (*Agarose gel electrophoresis of DNA amplified with specific primer, OI1 and OI2c from GO-infected mandarin trees at Bertam Valley (Malaysia). Lane 1 = 1 kb DNA ladder*)



Gambar 6. Elektroforesis 1,5% gel agarose DNA hasil potongan dengan enzim *Xba*I digested DNA dari beberapa sentra produksi jeruk di Sulawesi Selatan. Jalur 1 = 1 kb DNA ladder (Promega), Jalur 2 = DNA yang belum terpotong, Jalur 3-5 = DNA sampel dari Malaysia, Jalur 6 = DNA dari Sidrap, dan Jalur 7 = DNA dari sampel Jeneponto

1. Terdapat 4 tipe gejala yang ditemukan, yaitu (1) belang-belang; (2) klorosis sedang dengan tulang daun tetap hijau; (3) klorosis keras dengan tulang daun tetap hijau; dan (4) klorosis dengan tulang daun menguning pada daun-daun tanaman jeruk keprok/siam yang terinfeksi CVPD.
2. Fragmen 16S rDNA patogen CVPD pada ukuran basa yang diharapkan, yaitu 1160 pasangan basa dideteksi pada setiap tipe gejala yang dikumpulkan dari Serdang, Bertam Valley, Marang (Malaysia) dan kabupaten Jeneponto, Sidrap, dan Selayar (Sulawesi Selatan, Indonesia). Hal ini menunjukkan bahwa CVPD positif ditemukan pada keenam daerah tersebut.
3. Fragmen 16S rDNA patogen CVPD pada ukuran basa yang diharapkan, yaitu 1160 pasangan basa juga dideteksi di dalam vektor CVPD yang ditemukan pada tanaman yang terinfeksi di lapang.
4. Analisis enzim restriksi DNA yang teramplifikasi menunjukkan bahwa patogen CVPD di Sulawesi Selatan adalah disebabkan *L. asiaticum*.
1. Aubert, B. 1992. Malaysian citriculture report of visits October 19th-22nd 1987 and February 23rd-28th 1989. In *Proceedings of Asian Citrus Rehabilitation Conference*, ed. L. Setyobudi, F.A. Bahar, M. Winarno and A.M. Whittle, pp 16-28. Malang, Indonesia: Ministri of Agriculture, Republic of Indonesia and FAO.
2. Da Graca, J.V. 1991. Citrus greening disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29:109-136
3. Ekowarso, J. 1994. Peningkatan Produksi Hortikultura Berwawasan Lingkungan. *Dalam Prosiding Rapat Kerja Penyusunan Prioritas dan Desain Penelitian Hortikultura*. Solok, 17-19 November 1994. Hal. 107-117
4. Garnier, M., S. Gao, Y. He, S. Villechanoux and J.V. Bove. 1992. Monoclonal antibodies against various strains the bacterium like organism (BLO) associated with citrus greening disease. In *Proceedings of Asian Citrus Rehabilitation Conference*, ed. L. Setyobudi, F.A. Bahar, M. Winarno and A.M. Whittle, pp 181-182. Malang, Indonesia: Ministri of Agriculture, Republic of Indonesia and FAO.
5. Hadidi, A., L. Levy and E.V. Podleckis. 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In *Molecular methods in plant pathology*, ed. R.P. Singh and U.S. Singh: 167-187

PUSTAKA

6. Hung, T.H., M.L. Wu and H.J. Su. 1999. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. *J. Phytopathol.* 147:599-604.
7. Jagoueix, S., J.M. Bove and M. Garnier. 1994. The Phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the a subdivision of the Protobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:379-386.
8. _____ . 1996. PCR detection of the two 'Candidatus' liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes* 10:43-50
9. Muharam, A., and A.M. Whittle. 1992. Indexing of citrus for major systemic pathogens in Indonesian citrus variety improvement programme. *In Proceedings of Asian Citrus Rehabilitation Conference*, ed. L. Setyobudi, F.A. Bahar, M. Winarno, and A.M. Whittle, pp 140-156. Malang, Indonesia: Ministry of Agriculture, Republic of Indonesia and Food and Agriculture Organization
10. Nakashima, K., M. Prommintara, Y. Ohtsu, T. Kano, J. Imada and M. Koizumi. 1996. Detection of 16 S rDNA of Thai isolates of bacterium like organism associated with greening disease of citrus. *JIRCAS J.* 3:1-8.
11. _____, Y. Ohtsu and M. Prommintara. 1998. Detection of citrus greening organism in citrus plants and psylla *D. citri* in Tahiland. *Annu. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64:153-159
12. Ohtsu, Y., K. Nakashima, M. Prommintara and Y. Tomiyasu. 1998. Typical symptoms of citrus greening on Mandarin trees in Nepal, supported by detection and characterization of ribosomal DNA of the causal organisms. *Annu. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 539-545.
13. Roistacher, C.N. 1991. *Graft-transmissible disease of citrus (handbook for detection and dignosis)*. FAO: 35-45
14. Schneider, H. 1968. Anatomy of greening-diseased sweet orange shoots. *Phytopathol.* 58:1155-1160.
15. Villechanoux, S., M. Garnier, J. Renaudin and J.M. Bove. 1992. Detection of several strains of the bacterium-like organism of citrus greening disease by DNA probes. *Current Microbiol.* 24:89-95.