

Hubungan Gejala *Blotching*, Defisiensi Zn dan Fe dengan Hasil Deteksi Penyakit CVPD Jeruk dengan *Polymerase Chain Reaction*

Dwiastuti, M.E., A. Triwiratno, dan U. N. Taflikah

Loka Penelitian Tanaman Jeruk dan Hortikultura Subtropik
Jl. Raya Tlekung Junrejo, Kotak Pos 22, Batu, Malang 65301

Identifikasi penyakit *citrus vein phloem degeneration* pada jeruk di lapang sering mengalami kerancuan, karena sulit membedakan dengan defisiensi hara, terutama Zn dan Fe. Penelitian ini bertujuan mengetahui hasil deteksi CVPD dengan *polymerase chain reaction* (PCR) pada daun jeruk yang memiliki penampilan gejala khas *blotching*, defisiensi Zn dan Fe yang berasal dari Siompu (Kendari), Bali, Puntan (Batu), Kalimantan Selatan, dan Madura. Penelitian ini perlu diinformasikan untuk mengklarifikasi tentang ketepatan identifikasi CVPD di lapang. Metode PCR yang digunakan mendeteksi *Liberobacter asiaticum*, adalah dengan amplifikasi 16 Sr DNA pada 1160 bp. Hasil deteksi menunjukkan, bahwa gejala khas *blotching* atau *mottle*, yaitu belang-belang kuning dengan pola tidak teratur pada helai dan tulang daun hijau atau menguning menampilkan pita tebal pada hasil elektroforesis, artinya mengandung *L. asiaticum* (patogen penyebab CVPD); sedang sampel bergejala defisiensi Zn dan Fe tidak menampilkan pita pada hasil elektroforesis, artinya gejala seperti ini tidak mengandung atau bukan disebabkan oleh patogen *L. asiaticum*.

Kata kunci: *Blotching*; Jeruk; CVPD; Defisiensi; PCR; *Liberobacter asiaticum*.

ABSTRACT. Dwiastuti M.E., A. Triwiratno, and U.N. Taflikah. 2003. **Relation of blotching, Zn and Fe deficiency symptoms and the result of quick detection of CVPD by polymerase chain reaction**. Field identification of citrus greening or CVPD is often questionable, because it is very similar to nutrient deficiency especially Zn and Fe. The aim of this observation was to determine result of CVPD detection by polymerase chain reaction analysis on citrus leaves with blotching symptoms, Zn and Fe deficiency symptoms. The samples were collected from Siompu (Kendari), Bali, Puntan (Batu), South of Kalimantan, and Madura that those indicated CVPD contamination. Polymerase chain reaction (PCR) was used for detecting *Liberobacter asiaticum*, with 16 Sr DNA amplification on 1160 bp. The result of detection showed that blotching or mottle characteristic symptom samples (yellow of the vein and adjacent tissues with irregular design) produced a thin band on electrophoresis gel, it means this samples contained *L. asiaticum*. Samples of Zn and Fe deficiency symptoms did not exhibit similar band, it means these symptoms were not caused by *L. asiaticum*.

Keywords: Blotching; Citrus; CVPD; Deficiency; PCR; *Liberobacter asiaticum*.

Penyakit *citrus vein phloem degeneration* (CVPD) yang disebabkan oleh *L. asiaticum* (Jagoueix *et al.* 1994) dilaporkan telah banyak menyebabkan kerusakan dan kerugian pada tanaman jeruk, terutama jeruk siem. Di Indonesia, penyakit ini telah tersebar luas di Pulau Jawa, Sumatera, dan Bali serta telah terdapat di sebagian daerah di Pulau Kalimantan dan Sulawesi (Semangoen 1994; Tirtawidjaja & Suharjo 1990). Penyebaran dan penularan penyakit tersebut dari tanaman sakit ke tanaman sehat dapat terjadi melalui serangga vektor *Diaporina citri* Kuw, mata tempel, dan bibit yang sudah terinfeksi patogen (Tirtawidjaja 1983). *Liberobacter asiaticum* merupakan bakteri gram negatif yang tidak dapat dibiakkan pada media buatan (Garnier *et al.* 1984). Di Indonesia, penyakit CVPD menyebabkan lebih dari tiga juta

tanaman jeruk rusak antara tahun 1960-1970 (Graca 1991), dan sebagian besar wilayah Jawa dan Sumatera merupakan daerah endemik (Salibe & Tirtawidjaja 1984). Selama tahun 2000, dilaporkan sebanyak 612.628 pohon jeruk yang tersebar di hampir seluruh propinsi di Indonesia terinfeksi CVPD (Daryanto 2001). Penyakit ini menyerang semua jenis jeruk komersial, dari jenis jeruk siem, keprok, manis sampai nipis. Jenis besar (pamelo) termasuk jenis jeruk yang toleran (Dwiastuti 1999; Aubert *et al.* 1985).

Upaya pengendalian penyakit CVPD yang telah dilakukan dengan eradikasi, infus dengan antibiotik, penggunaan bibit jeruk sehat, serta pengendalian vektor belum memberikan hasil yang memuaskan. Hal tersebut disebabkan oleh

perkembangan ilmu pengetahuan tentang identifikasi penyebab CVPD serta perbedaan pemahaman atau persepsi tentang penyakit tersebut di lapangan, yang menyebabkan sulitnya membedakan antara gejala penyakit CVPD dengan gejala defisiensi hara.

Dengan berkembangnya bioteknologi di bidang fitopatologi yang meliputi teknik-teknik sederhana, seperti kultur jaringan tanaman sampai pada rekayasa genetika, maka berkembanglah teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik ini dimanfaatkan untuk identifikasi patogen pada tingkat genom atau molekuler.

Teknik PCR untuk deteksi *L. asiaticum* penyebab *asian greening*, termasuk CVPD, dapat dikembangkan setelah dikonstruksi primer spesifiknya yaitu GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA sebagai *forward primer* OI1 yang mempunyai posisi nukleotida 39-61 dan GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT sebagai *reverse primer* OI2c yang mempunyai posisi nukleotida 1,183-1,204 (Jagoueix *et al.* 1994). Primer ini terbukti dapat mendeteksi CVPD dengan sangat sensitif, tinggi akurasi, dan cepat (Dwiastuti *et al.* 1999; Triwiratno *et al.* 1999; Subandiyah *et al.* 2000; Bove & Garnier 1997).

Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian dilakukan untuk mendeteksi gejala *blotching*, gejala defisiensi Zn dan Fe dari lapang dengan PCR. Hasil deteksi ini diharapkan dapat membantu praktisi di lapang mengenal secara tepat gejala CVPD. Diduga terdapat perbedaan gejala khas antara tanaman yang terinfeksi CVPD dengan kekurangan unsur mikro Zn dan Fe.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan dari bulan Oktober 2001-Juli 2002, di lapang dan di laboratorium Virologi dan Mikrobiologi Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian Punten, Malang. Sampel diambil dari beberapa sentra jeruk di Indonesia yang dilaporkan sudah tercemar CVPD, di antaranya berasal dari Siompu (Kendari), Bali, Punten (Batu), Kalimantan Selatan, dan Madura. Sampel diambil dari tanaman yang dicurigai dengan

tanda-tanda pertumbuhan daun lebih mengarah ke atas, cenderung kaku dan lebih tebal. Dari tanaman-tanaman berkriteria tersebut, daun bergejala defisiensi Zn, Fe atau gejala *blotching* diambil sebagai sampel (Gambar 1, 2, dan 3). Tiap sampel bergejala sama diulang dua kali.

Analisis PCR dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan Jagoueix *et al.* (1996) (Lampiran 1). Primer spesifik yang digunakan OI1, OI2c dan OA1. Program PCR yang diamplifikasikan adalah 35 siklus terdiri dari 92°C selama 40 detik dan 72°C selama 90 detik. Produk PCR yang dihasilkan kemudian dielektroforesis dengan gel agarose 0,7% pada 80-100 volt, 175 mA. Hasil elektroforesis diwarnai dengan ethidium bromida 10 mg/ml selama 10 menit, lalu diamati pita yang terbentuk



Gambar 1. Gejala defisiensi Zn (*Vein banding*)



Gambar 2. Gejala defisiensi Fe (*Intervenal chlorosis*)



Gambar 3. Gejala *blotching* (*Blotching symptoms*)

pada gel agarose. Sebagai standar penentuan adalah terbentuknya pita pada fragmen 1.160 *base pair* (bp), kontrol negatif (sampel tanaman sehat) serta kontrol positif (sampel tanaman terinfeksi CVPD hasil inokulasi).

Untuk memudahkan penilaian terhadap kandungan *L. asiaticum* dalam jaringan tanaman yang diuji, pita gel yang terbentuk pada 1.160 bp dikategorikan sebagai:

- - = tidak mengandung *Liberobacter*
- 1+ = kandungan *Liberobacter* sedikit, sama dengan kontrol positif
- 2+ = kandungan *Liberobacter* sedang, lebih tebal dari kontrol positif
- 3+ = kandungan *Liberobacter* banyak, lebih tebal dari 2+
- 4+ = kandungan *Liberobacter* sangat banyak, lebih tebal dari 3+

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada hasil pembacaan sampel dari Kalimantan Selatan dan Madura (Gambar 4), tampak bahwa muncul pita pada sampel No. 5 dan 6 (dari Madura dan bergejala *blotching*) sedang sampel lain dengan gejala defisiensi Zn (No. 1-3) tidak muncul pita kecuali sampel No. 4 yang bergejala *blotching*, tidak muncul pita. Hal ini kemungkinan adanya kekurangtelitian pada sampel yang diambil. Demikian juga pada hasil pembacaan sampel dari Siompu-Kendari (Gambar 5) dan sampel dari Bali dan Batu (Gambar 6) menunjukkan bahwa sampel dengan gejala defisiensi Zn dan Fe serta sehat tidak membentuk pita pada gel agarose (No 7-11; 19-20), sedang yang bergejala *blotching*, *greening* sektoral, dan *yellow shoot* membentuk pita dengan tebal yang bervariasi. Menurut Jaqueix *et al.* (1996), primer OI2c dan OI1 sangat spesifik untuk mengamplifikasi 16 Sr DNA dari semua strain, tetapi tidak dapat mengamplifikasi patogen lain yang juga mempunyai 16 Sr DNA. Berbeda dengan primer universal (fD1/rP1) dapat mengamplifikasi patogen lain seperti *Spiroplasma citri*, *Xanthomonas citri*, *Acinetobacter iwoffii*, *Agrobacterium tumefaciens* (Jaqueix *et al.* 1999), *Citrus Tristeza Virus*, *Vein enation* (Triwiratno *et al.* 1999) yang juga mempunyai 16 Sr DNA. Dengan demikian primer universal

(fD1/rP1) bersifat umum untuk 16 Sr DNA, sedangkan primer spesifik (OI2c dan OI1) sangat spesifik hanya untuk mendeteksi 16 Sr DNA dari strains-strains *Liberobacter* saja. Hasil yang sama juga diperoleh Jaqueix *et al.* (1997), Dwiastuti *et al.* (1999) dan Subandiyah *et al.* (2000) yang membandingkan sekuens daerah intergenik 16 Sr DNA dan 16S/23S di antara organisme *greening* jeruk di Asia dan Afrika. Pada analisis PCR untuk sampel 7-13 (Gambar 5) dan sampel 14-26 (Gambar 6) terbentuk juga garis/pita di bawah pita pada posisi fragmen 1.160 bp. Pita bagian bawah ini merupakan artifak yang menunjukkan adanya kelebihan *taqpolymerase*.

Pada sampel daun yang bergejala *blotching* (belang-belang menguning), semua menghasilkan pita pada hasil elektroforesisnya, artinya ditemukan DNA *L. asiaticum* pada posisi fragmen DNA 1160 bp (pasangan basa). Dengan demikian gejala *blotching*, *yellow shoot*, dan *greening* sektoral pada tanaman yang tidak normal pertumbuhannya dapat dikarakterisasikan sebagai gejala khas CVPD. Sedangkan daun bergejala defisiensi Zn dan Fe yang diambil dari kebun rusak di Barito Kuala (Kalimantan Selatan), Siompu (Kendari), dan Kintamani (Bali) tidak muncul pita pada hasil elektroforesis (Gambar 4, 5, 6, dan Tabel 1). Demikian juga pada daun yang bergejala defisiensi Fe yang diambil dari Siompu (Kendari) tidak muncul pita, berarti tidak ditemukan *L. asiaticum* penyebab CVPD. Dengan demikian gejala defisiensi Zn dan Fe tidak mempunyai gejala khas CVPD.

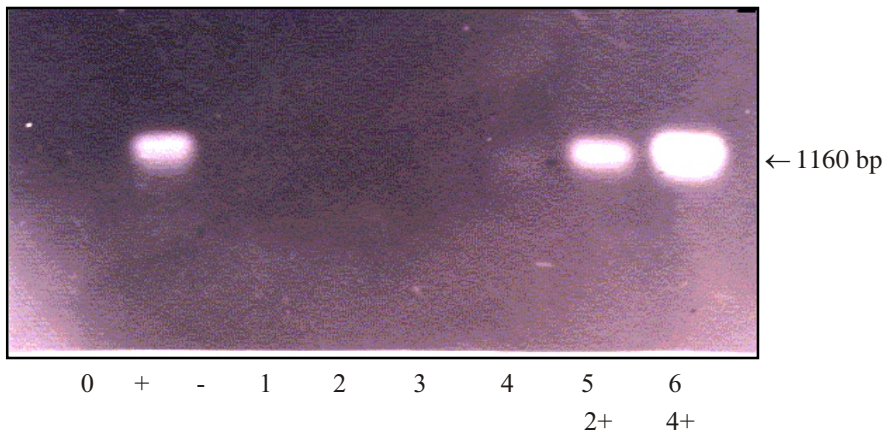
Menurut Jaqueix *et al.* (1994) protokol ekstraksi sampel PCR untuk jeruk telah diupayakan agar penghambat-penghambat reaksi PCR tidak muncul, misalnya DNA tanaman dan DNA lainnya, dengan cara sentrifugasi deferensial dan diperangkap pada kolom *wizard* agar tidak tercampur dengan DNA *Liberobacter*.

Cara deteksi dengan teknik PCR ini dapat mendeteksi *greening* atau *huang lung bin* termasuk CVPD, dengan hasil yang memuaskan. Beberapa peneliti yang telah berhasil mendeteksi, antara lain Jaqueix (1994) dapat mendeteksi *huang lung bin* dari Nelspruit dan letaba dari Afrika Selatan, Harare Zimbabwe, Cina, India, Nepal, Filipina, Taiwan dan Thailand. Bove & Garnier (1997) dapat

Tabel 1. Hasil analisis PCR pada sampel daun jeruk bergejala defisiensi Zn, Fe, dan blotching (Result of PCR analysis of leaf sample on defisiensi symptoms of Zn, Fe, and blotching)

No. Sampel (Sample)	Varietas (Varieties)	Asal sampel (Origin)	Gejala (Symptom)	Hasil PCR (PCR result)
1	Siem matang	Kab. Barito Kuala	defisiensi Zn	-
2	Siem matang	Kab. Barito Kuala	defisiensi Zn	-
3	Siem matang	Kab. Barito Kuala	defisiensi Zn	-
4	Keprok madura	screen lama Madura	blotching	-
5	Keprok madura	screen baru Madura	blotching	-
6	Keprok madura	lapang	blotching	2+
7	K. siompu	Siompu, Kendari	defisiensi Zn	4+
8	K. siompu	Siompu, Kendari	defisiensi Zn	-
9	K. siompu	Siompu, Kendari	defisiensi Fe	-
10	K. siompu	Siompu, Kendari	defisiensi Fe	-
11	K. siompu	Siompu, Kendari	defisiensi Zn	-
12	K. siompu	Siompu, Kendari	blotching	-
13	K. siompu	Siompu, Kendari	blotching	3+
14	Lime	pekarangan, Julah, Bali	blotching	2+
15	K. tejakula	endemik, Kubu, Bali	blotching	4+
16	K. tejakula	Bondalem, Bali	blotching	3+
17	K. tejakula	Bondalem, Bali	blotching	2+
18	K. tejakula	Bondalem, Bali	greening sektoral	3+
19	K. siem	Kintamani, Bali	tidak bergejala	2+
20	K. siem	Kintamani, ali	defisiensi Zn	-
21	Lemon	Dencarik, Bali	blotching	-
22	K. tejakula	Brombang, Bali	blotching	2+
23	Lemon	Tegalsatu, Bali	blotching	4+
24	<i>C. amblycarpa</i>	pembibitan Busungbiu	yellow shoot	3+
25	K. tejakula	antara Banjar-Kayuputih, Bali	blotching	4+
26	Lemon	Punten, Jatim	blotching	2+

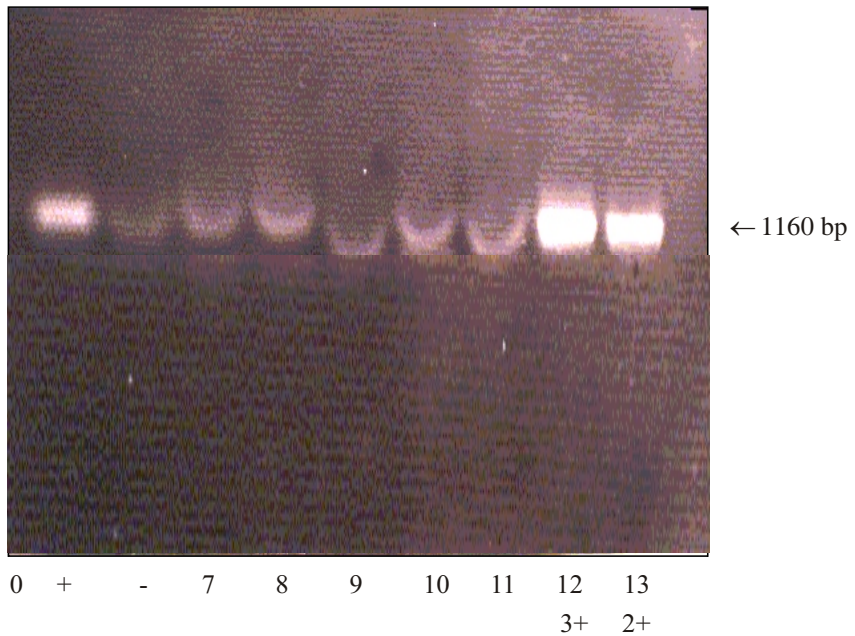
- = tidak mengandung *Liberobacter*
 1+ = kandungan *Liberobacter* sedikit
 2+ = kandungan *Liberobacter* sedang
 3+ = kandungan *Liberobacter* banyak



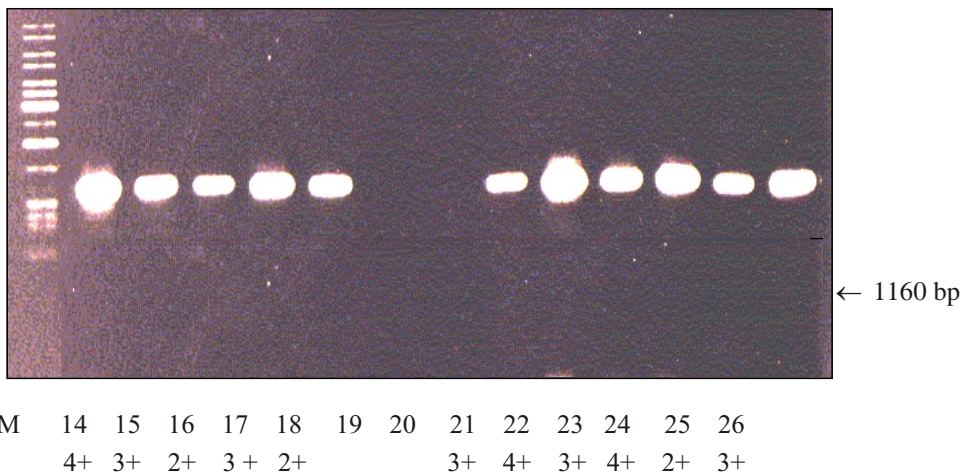
Gambar 4. Hasil elektroforesis pada gel agarose 0,7%, DNA yang telah diamplifikasi dengan primer OI2c/OI1/OA1 pada sampel dari Kalsel dan Madura (Electrophoresis result on 0.7% agarose gel, amplified DNA of OI2c/OI1/OA1 primer on Kalsel and Madura sample)
 baris 0 = kontrol air; baris + = kontrol positif; baris - = kontrol negatif; baris 1-6 = sampel dari Barito Kuala dan Madura

mendeteksi CVPD di Bali dengan cepat. Dwiastuti *et al.* (1999) dapat mendeteksi *greening* Asia dan Afrika serta gejala defisiensi dari Afrika Selatan, Vietnam, Filipina, Perancis

dan Cina. Triwiratno *et al.* (1999) mendeteksi blok fondasi (BF) dan blok penggandaan mata tempel (BPMT) Luwus (Bali) serta dapat membedakan dengan tanaman yang terserang



Gambar 5. Hasil elektroforesis pada gel agarose 0,7%, DNA yang telah diamplifikasi dengan primer OI2c/ OI1/OA1 pada sampel dari Siompu, Kendari (*Electrophoresis result on 0.7% agarose gel, amplified DNA of OI2c/OI1/OA1 primer on Siompu, Kendari sample*)
baris 0 = air; baris + = kontrol positif; baris - = kontrol negatif; baris 7-13 = sampel dari Siompu, Kendari



Gambar 6. Hasil elektroforesis pada gel agarose 0,7%, DNA yang telah diamplifikasi dengan primer OI2c/ OI1/OA1 pada sampel dari Bali dan Batu (*Electrophoresis result on 0.7% agarose gel, amplified DNA of OI2c/OI1/OA1 primer on Bali and Batu sample*)
M = 1 kb ladder sebagai marker (Gibco, BRL); baris 14-15 = sampel dari Bali; baris 26 = sampel dari Batu

virus tristeza dan *vein enation woody gall*. Subandiyah *et al.* (2000) juga dapat mendeteksi CVPD asal Sleman (Yogyakarta) dengan cara yang sama.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis dengan teknik PCR pada sampel lapang yang bergejala defisiensi Zn, Fe dan *blotching*, maka dapat disimpulkan bahwa *blotching/mottle* atau belang-belang kuning tidak teratur merupakan gejala khas CVPD pada tanaman jeruk di beberapa sentra endemik CVPD di Indonesia.

PUSTAKA

1. Aubert, B; M. Garnier, D. Guillaumin, B. Herbagyandono, L. Setyobudi and Nurhadi. 1985. Greening, a serious threat for the citrus productions of the Indonesian archipelago. Future prospects of integrated control. *Fruits*. 4(9):549-569.
2. Bove, J.M. and M. Garnier . 1997. Rapid Detection of *L. asiaticum* the causal agent of citrus huanglungbin disease (CVPD) in Bali, Indonesia. Report of 2 Consultancy North Bali Groundwater Irrigation and Water Supply – ALA/91/19.
3. Da Graca, J.V. 1991. Citrus greening disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1991. 29:109-136.
4. Daryanto. 2001. Kebijakan perlindungan tanaman hortikultura. Direktorat Perlindungan Hortikultura. Makalah Temu Teknologi Pemasarakatan PHT pada Tanaman Jeruk di Jakarta. 6 hlm.
5. Garnier, M.; N. Daniels and J.M. Bove. 1984. The greening organism is a gram negative bacteria. *IOCV* 9th:115-124.
6. Salibe, A.A.; and S. Tirtawidjaja. 1984. Incidencia da doenca greening em. Variedades citricas na Indonesia. *Summa Phytopathol.* 10:35 (Rev. *Plant Pathol.* 65:196).
7. Dwiastuti, M.E. 1999. Evaluasi Ketahanan Varietas Jeruk terhadap Penyakit CVPD Isolat Lumajang. *Dalam Prosiding seminar nasional hortikultura*. UPN Yogyakarta:122-128.
8. _____; A. Triwiratno, and A. Supriyanto. 1999. Detection of the asian and african *Liberobacter* Species caused greening disease of citrus with PCR. *Indonesian J. Biotech.* June. 1999. IUC for Biotechnology. Gadjah Mada Univ.:266-270.
9. _____, 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 Proteobacter *Int. Syst. Bacteriol.* 44:379-386.
10. _____. 1996. PCR Detection of candidatus *Liberobacter* spesies Associated with Greening Disease of Citrus. *Moleculer and Celluler Probes.* 110:43-50.
11. _____. 1997. Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic region of candidatus *Liberobacter asiaticum* and candidatus *Liberobacter africanum*, the two species associated with Huanglungbin (greening) disease. *Int. Syst. Bacteriol.* 47:224-227.
12. Semangoen, H. 1994. *Penyakit-penyakit penting tanaman hortikultura di Indonesia*. Gadjah Mada Univ Press. Yogyakarta. 850 h.
13. Subandiyah, S., T. Inanami, Y. Kondo, M. Kobayashi, and S. Tsuyumo. 2000. Comparison of 16SrDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organism in Asia. *Plant disease.* 84:15-18.
14. Tirtawidjaja, S. 1983. CVPD penyakit yang sangat merusak jeruk. *J. Penel. dan Pengemb. Pert.* II(1):36-41.
15. _____ dan R. Suharsoyo. 1990. Penyakit CVPD merupakan bahaya laten bagi tanaman jeruk di Indonesia. *Dalam* S. Pawirosuwardjo, D. Sudarmadi, Harsono dan ES. Basuki (Eds.). *Perkembangan Tanaman Menuju Terwujudnya Pertanian yang Tangguh dan Kelestarian Lingkungan*. PT. Agricon. Jakarta. hlm.229-313.
16. Triwiratno, A.; M.E. Dwiastuti, and A. Supriyanto. 1999. Quick detection of Citrus greening by PCR Method with Specific and Universal primer. *Ind. J. Biotech.* 271-275

Lampiran 1

Ekstraksi DNA daun untuk PCR

1. Cacah 0,3 g tulang daun jeruk dengan silet sekali pakai, tambahkan 1 ml bufer ekstrak (10 mM Tris pH 8,0, 100 mM EDTA, 1% SDS) yang mengandung 0,25 mg proteinase-K).
2. Pindahkan pada ependorf baru dan diinkubasikan selama 2 jam pada 65°C.
3. Sentrifuse selama 15 menit pada 12.000 g.
4. Supernatan dicampur dengan 1 ml resin miniprep purifikasi DNA (Promega) dan divakum serta dibilas dengan isopropanol 80%, 2 kali.
5. DNA sampel dalam kolom dipindahkan pada ependorf baru kemudian ditambah dengan air panas (80°C) 2 kali 50 µl.
6. Sentrifuse selama 30 detik pada 16.000 g pada setiap penambahan air panas.
7. Hasil akhir, diperoleh 10 µl ekstrak DNA yang digunakan untuk PCR.

Amplifikasi liberobacter 16SRDNA dengan PCR

1. Menyiapkan larutan campuran untuk proses PCR yang terdiri dari masing-masing 0,5 mM tiap primer (OI1, OI2, OA1), 200 mM DNTP, 78 mM Tris HCl pH 8,8; 2 mM MgCl₂; 17 mM (NH₄)₂SO₄; 10 mM β-merkaptoetanol;

0,05% W1 detergen (Gibco BRL); 200 FI ml-1 BSA dan 2-5 U *taq* polymerase (Gibco-BRL).

2. Ambil 50 FI dari larutan campuran kemudian dimasukkan mesin PCR, *thermocycler* (Return Elmer Cetus) dengan program untuk amplifikasi DNA yang terdiri dari 35 siklus, masing-masing pada 92°C selama 40 detik, 72°C selama 90 detik.
3. Setiap proses disertai pembandingan dari *Liberobacter* sp. (kontrol positif) dan tanaman sehat (kontrol negatif).
4. Hasil proses PCR disebut PCR produk.

Analisis elektroforesis

1. Siapkan agarose 0,7% dalam bufer TAE (x) pH 8,0 (0,04 M Tris HCl; 0,02 M Sodium asetat; 0,001 M EDTA pH 7,8).
2. Loading 8 µl PCR produk yang telah ditambah dengan 2 µl BPB (*Bromophenol Blue*) dalam tiap lubang dan *running* dengan elektroforesis horisontal pada 80-100 volt, 175 mA.
3. Fragmen DNA yang terbentuk melalui *running* elektroforesis diwarnai dengan etidium bromid 100 µg/ml.
4. Pembacaan menggunakan Transiluminator ultra violet.