

**“BAKTERI *LIBEROBACTER ASIATICUM* MENYEBAR PADA TANAMAN JERUK
DENGAN BERBAGAI GEJALA SERANGAN PENYAKIT CVPD”**

Oleh: Dra I Gusti Ayu Diah Yuniti,MSi

ABSTRAK

Penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) merupakan penyakit terpenting tanaman jeruk. Mekanisme infeksi penyakit belum banyak diketahui, sehingga usaha-usaha pengendalian penyakit belum memadai. Pada penelitian ini kami mencoba mendeteksi penyebaran bakteri penyebab penyakit CVPD (*Liberobacter asiaticum*) dalam tubuh tanaman menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Liberobacter asiaticum* dideteksi hanya pada bagian tanaman yang menunjukkan gejala. Sedangkan pada tanaman yang terserang berat *Liberobacter asiaticum* terdeteksi keberadaannya pada seluruh bagian tanaman. Hasil penelitian ini memberi indikasi bahwa bakteri *Liberobacter asiaticum* pertama-tama berkembang dan menimbulkan gejala penyakit di tempat terjadinya infeksi dan bersamaan dengan waktu menyebar ke bagian tanaman lainnya melalui pembuluh phloem yang kemudian menimbulkan gejala di bagian-bagian tanaman lainnya. Hasil penelitian ini mematahkan hipotesis sebelumnya yang menyatakan bahwa bakteri *Liberobacter asiaticum* berakumulasi di akar dan kemudian menimbulkan gejala penyakit. Ditemukan pula bahwa ada bagian tanaman yang bergejala tetapi tidak terdeteksi adanya *Liberobacter asiaticum*, yang menunjukkan bahwa ada senyawa virulen yang dihasilkan oleh bakteri patogen dapat menyebar dan menimbulkan gejala penyakit, dibagian tanaman lainnya.

Kata Kunci: *PCR, Liberobacter asiaticum*

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Jeruk merupakan komoditi hortikultura penting di Bali, dan perkembangan usaha tani jeruk tersebut mengalami gangguan yang sangat mengkhawatirkan akibat adanya serangan penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) sejak tahun 1986. Pengamatan di lapangan menunjukkan tanaman yang terserang penyakit CVPD bervariasi dari pertanaman muda sampai dengan pertanaman yang telah berproduksi (Anonymous, 1996). Berbagai jenis tanaman jeruk yang dibudidayakan secara ekonomis diketahui peka terhadap serangan penyakit CVPD. Tanaman jeruk Garut dan jeruk Tejakula yang sangat terkenal, sekarang sudah sangat sulit ditemukan di lapangan dan walaupun ada ditemukan, sudah terinfeksi berat oleh penyakit CVPD. Dewasa ini belum ditemukan cara pengendalian penyakit CVPD ini secara baik, karena berbagai kendala yang masih dihadapi seperti

belum dapat dibiakkannya patogen penyebab penyakit secara individu pada media buatan, sehingga sulit untuk melakukan karakterisasi terhadap sifat-sifat patogennya. Akibatnya sulit untuk mengetahui mekanisme infeksi tanaman oleh patogen yang pada akhirnya sulit untuk merumuskan teknik pengendaliannya.

Penyebab penyakit CVPD ini adalah bakteri Gram negatif yang diberi nama *Liberobacter* (Sandrine, *et al.* ;1996). Sebelum penemuan ini, penyebab penyakit CVPD pernah diperkirakan sebagai virus atau mikoplasma. Sesuai dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, penelitian tentang penyebab penyakit CVPD dilakukan dengan lebih intensif, diketahui bahwa penyebab penyakit CVPD, lebih merupakan organisme menyerupai bakteri (BLO). Pada tahun 1996, tim peneliti dari Perancis, menemukan bukti baru yang menunjukkan bahwa penyebab penyakit CVPD adalah bakteri (Sandrine *et al.* ; 1996).

Penyebaran penyakit ini, dilakukan terutama oleh serangga vektor, *Diaphorina citri* (Tirtawidjaya, 1981). Namun melihat pola penyebaran penyakit dilapangan dicurigai ada faktor lain yang berperan dalam penyebaran penyakit, seperti penggunaan bibit tanaman terinfeksi penyakit, kesehatan tanaman yang kurang baik, dan kemungkinan adanya vektor serangga lain selain *Diaphorina citri*. Karena itu karakterisasi penyebab penyakit dan interaksinya, baik dengan serangga vektor maupun dengan tanaman menjadi faktor yang sangat penting untuk diteliti, sehingga mekanisme infeksi dan penyebarannya dapat diketahui dengan lebih baik.

Pengetahuan tentang interaksi patogen tentang penyebab penyakit CVPD dengan tanaman belum banyak terungkap. Belum ada publikasi penelitian yang mengungkapkan mekanisme infeksi penyakit CVPD. Semua tanaman jeruk budidaya peka terhadap serangan penyakit CVPD. Penelitian di India menunjukkan bahwa diantara jenis-jenis tanaman jeruk budidaya yang diuji ketahanannya terhadap serangan penyakit CVPD, hampir semua sampel menunjukkan gejala serangan (Nariani, 1981). Namun demikian ditemukan ada beberapa jenis tanaman kerabat tanaman jeruk, seperti limau manis, limau tidak berbiji dan jeruk kinkit, mempunyai tingkat ketahanan yang baik terhadap serangan penyakit CVPD. Ketahanan atau toleransi suatu tanaman terhadap penyakit tertentu diatur pada tingkat genetik yaitu adanya produk dari satu atau beberapa gen yang sanggup menolak atau menghambat infeksi oleh patogen. Hal ini memberi indikasi bahwa ada

materi genetik yang memberikan ketahanan terhadap CVPD yang dimiliki oleh tanaman jeruk toleran tetapi tidak dimiliki oleh tanaman jeruk yang peka seperti jeruk keprok Tejakula.

Karenanya karakterisasi terhadap jenis-jenis tanaman yang tahan ini menjadi penting untuk diteliti, terutama menyangkut aspek genetiknya (molekuler genetik).

1.2. Permasalahan

Mekanisme infeksi dan penyebaran bakteri *L.asiaticum* pada tanaman yang terserang penyakit CVPD belum diketahui dengan jelas, sehingga formulasi cara penanggulangan penyakit CVPD belum dapat ditentukan dengan baik.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui penyebaran patogen bakteri *Liberobacter* pada tanaman jeruk menggunakan metode PCR (Polymerase Chain Reaction) yaitu reaksi polimerase berantai dengan mengamplifikasi fragmen 16 SrDNA dari bakteri *L. asiaticum*. Dengan mengetahui pola penyebaran bakteri patogen CVPD dalam tubuh tanaman pada berbagai atau beberapa tingkat gejala serangan, akan dapat digunakan untuk merumuskan model mekanisme infeksi penyakit CVPD pada tanaman jeruk, yang pada gilirannya akan memberi informasi yang lebih baik bagi usaha – usaha penanggulangan penyakit CVPD.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk

Tanaman jeruk merupakan komoditas buah – buahan terpenting di Indonesia setelah pisang dan mangga yang tersebar luas di beberapa sentra pengembangan jeruk seperti di Bali, Kalimantan Barat dan lainnya. Pada tahun 1986 luas areal tanaman jeruk ini cenderung menurun terutama karena serangan penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*). Kerugian akibat serangan penyakit ini pada tahun 1984 untuk propinsi Bali saja, diperkirakan mencapai Rp 36 milyar yang terutama sekali dirasakan oleh para petani di sentra – sentra jeruk yang mengandalkan penghasilannya dari komoditas jeruk ini.

Selanjutnya dikatakan tanaman jeruk Garut yang sangat terkenal itu, dewasa ini sudah sangat sulit ditemukan, karena jauh sebelum serangan berat CVPD yang melanda sentra-sentra jeruk di daerah lain, Jawa Barat mengalami musibah ini terlebih dahulu. Penyebaran penyakit ini lebih banyak disebabkan oleh penyebaran bibit tanaman jeruk yang telah terinfeksi oleh patogen penyakit CVPD.

Gejala yang khas dari serangan penyakit ini adalah pada daun terlihat daun menjadi menguning dengan tulang-tulang daun menjadi lebih hijau dan pada serangan lanjut daun-daun tanaman tidak dapat berkembang dengan baik sehingga menjadi kecil-kecil. Sedangkan pada buah,, akibat infeksi patogen CVPD ini, buah menjadi kecil-kecil dan keras serta kulit buah menjadi cepat menguning.

Tanaman yang terserang CVPD daunnya mengalami klorosis. Gejalanya menyerupai defisiensi unsure nitrogen , seng , mangan , dan zat besi. (Setiawan dan Trisnawati, 1999).

Gejala luar yang tampak di antaranya adalah sebagai berikut :

- a. Daun menguning atau klorosis, dan warna tulang daun menjadi lebih tua. Makin pucat daunnya, makin jelas tulang daunnya.
- b. Daun menjadi lebih tebal dan kaku, biasanya menjadi kecil.
- c. Pertumbuhan tanaman menjadi terhambat dan tanaman yang masih muda menjadi kerdil.
- d. Tanaman jeruk yang daunnya menguning, perlu dicurigai sudah terserang CVPD. Namun perlu diketahui bahwa tanaman jeruk yang telah terserang virus tristeza tulang daunnya menjadi pucat. Tetapi gejala penyakit CVPD ada khasnya , yakni tulang daun berwarna lebih gelap (hijau tua).

Serangan CVPD juga menyebabkan floem tulang daun menjadi rusak karena sel-sel parenkimnya mengalami hiperplasia. Di dalam sel-sel daun terjadi penimbunan butir-butir zat pati secara berlebihan.

Gejala yang khas dari serangan penyakit ini adalah seperti terlihat pada Gambar 1. Gejala pada daun, terlihat daun menjadi menguning dengan tulang daun menjadi lebih hijau dan pada serangan lanjut daun tanaman tidak dapat berkembang dengan baik sehingga menjadi kecil-kecil. Beberapa gejala sangat mirip tetapi masih bisa dibedakan satu sama yang lain. Pada gambar 1b ditemukan hampir pada semua spesies jeruk atau

yang genusnya sama dan ditemukan di berbagai daerah. Penyebab perbedaan ini belum diketahui, kemungkinan disebabkan oleh perbedaan strain patogen, spesies jeruk, lokasi dan umur tanaman (Wirawan, *et al.*, 2000).



2.2. Penyebab Penyakit CVPD

Penyakit CVPD yang juga disebut “citrus greening” atau “Huanglongbing”, (dari bahasa Cina) pada awalnya diduga disebabkan oleh virus (Tirtawidjaya, *et al.*, 1965; Tirtawidjaya, 1980; Chen and Mei, 1965), kemudian karena pengembangan penelitian pada penyakit ini, dikatakan disebabkan oleh *mycoplasma-like organism* (MLO). Tetapi organisme yang diduga MLO ini segera diketahui dibungkus oleh dinding setebal 25nm yang jauh lebih tebal dari unit membrane yang khas untuk MLO yaitu antara 7 – 10 nm (Sandrine, *et al.*, 1994). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa membrane setebal 25 nm itu merupakan membrane bakteri yang member indikasi bahwa penyebab penyakit CVPD adalah bakteri dan bukan mikoplasma. Organisme yang sama seperti yang ditemukan pada CVPD ini juga ditemukan pada tanaman selain jeruk pada lebih dari 20 jenis penyakit (Greber and Gownalock, 1979; Holmes, *et al.*, 1972; Klein, *et al.*, 1979; Nourrisseau, *et al.*, 1993). Sejauh yang diketahui, organism-organisme ini selalu berada dalam jaringan floem, dan tidak satupun yang dapat dibiakkan pada media buatan. Mengambil persamaan dengan MLO, organism-organisme ini kemudian disebut BLO (*bacterium-like organism*) (Sandrine, *et al.*, 1994).

Pada tahun 1993 Villechanoux, *et al.*, berhasil mengklon dan mensekuen 2,6 kb fragmen DNA dari genom BLO yang diisolasi dari tanaman jeruk terserang CVPD. Ditemukan bahwa fragmen ini mengandung *conserved sequence* dari *rplKAL-rpoBC* operon yang menyandi pembentukan empat ribosomal protein. Dengan penemuan ini, Sandrine, *et al.*, pada tahun 1994, dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

mencoba mengaplifikasi fragmen 16S rDNA dari BLO yang diisolasi dari tanaman jeruk (var. Poona) yang terserang penyakit CVPD menggunakan universal primer. Pada tahun 1996 Sandrine, *et al.*, melaporkan bahwa mereka telah berhasil mengembangkan satu primer yang spesifik dari 16S rDNA tersebut untuk mendeteksi patogen penyebab penyakit CVPD dan sejak itu disimpulkan bahwa penyebab penyakit CVPD adalah bakteri yang mereka beri nama *Licthobacter* (Sandrine, *et al.*, 1996). Ditemukan dua species yaitu *L. asiaticum* yang tersebar di kawasan Asia termasuk Indonesia dan *L. africanum* yang tersebar di kawasan Afrika.

2.3. Vektor Serangga *Diaphorina citri* dan Tanaman Inang

Patogen bakteri penyebab penyakit CVPD diketahui disebarkan oleh serangga sejenis kutu loncat atau juga disebut kutu loncat jeruk yang bernama *Diaphorina citri* Kuw. Serangga ini berukuran relative kecil dan bias terbang. Bakteri CVPD (*Liberobacter*) dapat berada pada bagian mulut (stilet) dari serangga ini dan menular ke tanaman ketika serangga vektor mencucuk dan mengisap makanan dari tunas dan daun tanaman.

Serangga *D. citri* sebagai vektor pembawa bakteri *liberobacter* mempunyai potensi berkembang biak yang tinggi khususnya di dataran rendah dan periode penularannya (infective period) dapat berlangsung cukup lama sampai 90 hari. Serangga ini dapat bertelur sampai 800 butir dan telurnya dapat menetas setelah 3-5 hari kemudian serta setahun terdapat 9 generasi. Di daerah serangan CVPD serangga penular ini perlu dikendalikan, karena 100 ekor serangga *D. citri* yang mengisap cairan tanaman sakit sanggup menularkan ke seluruh areal pertanaman (Anonimus, 1996).

Serangga *D. citri* mempunyai banyak tanaman inang. Dilaporkan bahwa *D. citri* dapat ditemukan berasosiasi dengan lebih dari 1000 tanaman inang (Anonymous, 1996), sehingga sangat sulit dilakukan pengendaliannya. *D. citri* dapat menularkan bakteri *Liberobacter* tidak saja kepada tanaman jeruk, tetapi juga kepada tanaman-tanaman yang masih berkerabat dengan jeruk dan kepada tanaman-tanaman bukan jeruk, seperti tanaman tapak dara (periwinkle, *Vinca rosea*) (Tirtawidjaya, 1981). Namun diantara tanaman-tanaman inang *D. citri* tersebut ada beberapa tanaman tidak tertulari oleh *Liberobacter* sehingga kemudian diyakini sebagai tanaman inang yang toleran terhadap serangan penyakit CVPD. Diantaranya adalah limau Tahiti, limau tanpa biji (*C. aurantifolia*), jeruk

kinkit (*Triphasia aurantiola*), limau manis (*C. limetta* Risso), dan Karatachi (De lange, *et al.*, 1985; Nariani, 1981; Tirtawidjaya, 1981; Nozue, *et al.*, 1995). Sehingga kemudian untuk usaha pengendalian penyakit CVPD peneliti berharap banyak dari tanaman-tanaman toleran ini. De lange, *et al.*, 1985, mencoba melakukan breeding dengan teknik fusi protoplas untuk mendapatkan jenis tanaman jeruk budidaya yang toleran CVPD dari tanaman limau Tahiti (Tahiti lime).

2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Teknik reaksi polimerase berantai atau *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ditemukan oleh Kary Mullis pada pertengahan tahun 1980. Penemuan ini telah mengakibatkan perubahan sangat cepat di bidang genetika molekuler dan kemungkinan beberapa pendekatan baru mempelajari analisis gen (Watson, *et al.*, 1992).

PCR dapat menunjukkan secara pasti tentang replikasi DNA. Polimerase DNA menggunakan DNA utas tunggal sebagai *template* untuk pembentukan komplemen utas baru. Satu utas DNA dapat diproduksi dari utas ganda DNA dengan pemangasan singkat pada suhu mendekati titik didih. Polimerase DNA juga memerlukan bagian terkecil dari utas ganda DNA (primer) untuk memulai sintesis DNA. Oleh karena itu titik awal sintesis DNA dapat dispesifikasikan dengan mengaitkan primer oligonukleotida pada titik awal tersebut. Hal ini merupakan rangkaian pertama yang penting pada PCR dimana polimerisasi DNA dapat langsung disintesis pada daerah DNA yang spesifik.

Kedua utas DNA dapat digunakan sebagai *template* untuk sintesa primer oligonukleotida yang disuplai untuk masing-masing utas. Untuk PCR primer tersebut dipilih pada daerah tengah DNA yang bias diamplifikasi untuk sintesis utas baru DNA yang dimulai dari masing-masing primer berlanjut ke posisi primer pada utas berlawanan. Oleh karena itu lokasi ikatan primer yang baru diturunkan ke masing-masing sintesa utas DNA yang terakhir. Campuran reaksi tersebut dipanaskan lagi untuk memisahkan antara utas yang asli dengan utas yang baru. Lalu digunakan untuk siklus hibridisasi primer selanjutnya, sintesa DNA dan pemisahan utas. Hasil akhir PCR adalah utas yang diakhiri oleh siklus n.

PCR merupakan teknik laboratorium yang relatif maju, karena teknik tersebut sangat beraneka ragam dan aplikasinya sangat luas. Materi awal PCR adalah DNA yang

mengandung rangkaian yang telah diamplifikasi. Jumlah DNA yang diperlukan untuk PCR sangat sedikit.

DNA untuk PCR sudah merupakan total DNA dari sel-sel. PCR tidak memerlukan pemurnian DNA dan DNA yang diekstraksi dengan pemanasan sel dapat digunakan langsung tanpa pemurnian. PCR juga dapat digunakan untuk studi pola ekspresigen : mRNA dikonversi menjadi cDNA memerlukan enzim reverse transcriptase dan cDNA kemudian dipakai sebagai template PCR. Rangkaian DNA harus tidak diisolasi sebelum diamplifikasi oleh PCR karena spesifikasi dari reaksi ditentukan oleh primer (Watson, *et al.*, 1992).

Untuk menghasilkan produk PCR yang spesifik, maka primer yang digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan yaitu: harus bersifat komplementer pada satu spesifik site pada DNA *template*, mempunyai kandungan G/C 40 – 70%, mengandung 14 – 40 nukleotida, tidak ada urutan yang komplementer antara ujung 3' masing-masing primer, sehingga tidak terbentuk primer dimer yang secara signifikan mengurangi sensitifitas dan spesifitas produk PCR (Boehringer, 1995).

Beberapa penelitian dengan PCR untuk mendeteksi *Liberobacter* patogen CVPD sudah dilakukan oleh J. Sandrine, J.M. Bove dan M. Garnier tahun 1996 dimana pada penelitian tersebut telah berhasil dideteksi dua spesies *liberobacter* yaitu *L. asiaticum* dan *L. africanum*. Wirawan dan Siti Subandiyah (2000) telah pula melakukan penelitian tentang interjunction sekuen antara 16S rDNA dan 23S rDNA pada *L. asiaticum*, yang menunjukkan bahwa *L. asiaticum* selalu berasosiasi dengan penyakit CVPD dan karakterisasi terhadap patogen CVPD ini secara bertahap dapat dilakukan sehingga member pemahaman yang semakin baik terhadap penyakit CVPD pada tanaman jeruk.

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Isolasi Total DNA Tanaman Jeruk

Pada prinsipnya cara ini adalah menggunakan prosedur dari Rogers dan Bendich, 1991. Potongan tulang daun dari 2 – 3 helai daun tanaman jeruk dipotong-potong kecil lalu ditaruh di dalam mortal dan disimpan selama 30 menit dalam lemari berpendingin -80°C. Potongan tulang daun tersebut kemudian dihancurkan sampai halus dan disuspensasi 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% Mercaptoetanol. 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 chloroform : 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.

3.2. 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. Program PCR yang digunakan adalah:

- I. Pre-treatment pada suhu 92°C selama 30 detik dengan satu siklus ulangan.
- II.
 - 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
- III. Extension pada suhu 72°C selama 90 detik dengan satu siklus ulangan.

3.3. Elektroforesis Gel Agarose

Gel agarose yang digunakan adalah 0,8% atau 1% tergantung ukuran DNA yang dielektroforesis. Buffer untuk elektroforesis digunakan TAE buffer yang mengandung 40

mM Tris-acetate, pH 7.9 dan 2 mM sodium EDTA. Elektroforesis dilaksanakan pada 100V selama 1 – 2 jam (Sambrook, *et al.*, 1989).

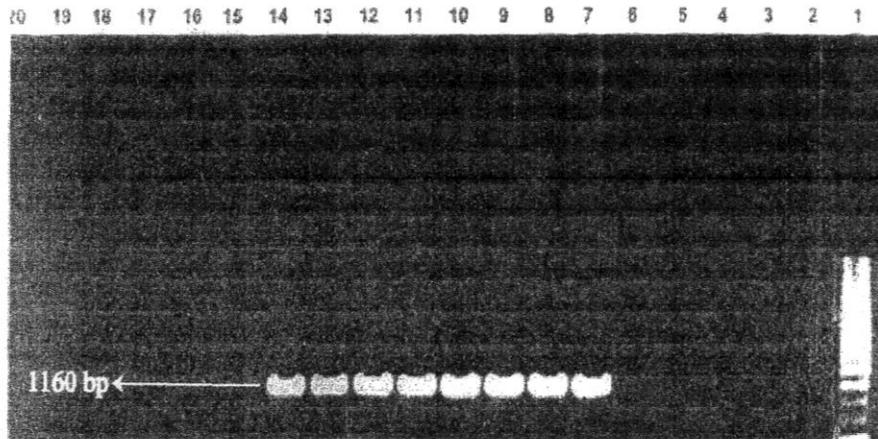
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Analisis PCR

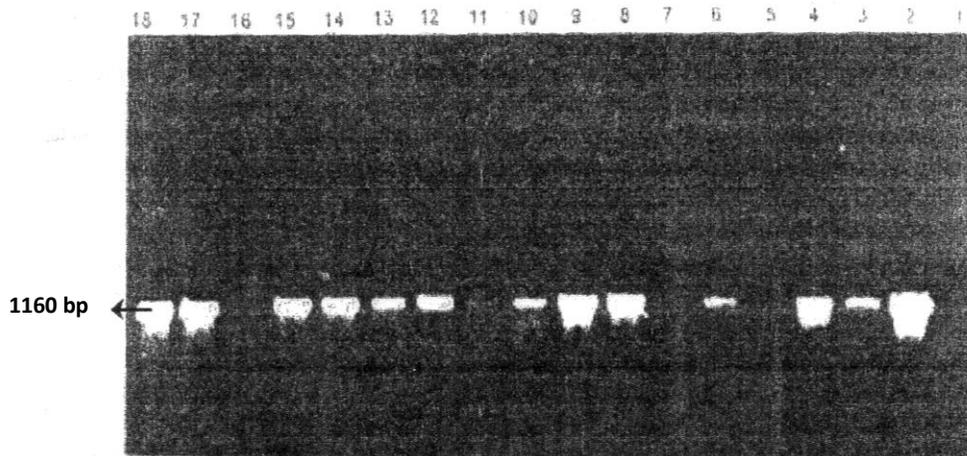
Analisis PCR terhadap DNA yang diisolasi dari sampel tanaman yang bergejala penyakit CVPD menunjukkan bahwa pertama, delapan dari dua puluh sampel tanaman yang menunjukkan gejala CVPD mengandung bakteri *Liberobacter*. Kedua, patogen penyebab penyakit CVPD di Bali adalah bakteri *Liberobacter asiaticum* karena keberadaan bakteri ini terdeteksi dengan primer 16S rDNA yang merupakan *conserved sequence* (sekuen yang harus ada) pada prokaryot dan sekuen primer yang digunakan pada penelitian ini spesifik untuk deteksi *Liberobacter asiaticum* yang dapat membedakan antara sekuen 16S rDNA pada mitokondria dan kloroplas tanaman.

Analisis PCR menunjukkan bahwa bakteri *Liberobacter* pada tanaman yang bergejala ringan dan sedang ditemukan hanya pada tulang daunnya, sedangkan pada tanaman dengan gejala berat ditemukan pada tulang daun, kulit cabang, kulit batang dan kulit akat (Gambar 3a).

Pada tanaman yang tidak bergejala (sehat) tidak ditemukan bakteri *Liberobacter*. Tanaman yang tidak bergejala secara visual, kemungkinan bakteri tersebut telah ada pada tanaman dan dapat dibuktikan dengan analisis PCR. Dalam penelitian ini secara molekuler tidak ditemukan bakteri (Line 16 – 20), jadi tanaman tersebut bebas patogen CVPD.



Gambar 3a. Deteksi sebaran bakteri patogen CVPD (*L. asiaticum*) pada berbagai sample tanaman. Lanes : 1. DNA marker, 2. DNA dari akar tanaman dengan gejala ringan, 3. akar tanaman dengan gejala sedang, 4. akar tanaman dengan gejala berat, 5. DNA dari kulit batang tanaman gejala ringan, 6. kulit batang tanaman gejala sedang, 7. batang gejala berat, 8. DNA tulang daun (td) bergejala ringan, 9. td gejala ringan, 10. td gejala sedang cabang lainnya, 11. td gejala berat, 12. td gejala berat lain, 13. cabang dekat gejala berat, 14. akar pada tanaman dengan gejala menyeluruh, 15. biji dari tanaman dengan gejala berat dan menyeluruh, 16. batang tanaman sehat, 17. cabang sehat, 18. ranting tanaman sehat, 19. td tanaman sehat, 20. akar tanaman sehat.



Gambar 3b. Deteksi serangan penyakit CVPD pada beberapa tanaman jeruk (tulang daun) dari beberapa lokasi. 1 – 7. beberapa lokasi di Langkan; 8 – 15. beberapa lokasi di Susut (Kayuamba); 16 – 18. dari beberapa lokasi di Pukuh.

Pada tanaman dengan gejala ringan kemunculan bakteri ditemukan hanya pada tulang daun (Line 8). Bagian selanjutnya sampel DNA yang diisolasi dari cabang dan akar tidak menunjukkan pada gel elektroforensis (Line 5, 2). Hal ini menunjukkan bakteri belum tersebar sampai ke cabang maupun batang dan akar.

Pada gejala sedang ditemukan hanya pada tulang daun (Line 9), bagian lainnya seperti cabang, batang, akar tidak ditemukan bakteri *Liberobacter*. Hal ini menunjukkan bahwa pergerakan bakteri belum sampai ke cabang, batang, maupun akar, karena bakteri memerlukan waktu untuk berkembangbiak dan bergerak mengikut aliran floem. Penyebaran/perkembangan penyakit CVPD pada fase ini lebih ditentukan oleh transmisi bakteri oleh *D. citri*.

Untuk tanaman dengan gejala berat, bakteri *liberobacter* ditemukan pada tulang daun, kulit cabang, kulit batang, dan kulit akar (Line 11, 13, 7 dan 14). Hal ini mengindikasikan bahwa pergerakan bakteri sudah menyebar ke seluruh bagian tanaman sehingga semua cabang, batang, dan akar sudah terinfeksi.

Analisis PCR terhadap sampel DNA yang diisolasi dari biji pada tanaman dengan gejala berat menunjukkan hasil yang negative (Line 15). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pergerakan bakteri tidak dapat mencapai biji. Gejala infeksi patogen CVPD pada buah menjadi kecil-kecil, daging buah tak berair dan berubah warna. Hal ini disebabkan oleh karena terganggunya fotosintesis oleh bakteri, sehingga aliran fotosintat ke buah menjadi terganggu sehingga menimbulkan kerusakan pada buah.

Untuk tanaman dengan semua tingkat gejala serangan, kecuali yang sehat, bakteri selalu ditemukan pada daun. Ini membuktikan infeksi awal bakteri adalah di daun. Infeksi ini dilakukan oleh vektor penyakit yaitu *Diaphorina citri* yang menyukai daun muda sehingga infeksi awal bakteri tersebut terjadi pada daun.

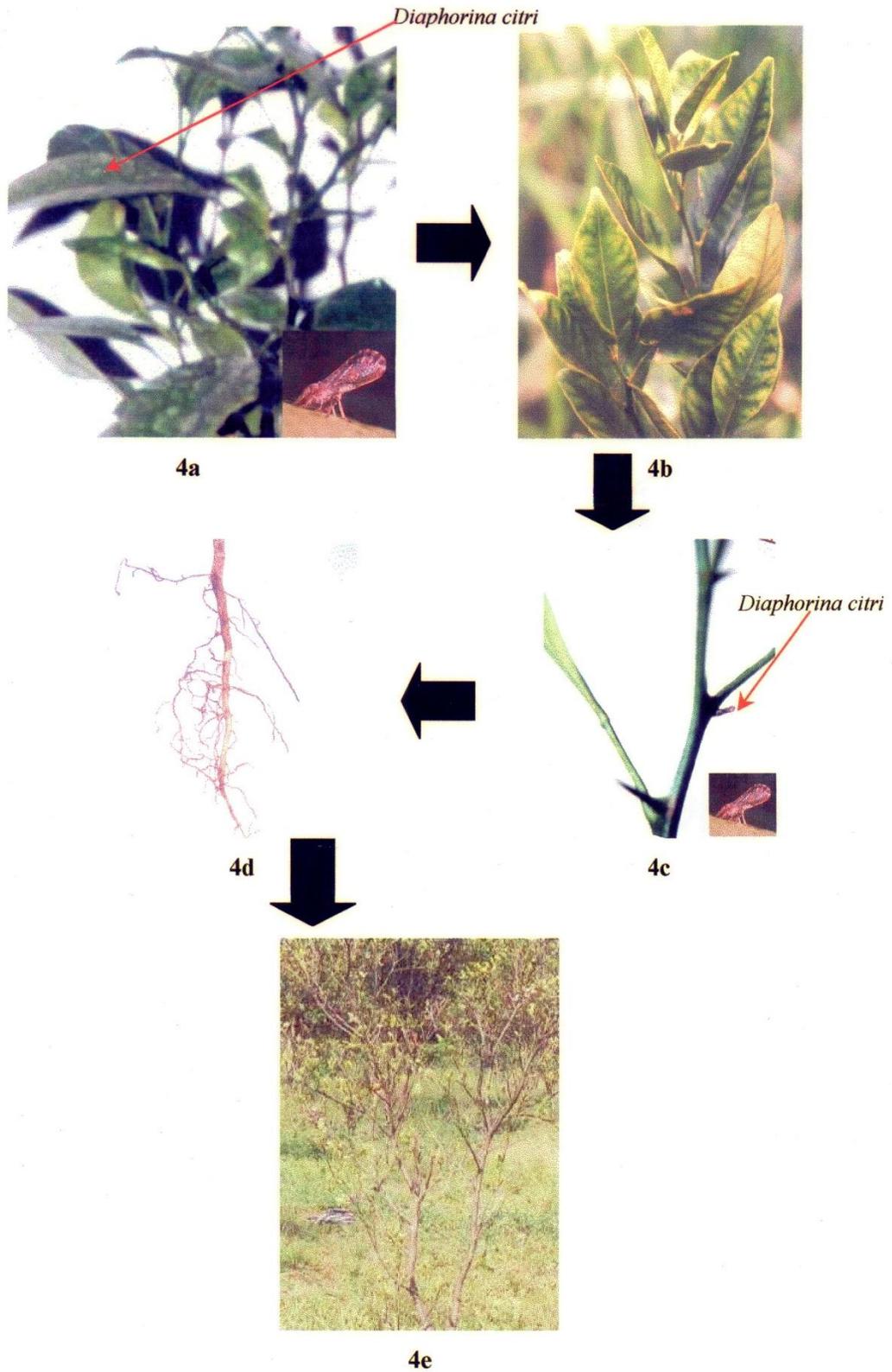
Dari penelitian ini dapat dikemukakan bahwa bakteri *Liberobacter* menyebar secara menyeluruh ke bagian tanaman pada tingkat gejala serangan berat, sedangkan tanaman pada gejala ringan dan sedang, bakteri *Liberobacter* belum menyebar ke bagian cabang, batang dan akar, karena kemungkinan pergerakan bakteri mengikuti aliran pembuluh phloem memerlukan waktu.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penyebab penyakit CVPD di Bali adalah bakteri *Liberobacter* dari species *asiaticum*, karena analisis PCR dilakukan menggunakan primer spesifik untuk *L. asiaticum*, dan vektor serangga yang ditemukan adalah *D. citri*. Sedangkan penggunaan primer spesifik untuk *L. africanum* member hasil yang negatif. Dari hasil penelitian ini ditemukan pula mekanisme penyebaran penyakit CVPD pada tubuh tanaman diawali secara partial yang dimulai dari sumber infeksi dan kemudian menyebar ke bagian tanaman lainnya mengikuti aliran pada pembuluh floem. Penemuan ini mematahkan hipotesis sebelumnya oleh peneliti Prancis, Sandrine, *et al.*, 1983 yang menyatakan bahwa dari sumber infeksi bakteri terakumulasi dan menyebar terakumulasi dan menyebar pada akar sehingga menghambat penyerapan unsure hara yang kemudian menyebabkan penyakit. Kenyataan yang ditemukan pada penelitian ini tidak terdapat akumulasi bakteri pada akar tanaman yang terserang penyakit CVPD.

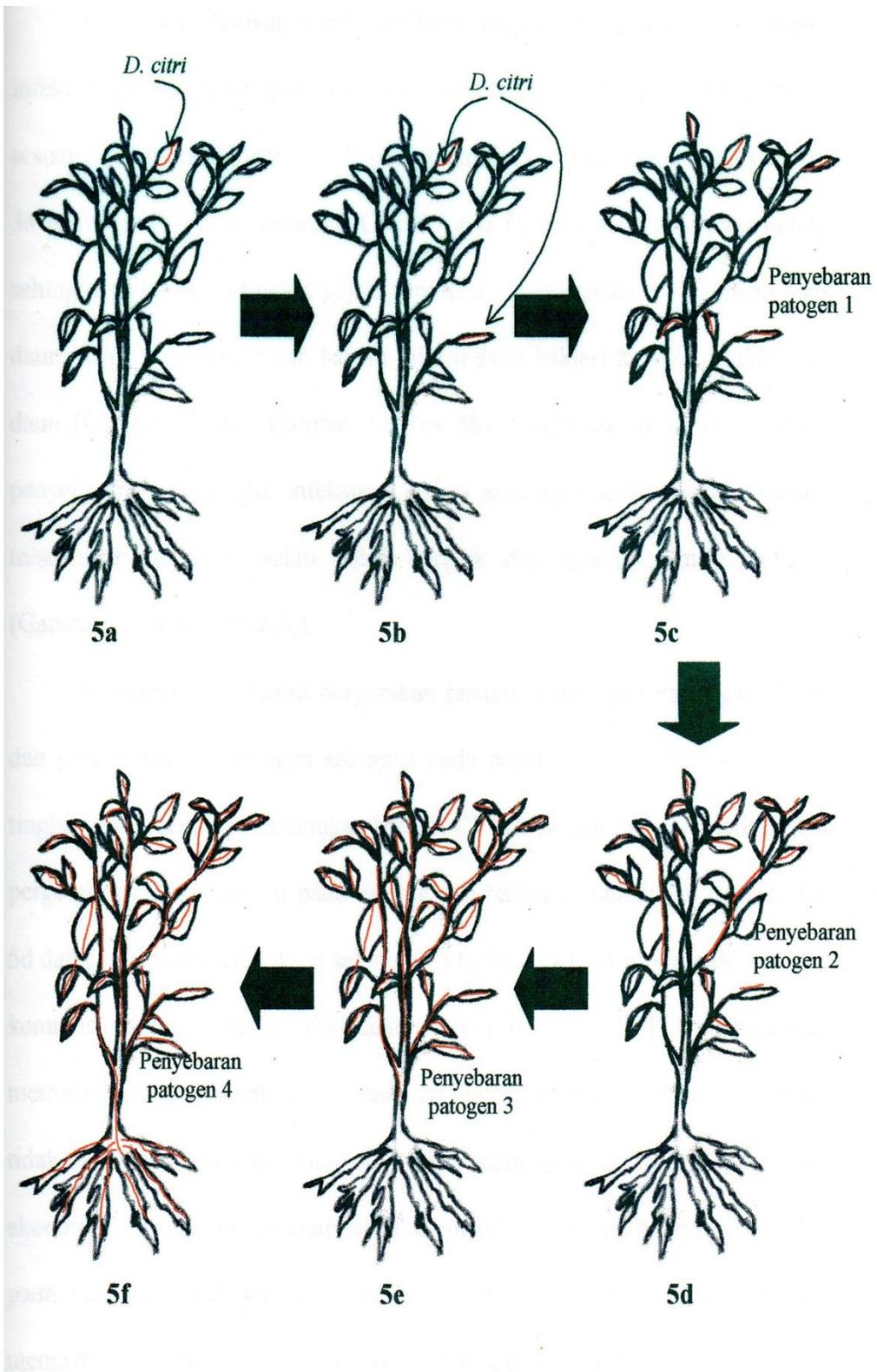
Gambar 3b menunjukkan beberapa deteksi serangan penyakit CVPD pada tanaman jeruk (tulang daun) dari berbagai lokasi. Di daerah Langkan bakteri dijumpai hanya pada line 2, 3, 4, dan 6. Sedangkan line 1, 5, dan 7 tidak ada bakteri. Line 8, 9, 1, 12, 13, 14, 15 bakteri dijumpai pada tulang daun di daerah Susut (Kayuamba), tetapi line 11 tidak menunjukkan band yang mengidentifikasi bakteri. Line 17, 18 menunjukkan bakteri, tetapi tidak pada line 16 di daerah Pukuh, Kabupaten Bangli. Gambar 3b menunjukkan bahwa ada hubungan antara lokasi pengambilan sampel dengan terjadinya penyakit CVPD.

Pada Gambar 3a dan Gambar 3b menunjukkan hal yang sama yaitu tidak pada semua bagian tanaman yang bergejala ditemukan bakteri *Liberobacter*. Gejala yang ditimbulkan kemungkinan disebabkan oleh senyawa virulen yang dihasilkan oleh bakteri di daerah infeksi yang menyebar ke bagian lain tanaman bersamaan dengan aliran fotosintat pada jaringan floem.

Penelitian ini telah membuktikan bahwa penyakit CVPD penyebarannya melalui pembuluh floem menyebar ke seluruh bagian tanaman, seperti terlihat dalam Gambar 4 dan Gambar 5 sebagai berikut:



Gambar 4. Model Mekanisme Infeksi CVPD Pada Tanaman Jeruk



Gambar 5. Skema Mekanisme Infeksi Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk

Untuk memberikan gambaran lebih lanjut tentang model mekanisme infeksi CVPD pada tanaman jeruk diuraikan dalam Gambar 4 dan Gambar 5, sesuai dengan hasil analisis PCR pada Gambar 3a. dijelaskan pada Gambar 3a bahwasanya vektor penyakit CVPD yaitu *D. citri* menyukai daun muda, sehingga pada segala tingkat gejala serangan bakteri tersebut daun. Hal ini membuktikan bahwa infeksi awal bakteri tersebut adalah pada daun (Gambar 4a dan Gambar 5a dan 5b). Gejala ini akan lebih lambat penyebarannya jika titik infeksi hanya satu atau sedikit karena bakteri tersebut memerlukan waktu untuk berbiak dan menyebar melalui floem (Gambar 4b dan Gambar 5c).

Serangan lebih lanjut pergerakan bakteri sesuai perkembangan waktu dan perkembangan serangga sehingga pada penelitian ini tidak pada semua tingkat gejala serangan ditemukan bakteri CVPD. Sesuai dengan analisis PCR pergerakan bakteri sampai pada cabang dan batang (Gambar 4c dan Gambar 5d dan 5e). Pergerakan bakteri selanjutnya terlihat pada akar (Gambar 4d), dan kemudian seiring dengan perjalanan waktu bakteri CVPD tersebut akan menyebar secara menyeluruh ke tanaman sehingga tanaman akhirnya menjadi tidak berfungsi, walaupun bias hidup akan tetapi tidak member hasil secara ekonomis. Gambar 4e dan Gambar 5f memperlihatkan gejala serangan CVPD pada tanaman jeruk secara menyeluruh sesuai dengan pergerakan bakteri menurut perkembangan waktu dan perkembangan serangga.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan uraian di atas maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Penyebaran penyakit CVPD terjadi secara bertahap, yang dimulai dari sumber infeksi dan kemudian menyebar ke bagian tanaman yang lainnya mengikuti aliran pada pembuluh floem.
2. Bagian tanaman yang bergejala pada satu tanaman ada yang tidak mengandung bakteri *Liberobacter* yang mengindikasikan bahwa ada senyawa toksik yang dihasilkan oleh bakteri dapat menyebar ke bagian-bagian tanaman dan dapat menimbulkan gejala penyakit.

5.2. Saran

Penelitian penyebaran bakteri *Liberobacter asiaticum* pada tanaman jeruk ini merupakan penelitian dasar untuk memahami mekanisme penyebarannya. Oleh karena itu penelitian lebih lanjut perlu dilakukan penyempurnaan terhadap metode penelitian agar dapat dipakai untuk mengetahui sifat-sifat bakteri patogen CVPD ini, termasuk senyawa virulen yang dihasilkannya untuk dipakai acuan dalam memformulasikan teknik pengendaliann yang efektif dan efisien.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous, 1996. Program Rehailitasi Jeruk di Bali. Laporan Pelaksanaan Jmpa Teknologi Pertanian Tanaman Pangan Tingkat Propinsi Bali.Tahun 1995/1996.
- Boehringer, 1995, Mannheim biochemical PCR Application Manual, Germany.
- Chen, Y.H., ad J.H. Mei. 1996. A Preliminary Study of Citrus Yellow Shoot Virus, Acta Phytpphylacica Sinica **4 (4)** : 361 – 366.
- De Lange, J.H., A.p. Vincent and M. Nel. 1985. Breeding for Resistance to Greening Disease in Citrus. The citrus and subtropical fruit journal. P. 6-9.
- Greber, R.S., and D.H. Gownnalock. 1979. Rickettsia-like Organism Associated with Two Yellow-type Disease of Stawberries in Queensland. Aust.J. Agric. Res. **30** : 1101 – 1109.
- Holmes, F.O., H. Hirumi, and K. Maramorosh. 1972. Witches Broom of Willow: Salix Yellows. Phytopathology, **62** : 826-828.
- Klein, M., S. Dabush, and Bar-Joseph. 1979. A. Preliminary Report of The Accurrence of Bacteria-like Organism in Both The Phloem and The Xylem Tissue of Stunted Melaleuca Armilarius Plants, Phytoparasitica, **7** : 169-175.
- Nariani, T.K. 1981. Integrated Approach to Control Citrus Greening Disease in India. Proc. Int. Soc. Citriculture. P. 471-472.
- Nourrisseaum, J.g., M. Lansac, and M. Garnier. 1993. Marginal Chlorosism a New Disease of Strawberries: Presence od the Bacterium-like Organism in the Phloem of Infected Plant. Plant Disease, **77** : 1055-1059.

- Nozue, NN. Yamada, and T. Arakawa. 1995. Selection of Citrus Relatives Tolerance to Greening Disease. *Bull. Fruit Tress. Res.*, **9** : 112-116.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Clonning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press., New York. Pp. 125-128.
- Sandrine, 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 Proteobacteria. *Journal of Systematic Bacteriology*, **44** : 370-386.
- Sandrine, J, J.M. Bove, and Garnier.1996. PCR Detection of The Two Candidatus Liberobacter Species Associated with Greening Disease of Citrus. *Moleculer and celluar probes*, **10** : 43-50.
- Sarwono, B.1986. *Jeruk dan Kerabatnya*, PT. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Setiawan,A.I. dan Yani Trisnawati. 1999. *Peluang Usaha dan Pembudidayaan Jeruk Silam*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Tirtawidjaya, S.,T. Hadiwidjaya, and A.M. LASHEEN. 1965. Citrus Vein Phloem Degeneration Virus,a Possible Cause of Citrus Chlorosis in Jawa. *J. Amer. Soc.Hort.,Sci.* **86**:235-243.
- Tirtawidjaya, S.1981. Insect,Dodder and Seed Transmissions of Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD). *Proc.Int.Soc.Criticulture* **1** : 469-471.
- Villechanoux, S., M. Garnier,F. Laigret, J. Renaudin, andJ.M. Bove. 1993. The Genom of the Non-cultured, Bacterial-like Organism Associated with Citrus Greening Disease Contains the nus G-rplKAJI-rpoBC Gene Cluster and the Gene for Bacteriophage Type DNA Polymerase. *Curr. Microbiol.* **26** : 161-166.
- Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowsky. 1992. *Recombinant DNA*. Sec.ed. Freeman, New York, USA.
- Wirawan, I G. P. dan S. Subandiyah. 2000. *Penelitian Aspek Biologi Molekul Penyakit CVPD Tanaman Jeruk*. Seminar Sehari Penghimpunan Fotopatologi Indonesia, Malang.