



Analisis Molekuler Bakteri *Liberobacter asiaticus* Penyebab Penyakit Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) pada Tanaman Jeruk Siam (*Citrus nobilis*)

Molecular Analysis of Bacteria *Liberobacter asiaticus* Causes Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) Disease Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique in Siam Orange (*Citrus nobilis*)

Ni Made Sudiyasih Parista^{1*}, Ketut Srie Marhaeni Julyasih¹, Ida Bagus Putu Arnyana¹

¹Jurusan Biologi dan Perikanan Kelautan, Universitas Pendidikan Ganesha

Jl. Udayana 11, Singaraja-Bali, Indonesia

Penulis Korespondensi:

Email: sudiyasih@undiksha.ac.id

*Penulis Korespondensi

Abstract

One of Indonesia's main fruit commodities is Siamese orange. However, many citrus plants in Indonesia are affected by Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) disease. The goal of the study was reassure *Liberobacter asiaticus* causes CVPD in symptomatic Siamese orange plants and whether it causes CVPD in asymptomatic Siamese orange plants. Molecular analysis of the *L. asiaticus* bacteria using PCR was done. By examining samples of sick and asymptomatic Kintamani Siamese orange plant leaves, an exploratory research design was employed. Orange leaf samples that were both sick and asymptomatic did not exhibit any DNA bands at 1.160 bp. The absence of *L. asiaticus* bacteria in samples of Siamese orange leaves that showed symptoms and no symptoms, perhaps as a result of low nutrient levels in the soil, low concentrations, or unequal bacterial dispersion in the leaf tissue. The study's conclusion was that samples of Siamese orange leaves with and without symptoms did not show signs of CVPD, despite the presence of the *L. asiaticus* bacteria causing the disease.

Keywords: 16S rDNA, chlorosis, CVPD, *Liberobacter asiaticus*, PCR.

Abstrak

Salah satu komoditas buah utama Indonesia adalah jeruk Siam. Namun, banyak tanaman jeruk di Indonesia yang terkena penyakit Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi secara lebih pasti keberadaan bakteri *Liberobacter asiaticus* penyebab penyakit CVPD pada tanaman jeruk yang menunjukkan gejala klorosis dan juga keberadaan bakteri *L. asiaticus* penyebab penyakit CVPD pada tanaman jeruk yang tidak menunjukkan gejala klorosis. Untuk mencapai hal tersebut, teknik PCR akan digunakan untuk analisis molekuler bakteri *L. asiaticus*. Dengan mengamati sampel daun dari tanaman jeruk siam Kintamani yang menunjukkan gejala klorosis dan yang tidak menunjukkan gejala klorosis, maka metodologi penelitian eksploratif diterapkan dalam penelitian ini. Pita DNA pada 1.160 bp tidak ditemukan pada sampel daun jeruk yang diuji, baik pada sampel daun jeruk yang sehat maupun pada sampel daun jeruk yang terindikasi klorosis. Tanaman jeruk yang menunjukkan gejala klorosis tidak ditemukan bakteri *L. asiaticus* pada sampel daunnya. Hal ini mungkin disebabkan oleh kurangnya unsur hara di dalam tanah, konsentrasi bakteri yang rendah, atau distribusi bakteri yang tidak merata di dalam jaringan daun. Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah keberadaan bakteri *L. asiaticus* penyebab penyakit CVPD tidak dapat terdeteksi keberadaannya pada sampel daun jeruk siam yang bergejala dan tidak bergejala klorosis.

Kata kunci: 16S rDNA, CVPD, klorosis, *Liberobacter asiaticus*, PCR.

Disubmit : 2 Januari 2024 ; Direvisi : 3 April 2024 ; Diterima : 22 Mei 2024

Copyright© 2024. Ni Made Sudiyasih Parista, Ketut Srie Marhaeni Julyasih, Ida Bagus Putu Arnyana



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

How to Cite : Parista, N. M. S., Julyasih, K. S. M. & Arnyana, I. B. P. (2024). Analisis Molekuler Bakteri *Liberobacter asiaticus* Penyebab Penyakit Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) pada Tanaman Jeruk Siam (*Citrus nobilis*). Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati 9(2): 120-131.

Pendahuluan

Salah satu komoditas buah utama Indonesia adalah jeruk Siam (*Citrus nobilis*). Produksi buah jeruk Siam di Indonesia mencapai 2.444.518 ton pada tahun 2019, naik menjadi 2.593.384 ton pada tahun 2020, dan kemudian turun menjadi 2.401.064 ton pada tahun 2021 (Badan Pusat Statistik, 2021). Provinsi Bali adalah salah satu provinsi di Indonesia yang memiliki potensi untuk menanam jeruk Siam. Hasil panen buah jeruk Siam sering digunakan sebagai sarana dan prasarana untuk pelaksanaan upacara keagamaan, yang masing-masing menuntut penggunaan buah lokal. Salah satu kecamatan di Kabupaten Bangli, yaitu Kecamatan Kintamani, memiliki potensi yang cukup besar dalam hal produktivitas jeruk Siam di Bali. Produksi jeruk Siam di Kintamani cenderung mengarah pada penurunan selama beberapa tahun terakhir. Pada tahun 2020 produksi buah jeruk di Kabupaten Bangli mencapai 131.587 ton, lalu menurun menjadi 104.528 ton pada tahun 2021. Beberapa faktor yang mengakibatkan menurunnya hasil produksi buah jeruk Siam adalah iklim, cara pengolahan tanaman meliputi pemupukan dan pengairan, pengendalian hama dan penyakit (Yuniti, 2016).

Banyak tanaman jeruk Siam yang terkena penyakit yang dikenal sebagai *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD). Kasus serangan penyakit CVPD pertama kali tercatat di Vietnam, khususnya di Delta Mekong, di mana 70-79% tanaman terserang. Di Thailand, hampir 95% tanaman jeruk terserang penyakit ini, sedangkan di Indonesia sekitar tiga juta tanaman rusak antara tahun 1960-1970. Pada tahun 1984 di Afrika Selatan diketahui bahwa penyebab penyakit CVPD adalah bakteri dan berusaha diisolasi dengan berbagai macam medium. *Liberobacter asiaticus* merupakan bakteri penyebab penyakit CVPD yang menginfeksi dengan cara masuk ke dalam sel tanaman melalui penusukan serangga vektor *Diaphorina citri* Kuw. (Dwiastuti et al., 2003). Bakteri ini hanya tumbuh dan hidup di dalam jaringan floem. Akibatnya, sel-sel floem mengalami degenerasi dan menghambat tanaman dalam menyerap nutrisi. (Wirawan dan Julyasih, 2015).

Tanaman yang terinfeksi CVPD menunjukkan tanda-tanda menguning atau klorosis pada daunnya, meskipun tulang daun tetap berwarna hijau. Daun juga menebal dan menjadi lebih kaku. Meskipun deteksi visual mudah untuk dilakukan, tetapi pengamatan secara visual tidak memberikan hasil yang akurat karena gejala penyakit CVPD yakni klorosis mirip dengan gejala tanaman kekurangan unsur Zn dan Mn (Meitayani et al., 2014). Hasil amplifikasi dari visualisasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tidak menunjukkan adanya pita DNA pada 1.160 bp, meskipun beberapa sampel daun jeruk menunjukkan tanda-tanda klorosis yang mengindikasikan bahwa tidak ada bakteri *L. asiaticus* yang ditemukan pada sampel tersebut (Yuniti, 2016). Dengan menggunakan dua primer khusus dari sekuen DNA bakteri CVPD, teknik PCR dapat mengamplifikasi DNA secara *in vitro* pada sekuen 16S rDNA bakteri.

Penelitian Fitria et al. (2021) diketahui 90% dari 27 sampel tanaman jeruk di Desa Tebing Batu, Kecamatan Sebawi, Kabupaten Sambas, Provinsi Kalimantan Barat dinyatakan positif terinfeksi bakteri *L. asiaticus* penyebab penyakit CVPD. Hal ini mengindikasikan bahwa penyakit ini masih menyebar luas di seluruh Indonesia. Menurut Yuniti (2016) penyakit CVPD menyebar luas di desa Pangotan, Kabupaten Bangli yaitu dengan persentase serangan pada jeruk siam mencapai 70%. Melani et al. (2018) mengamati bahwa di Desa Mangguh, Kecamatan Kintamani, sampel yang menunjukkan berbagai gejala klorosis pada daun tanaman jeruk siam termasuk bakteri *L. asiaticus*. Penanganan penyakit CVPD yang bisa dilakukan oleh petani adalah hanya dengan cara penebangan, pembakaran, peremajaan tanaman jeruk dan pergiliran tanaman jeruk dengan tanaman lain. Terbatasnya alternatif penanggulangan dikarenakan oleh kurangnya pemahaman petani tentang penyakit CVPD (Putra et al., 2016).

Berdasarkan hasil penelitian lapangan pertama, banyak tanaman jeruk siam Kintamani yang masih menunjukkan gejala klorosis (Rahmawati et al., 2020). Oleh karena itu, analisis molekuler bakteri *L. asiaticus* dengan menggunakan teknik diperlukan untuk memastikan keberadaan bakteri penyebab CVPD pada tanaman jeruk yang menunjukkan gejala klorosis dan memastikan ketiadaan bakteri penyebab CVPD pada tanaman jeruk

yang tidak menunjukkan gejala klorosis. Hal ini disebabkan oleh distribusi bakteri *Liberobacter* yang tidak merata di seluruh komponen tanaman dan variasi konsentrasi bakteri di dalam tanaman. Berdasarkan hal tersebut, para peneliti tertarik untuk menggunakan teknik PCR untuk melakukan analisis molekuler terhadap bakteri penyebab penyakit CVPD pada tanaman jeruk siam Kintamani.

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Laboratorium Sumber Daya Genetik dan Biologi Molekuler di Universitas Udayana, Denpasar, merupakan tempat penelitian ini dilakukan. Pengambilan sampel daun jeruk siam dilakukan di perkebunan jeruk siam Kintamani. Penelitian ini dilaksanakan dengan alokasi waktu selama tiga bulan terhitung dari bulan Mei - Agustus 2023, dimulai dari tahap persiapan, observasi, sampai penyusunan skripsi.

Instrumen Penelitian

Tabung mortar, pestel, mikropipet, sentrifugasi, alat elektroforesis, tabung mikrosentrifugasi, tabung mikro, tabung mikro 2 ml, transluminator UV, penangas air, mesin PCR, kamera digital, timbangan analitik, alat

pusaran, freezer, dan microwave termasuk di antara alat yang digunakan. Bahan yang digunakan adalah sampel daun tanaman jeruk siam dari perkebunan jeruk siam di Kintamani. Bahan lain yang diperlukan: *Aquades*, *Plant DNA Extraction Kit (DNeasy® Plant Mini Kit)*, Ethanol 90%, ddH₂O, 1% *agarose*, *Forward Primer OI1 (5' GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG C 3')* dan *Reverse Primer OI2c (5' GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T 3')*, *ready mix* (campuran dNTP dan *Taq polymerase*), DNA gel *loading dye*, *HyperLadder™ 1000 bp* dan *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain-Biotium*.

Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksplorasi, dengan melakukan pengamatan pada sampel daun tanaman jeruk siam Kintamani yang menunjukkan gejala klorosis serangan penyakit CVPD di lokasi kebun jeruk yang tidak sehat dan pengumpulan sampel daun tanaman jeruk siam Kintamani yang tidak menunjukkan gejala klorosis serangan penyakit CVPD di lokasi kebun jeruk yang sehat.

Lokasi kebun tanaman jeruk yang tidak menunjukkan gejala klorosis berada di Desa Daup. Tanaman jeruk di lokasi ini banyak menghasilkan buah yang berwarna kuning dan oranye. Lokasi dan kebun tanaman jeruk yang tidak menunjukkan gejala klorosis ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 1. Lokasi dan Kebun Tanaman Jeruk yang Tidak Bergejala Penyakit CVPD

Prosedur Penelitian

Tahap persiapan meliputi pengumpulan satu lembar sampel daun secara acak yang mewakili tanaman jeruk siam Kintamani yang menunjukkan gejala klorosis dari lokasi kebun jeruk yang tidak sehat berada di desa Belantih dan satu lembar sampel daun secara acak yang mewakili tanaman jeruk siam Kintamani yang tidak menunjukkan gejala klorosis dari lokasi kebun jeruk yang sehat berada di desa Daup. Jarak antar kebun jeruk yang berada di desa Belantih dan di desa Daup adalah 3,9 km. Jarak antar kebun jeruk yang berjauhan menyebabkan penyebaran hama dari kebun yang bergejala ke kebun yang tidak bergejala tidak memungkinkan. Jarak yang jauh menyebabkan hama menjadi susah berpindah untuk menyerang tanaman dari satu kebun ke kebun lain.

a. Ekstraksi DNA Tanaman Jeruk (*DNeasy[®] Plant Mini Kit*)

- 1). Menghancurkan sampel daun jeruk sebanyak 20 mg sampai halus menggunakan mortar dan pistil.
- 2). Menambahkan 4 μ l RNase A dan 400 μ l *Buffer* AP1. setiap sepuluh menit, vortex dan inkubasi pada suhu 65° C selama sepuluh menit. RNase A dan *Buffer* AP1 tidak digabungkan sebelum digunakan.
- 3). Menambahkan 130 μ l *Buffer* P3. Mencampur dan menginkubasi sampel selama 5 menit di freezer. Disentrifugasi pada 14.000 rpm selama lima menit.
- 4). Dengan menggunakan mikropipet yang terdapat dalam tabung mikro 2 ml, supernatan dipindahkan ke *spin column QIAshredder*, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit.
- 5). Memindahkan *flow-through* ke tabung mikro baru tanpa mengenai pelet jika ada. Menambahkan *Buffer* AW1 per 1,5 volumenya, dan dicampur dengan menggunakan mikropipet.
- 6). Menuangkan 650 μ l campuran ke dalam tabung mikro 2 ml yang berisi *spin column DNeasy*. Aliran yang mengalir ditinggalkan. Sampel yang tersisa digunakan untuk mengulangi langkah ini.

7). Menempatkan *spin column* di dalam tabung mikro dua mililiter yang masih baru. menambahkan 500 μ l *Buffer* AW2, dan menyentrifugasi pada 14.000 rpm selama dua menit. Dengan berhati-hati agar kolom spin tidak bersentuhan dengan aliran, saya mengeluarkannya dari tabung mikro.

8). Memindahkan *spin column* ke tabung mikrosentrifugasi 2 ml yang baru.

9). Menambahkan 50 μ l ddH₂O untuk elusi. Menginkubasi sampel selama 5 menit pada suhu kamar (15°-25°C). Disentrifugasi pada 14.000 rpm selama satu menit. Langkah ini diulangi sekali.

b. Amplifikasi DNA dengan Teknik PCR

1). Mencampurkan ddH₂O, primer reverse OI2c, primer forward OI1, dan hasil ekstraksi DNA.

2). Menyiapkan tabung mikro dan master mix.

3). Mencampur sampel dengan ddH₂O, *Forward Primer* OI1, *Reverse Primer* OI2c, dan *ready mix*.

4). Campuran *master mix* (per volume reagensinya yakni, 1 μ l sampel, 9 μ l ddH₂O, 1,25 μ l *Forward Primer* OI1, 1,25 μ l *Reverse Primer* OI2c, dan 12,5 μ l *ready mix*) divortex dan disentrifugasi.

5). Menyiapkan dan mengatur alat PCR.

6). Amplifikasi DNA dengan program: Pre-denaturasi selama 30 detik dengan satu siklus pengulangan pada suhu 92° C. 40 siklus pengulangan digunakan pada bagian kedua:

- Denaturasi selama 60 detik pada suhu 92° C,
- *Annealing* selama 30 detik pada suhu 60° C, dan
- *Elongation* selama 90 detik pada suhu 72° C dan *extension* selama 90 detik pada suhu 72° C dengan 1 siklus ulangan.

c. Elektroforesis Gel Agarose dan Visualisasi Hasil PCR

1). Membuat gel agarose 1% dan membuat sumuran dan mendiampkannya sampai padat.

- 2). Merendam gel agarose dalam larutan *buffer*.
- 3). Menyiapkan alat elektroforesis.
- 4). Menyiapkan 3µl HyperLadder 1000 bp, 1µl DNA gel *loading dye*, 2µl *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain-Biotium* dan 3µl sampel.
- 5). Mencampurkan DNA gel *loading dye* dan *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain-Biotium* dengan sampel.
- 6). Menuangkan campuran ke dalam sumuran gel.
- 7). Menuangkan *HyperLadder* 1000 bp ke dalam sumuran gel.
- 8). Menghidupkan alat elektroforesis dan menunggu alat untuk bekerja selama ± 35 menit.
- 9). Mengatur transiluminator UV dan memeriksa posisi pita DNA setiap sampel. Mencatat hasil visualisasinya.

Teknik Analisis Data

Penentuan positif atau negatifnya keberadaan bakteri *Liberobacter asiaticus* penyebab penyakit CVPD pada sampel daun tanaman jeruk siam dilihat dari hasil visualisasi

PCR nya. Hasil visualisasi PCR menunjukkan adanya pita DNA pada 1.160 bp pada sampel daun jeruk yang positif terinfeksi CVPD (teridentifikasi adanya bakteri *L. asiaticus*). Tidak terdapat pita DNA pada 1.160 bp pada hasil visualisasi PCR untuk sampel daun jeruk yang negatif terinfeksi penyakit CVPD (bakteri *L. asiaticus* tidak ada).

Hasil dan Pembahasan

Tanaman Jeruk Siam yang Menunjukkan Gejala Klorosis

Berdasarkan pengamatan secara visual, gejala serangan penyakit CVPD bervariasi pada daun jeruk Selayar dan Siam. Tulang daun tetap berwarna hijau, daun menjadi lebih tebal dan kaku, serta muncul gejala klorosis sedang pada beberapa permukaan daun yang menguning pada bagian lamina. (Meitayani *et al.*, 2014). Daun yang melengkung dan daun kuning adalah dua tanda visual yang menonjol pada Gambar 1.



Gambar 2. Sampel Daun Jeruk Bergejala Penyakit CVPD



Gambar 3. Lokasi dan Kebun Tanaman Jeruk yang Menunjukkan Gejala Penyakit CVPD (Sumber: dokumentasi pribadi)



Gambar 4. Tanaman Jeruk yang Menunjukkan Gejala Penyakit CVPD



Gambar 5. Sampel Daun Jeruk yang Tidak Bergejala Penyakit CVPD



Gambar 6. Tanaman Jeruk yang Tidak Bergejala Penyakit CVPD

Kondisi lingkungan tanaman jeruk yang ber gejala klorosis ditemukan banyak tanaman liar yang tumbuh di kebun jeruk. Gejala klorosis setiap tanaman jeruk bervariasi. Lokasi dan kebun tanaman jeruk yang menunjukkan gejala klorosis ditunjukkan pada Gambar 2.

Beberapa tanaman menunjukkan tanda-tanda normal, dengan daun hijau dan tajuk normal, sementara yang lain menunjukkan

tanda-tanda klorosis parah, dengan daun kekuningan dan tajuk kerdil. Tanaman yang terinfeksi penyakit CVPD yang disebabkan oleh *Liberobacter asiaticus* memiliki kelainan fisiologis. Karena bakteri *Liberobacter asiaticus* menghambat pergerakan nutrisi, maka timbul masalah fisiologis. Bakteri menutupi jaringan floem, yang menyebabkan sel-sel floem mengalami degenerasi dan mencegah nutrisi

mencapai semua jaringan tanaman lainnya dari daun (Purwanto *et al.*, 2019) Tanaman jeruk yang menunjukkan tanda-tanda klorosis secara visual memiliki tajuk yang normal dan daun yang hijau, namun beberapa tanaman lainnya memiliki daun yang kekuningan dan tajuk yang kerdil. Tanaman jeruk yang bergejala klorosis juga menghasilkan buah yang tidak normal dan bahkan tidak ada. Tanaman jeruk yang menunjukkan gejala klorosis ditunjukkan pada Gambar 3.

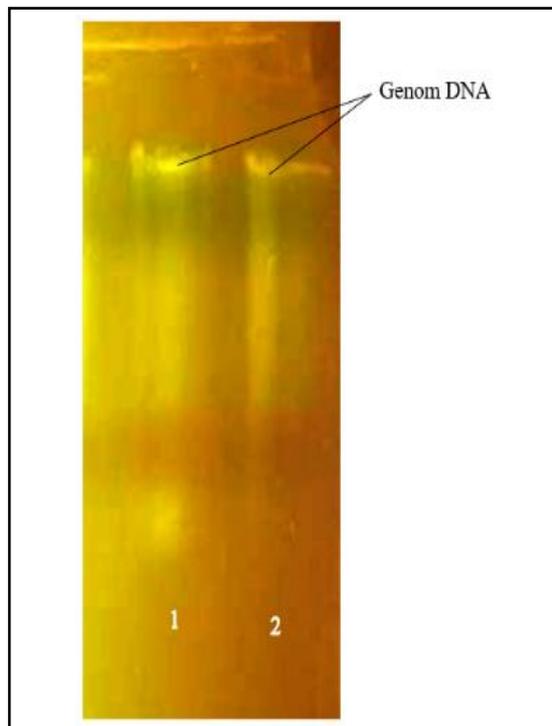
Tanaman Jeruk Siam Tanpa Gejala Klorosis

Gambar 4 mengilustrasikan ciri-ciri umum daun hijau yang terlihat pada sampel daun dari tanaman jeruk Siam yang sehat atau tidak bergejala. Helai daunnya halus, dengan tulang daun menyirip dan permukaan daun bagian atas yang licin, mengkilap, berwarna hijau tua yang mengandung lilin dan pektin. Pohon jeruk yang sehat memiliki buah kuning berukuran normal dan dedaunan hijau tanpa tanda-tanda klorosis. Tanaman jeruk yang tidak menunjukkan gejala klorosis ditunjukkan pada Gambar 6.

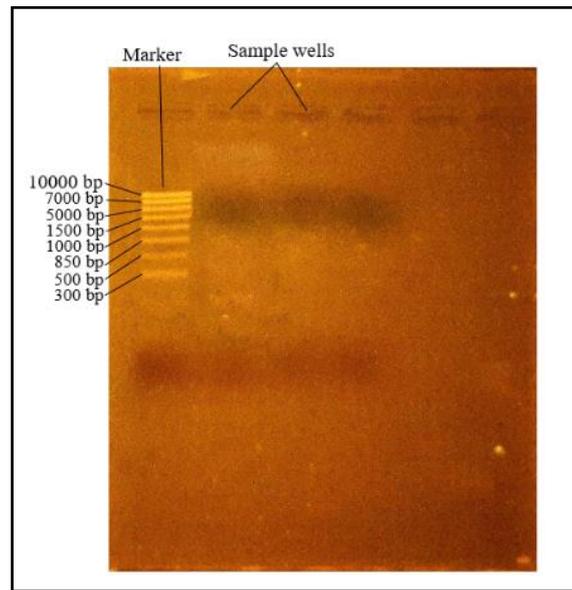
Hasil Metode PCR yang Digunakan untuk Menemukan Bakteri *Liberobacter asiaticus*

Penyebab Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk Siam Bergejala dan Tidak Bergejala Penyakit CVPD

Hasil genom DNA dari sampel tanaman jeruk siam yang bergejala dan tidak bergejala penyakit CVPD menunjukkan adanya pita DNA pada elektroforesis gel agarose 1%. Pita DNA yang tampak seperti noda menunjukkan bahwa ikatan antar molekul DNA telah pecah menjadi potongan-potongan kecil, sedangkan pita DNA yang tebal dan menyatu menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan semua DNA yang diambil dalam bentuk yang utuh. Selama proses ekstraksi, gerakan fisik atau kimiawi yang berlebihan dapat menyebabkan ikatan molekul terputus. Pengulangan sebanyak tiga kali dilakukan pada proses elektroforesis pada sampel untuk mendapatkan pita DNA total yang berkualitas sehingga selanjutnya bisa dilakukan visualisasi amplifikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan sekuen 16S rDNA dari bakteri *Liberobacter asiaticus*. Pada elektroforesis gel agarosa 1%, temuan DNA total dari sampel daun tanaman jeruk dengan dan tanpa klorosis menunjukkan adanya pita DNA (Gambar 7).



Gambar 7. Genom DNA daun jeruk. Keterangan: 1. Sampel Daun Jeruk yang Bergejala Penyakit CVPD, 2. Sampel Daun Jeruk yang Tidak Bergejala Penyakit CVPD.



Gambar 8. DNA total daun jeruk Siam. Keterangan: 1. Sampel Daun Jeruk yang Bergejala Penyakit CVPD, 2. Sampel Daun Jeruk yang Tidak Bergejala Penyakit CVPD.

Metode berbasis PCR memberikan beberapa keuntungan seperti deteksi cepat, seluruh prosedur dapat diselesaikan dalam waktu 6 jam. Sampel daun jeruk dengan dan tanpa gejala klorosis tidak menunjukkan adanya pita DNA dengan ukuran 1.160 bp pada hasil PCR, hal ini mengindikasikan bahwa bakteri *Liberobacter asiaticus* yang menyebabkan CVPD tidak terdapat pada kedua sampel tersebut. Gambar 8. menampilkan visualisasi hasil amplifikasi PCR DNA yang diperoleh dari sampel daun tanaman jeruk yang bergejala dan tidak bergejala klorosis.

Deteksi Keberadaan Bakteri Penyebab Penyakit CVPD Tanaman Jeruk Siam Bergejala Penyakit CVPD

Sampel daun jeruk dengan warna kuning (klorosis) dan tulang daun berwarna hijau, daun yang lebih kaku dan tebal, serta ukuran yang lebih kecil merupakan indikasi CVPD, menurut inspeksi mata. Gejala klorosis yang parah pada daun meliputi warna kuning di seluruh permukaan daun, urat berwarna hijau tua atau lebih gelap, dan struktur daun yang lebih kaku dan tebal. Dedaunan yang agak klorosis: permukaan daun tertentu menunjukkan klorosis, daun menebal, dan urat tampak lebih gelap. Gejala klorosis ringan menyebabkan daun menjadi kaku, urat-urat daun tampak tua, dan tampak hijau. Banyak tanaman liar ditemukan tumbuh subur di kebun jeruk dalam

kondisi lingkungan pohon jeruk yang menunjukkan indikasi klorosis. Tingkat kesehatan tanaman dipengaruhi oleh faktor lingkungan tertentu (Patandjengi *et al.*, 2023). Pada sebagian besar penyakit tanaman, total DNA yang diekstraksi dari jaringan tanaman yang terinfeksi merupakan prasyarat untuk PCR atau qPCR. Efisiensi ekstraksi DNA seharusnya berdampak langsung pada sensitivitas sistem PCR dan qPCR. Keberhasilan diagnosis PCR atau qPCR tidak hanya dipengaruhi oleh primer dan reaksi PCR itu sendiri, namun juga oleh efisiensi ekstraksi total DNA dari sampel (Yang *et al.*, 2021). Elektroforesis adalah metode yang digunakan untuk memisahkan fragmen DNA dan menentukan ukurannya dengan membandingkannya dengan ukuran panjang fragmen yang diketahui.

Dengan metode ini DNA total yang telah dimurnikan diuji kualitasnya. DNA ladder di jalur pertama digunakan sebagai petunjuk untuk menentukan panjang pita yang terdeteksi di jalur sampel dan memvisualisasikan total DNA yang dimurnikan (Vucelić-Radović *et al.*, 2019). Pita DNA merupakan tanda bahwa DNA tanaman telah diekstraksi dengan baik. Salah satu elemen yang paling penting dalam visualisasi proses amplifikasi DNA dengan metode PCR menggunakan sekuen 16S rDNA bakteri *Liberobacter asiaticus* adalah kualitas dan jumlah DNA total. Keberhasilan amplifikasi PCR bergantung pada kualitas dan

kuantitas total DNA yang dihasilkan dari proses ekstraksi DNA. Menurut Rustiani (2015), *L. asiaticus* telah tersebar di seluruh Asia, termasuk Indonesia, dan telah diidentifikasi dengan menggunakan primer untuk target gen 16S rRNA dalam teknik deteksi PCR. Teknik yang sama telah berhasil digunakan untuk mengidentifikasi *Liberibacter africanus* dan mendiagnosis penyakit CVPD di Afrika Selatan. Pada kedua spesies *Liberobacter*, ukuran amplikonnya sama (1.160 bp). Amplikon *Ca. L. asiaticus* berisi satu lokasi restriksi *Xba*I, dan menghasilkan dua fragmen (640 dan 520 bp) pada restriksi, sedangkan *Ca. L. africanus* mempunyai dua lokasi seperti itu, dan menghasilkan tiga fragmen (520, 506 dan 130 bp). Dengan menggunakan primer untuk target gen 16S rRNA dalam teknik deteksi PCR bisa untuk mengidentifikasi spesies *Liberobacter* yang terlibat.

Sekuen 16S rDNA dari bakteri *Liberobacter asiaticus* digunakan dalam metode PCR penelitian ini untuk memvisualisasikan amplifikasi DNA pada sampel daun jeruk siam yang terindikasi mengalami klorosis. Hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada pita DNA yang terlihat pada 1.160 bp. Tidak ditemukannya bakteri *L. asiaticus* pada sampel daun jeruk siam yang bergejala menunjukkan bahwa sampel daun jeruk siam yang bergejala tidak terserang CVPD. Tanaman jeruk yang menunjukkan gejala klorosis tidak memiliki bakteri *L. asiaticus* pada sampel daunnya. Hal ini mungkin disebabkan karena tanah yang kekurangan unsur hara, bakteri tidak terdistribusi secara merata atau terkonsentrasi, atau keduanya. (Rahmawati *et al.*, 2020). Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali untuk menghindari hasil “*false negative*” pada proses amplifikasi PCR yang menghasilkan hasilnya konsisten negatif. Modifikasi juga dilakukan dengan menggunakan *template* DNA (sampel daun) yang berbeda tetapi masih dari satu tanaman jeruk yang bergejala dengan menggunakan protokol yang sama.

Hal ini dikuatkan oleh Wirawan *et al.* (2017), yang menduga bahwa meskipun tidak semua sampel yang menunjukkan tanda-tanda klorosis menunjukkan temuan visualisasi infeksi *Liberobacter asiaticus*, semua sampel memiliki tingkat defisiensi nutrisi yang bervariasi, terutama pada unsur Zn dan Mn. Keterkaitan infeksi *L. asiaticus* dengan

defisiensi mineral yang dimana *L. asiaticus* yang memasuki sel floem dan berkembang biak di dalamnya dengan menggunakan karbon organik dan nitrogen sebagai sumber nutrisi. Kehadiran bakteri *L. asiaticus* di dalam sel memicu reaksi yang diawali dengan produksi protein virulensi (peroksida) yang mengganggu metabolisme sel floem. Tumbuhan juga memiliki protein spesifik yang bertindak sebagai reseptor protein virulensi dan kompleks yang dapat berinteraksi dengan domain membran protein saluran yang biasanya mengangkut ion anorganik ke dalam sel floem. Interaksi tersebut menurunkan fungsi protein saluran dan mengganggu proses transportasi beberapa ion anorganik terutama Zn dan Mn.

Klorosis adalah tanda kekurangan nutrisi atau toksisitas, yang merupakan reaksi tanaman yang diakibatkan oleh gangguan proses fisiologis. Tanaman yang tidak sehat umumnya menunjukkan gejala. Biasanya, perubahan morfologi yang menyimpang-seperti perkembangan yang lebih lambat atau perubahan warna dan bentuk daun-terjadi sebagai gejala. Gejala tanaman yang terlihat pada daunnya dapat memberikan indikasi yang jelas tentang kondisi nutrisi tanaman. (Inaya *et al.*, 2021).

Deteksi Keberadaan Bakteri Penyebab Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk Siam Tidak Bergejala Penyakit CVPD

Ashari (2018) mengamati bahwa sampel daun jeruk dari tanaman jeruk siam sehat yang tidak menunjukkan gejala klorosis mempunyai seluruh ciri-ciri daun sehat, antara lain berwarna hijau sempurna, mempunyai urat daun menyirip, warna hijau tua halus dan mengkilat, serta mengandung lilin dan pektin pada permukaan daun bagian atas. Kesehatan tanaman jeruk siam tetap terjaga di perkebunan jeruk siam karena tanaman jeruk siam tidak banyak tumbuh di sana dan mendapat nutrisi yang cukup. (Murtando *et al.*, 2016).

Hasil ekstraksi total DNA daun jeruk yang tidak bergejala klorosis menampilkan pita DNA. Kuantitas DNA total diperkirakan mengacu pada pita-pita DNA *ladder* yang diikutsertakan pada proses elektroforesis dengan DNA total sampel tumbuhan (Artati *et al.*, 2017). Hasil ini membuktikan bahwa penggunaan *kit* DNA dalam penelitian ini efektif menghasilkan DNA total dengan kuantitas dan kualitas yang baik (Widiyanti *et*

al., 2014). DNA yang kurang baik atau tidak jelas dapat dilihat dengan adanya *smear*, hal ini disebabkan karena adanya sisa-sisa etanol pada saat proses pengeringan pelet DNA serta kontaminasi sisa debris pada saat proses ekstraksi DNA (Sipangkar et al., 2020). Meskipun bakteri patogen penyebab penyakit CVPD cukup langka di jaringan tanaman, namun pendekatan PCR sangat sensitif dan dapat mengidentifikasinya. Pada sampel tanaman jeruk siam yang tidak menunjukkan tanda-tanda penyakit CVPD, hasil PCR negatif karena konsentrasi bakteri tidak teridentifikasi dan distribusi bakteri tidak merata. Sensitivitas dan spesifisitas metode PCR untuk memperkuat 16S rDNA dari strain *Liberobacter asiaticus* telah dievaluasi secara menyeluruh menggunakan primer yang digunakan dalam penelitian ini. Bakteri *L. asiaticus* tidak ditemukan pada sampel daun jeruk yang tidak menunjukkan gejala, berdasarkan temuan analisis PCR yang menunjukkan tidak adanya pita DNA pada 1.160 bp. Karena bakteri *L. asiaticus* tidak terdapat pada tanaman jeruk tanpa gejala klorosis, maka tanaman jeruk siam tanpa gejala klorosis merupakan tanaman jeruk siam yang sehat dan tidak terserang CVPD (Noer, 2021).

Hal tersebut didukung oleh Rustiani (2015) yang menyatakan bahwa bakteri *Liberobacter asiaticus* tidak ditemukan keberadaannya pada tanaman jeruk siam yang tidak menunjukkan gejala klorosis, berarti tanaman jeruk siam yang tidak menunjukkan gejala klorosis adalah tanaman jeruk siam yang sehat tidak terinfeksi penyakit CVPD. Menurut Rahmawati et al. (2020), pita DNA 1.160 bp tidak ditemukan pada daun tanaman jeruk sehat atau pada kelompok kontrol yang tidak menunjukkan tanda-tanda klorosis. Untuk menghentikan penyebaran penyakit yang dapat membahayakan produksi buah jeruk, penting untuk mengidentifikasi bakteri patogen penyebab penyakit CVPD.

Simpulan dan Saran

Berdasarkan temuan penelitian, dapat disimpulkan bahwa rangkaian 16S rDNA dari bakteri *Liberobacter asiaticus* tidak menunjukkan pita DNA pada 1.160 bp ketika divisualisasikan amplifikasi DNA pada sampel daun jeruk siam yang menunjukkan gejala

klorosis menggunakan teknik PCR. Oleh karena itu, sampel daun jeruk siam yang menunjukkan gejala klorosis tidak ditemukan terjangkit penyakit CVPD, begitu pula sampel daun jeruk siam yang menunjukkan gejala klorosis tidak ditemukan mengandung bakteri *L. asiaticus*. Sampel daun jeruk siam yang menunjukkan gejala klorosis tidak termasuk bakteri *L. asiaticus*; Hal ini mungkin terjadi karena tanah kekurangan unsur hara, konsentrasi bakteri rendah, atau penyebaran bakteri tidak merata di jaringan daun. Dengan menggunakan rangkaian 16S rDNA dari bakteri *L. asiaticus*, teknik PCR digunakan untuk memvisualisasikan amplifikasi DNA pada sampel daun jeruk siam yang tidak menunjukkan gejala klorosis. Hasil penelitian menunjukkan tidak terlihat adanya pita DNA pada 1.160 bp yang menunjukkan bahwa tidak ditemukan bakteri *L. asiaticus* pada sampel daun jeruk yang tidak menunjukkan gejala klorosis. Hal ini menunjukkan bahwa pohon jeruk siam tanpa tanda klorosis merupakan pohon sehat bebas penyakit CVPD. Sebagai kontrol, digunakan sampel daun tanaman jeruk yang sehat atau tidak menunjukkan tanda-tanda klorosis.

Petani disarankan untuk mengidentifikasi bakteri patogen penyebab penyakit CVPD sesegera mungkin untuk menghentikan penyebaran penyakit dan potensi dampaknya terhadap produksi buah jeruk. Disarankan agar para ilmuwan yang tertarik mempelajari mekanisme molekuler yang mendasari deteksi penyakit CVPD secara hati-hati mengekstraksi DNA dari sampel daun tanaman jeruk. Hal ini akan menghasilkan cetakan DNA berkualitas tinggi yang dapat diamplifikasi melalui penggunaan teknik PCR, sehingga memungkinkan deteksi keberadaan bakteri *Liberobacter asiaticus*. Disarankan bagi peneliti lain yang tertarik mempelajari gejala klorosis pada tanaman jeruk siam untuk melihat faktor selain keberadaan bakteri *L. asiaticus* penyebab penyakit CVPD.

Daftar Pustaka

- Artati, D., Dini, D., & Lubis, S. (2017). Optimasi Performa DNA Marker pada Elektroforesis Gel. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur* 15(2): 47–50.
- Ashari, A., (2018). Potensi Ekonomi Perkebunan Jeruk Siam Nagari Pandam Gadang

- Kecamatan Gunuang Omeh Kabupaten Lima Puluh Kota. *Jurnal Buana* 2(3): 784-793.
- Badan Pusat Statistik. (2021). *Produksi Tanaman Buah-buahan 2021*. Retrieved February 23, 2023, from <https://www.bps.go.id/indicator/55/62/1/pr-duksi-tanaman-buah-buahan.html>
- Dwiastuti, M. E., Triwiratno, A., Supriyanto, A., Garnier, M., & Bove, J. M. (2003). Deteksi Penyebaran Geografis Penyakit CVPD di Bali Utara dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Hortikultura*, 13(2), pp.138-145.
- Fitria, R. U., Sugiarti, T., & Kilmanun, J. (2021). Population dynamics of *Diaphorina citri* with the implementation of integrated management of healthy orange gardens (PTKJS) and CVPD detection with PCR engineering. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 759(1).
- Inaya, N., Armita, D., & Hafsan, H. (2021). Identifikasi masalah nutrisi berbagai jenis tanaman di Desa Palajau Kabupaten Jeneponto. *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi* 1(3): 94–102.
- Meitayani, N. P. S., Adiartayasa, W., & Wijaya, I. N. (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.
- Melani, R., Adiartayasa, W., & Wijaya, N. (2018). Deteksi Penyakit Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) Dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Daun Tanaman Jeruk Yang Memiliki Pola Gejala Klorosis Berbeda. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika* 7(2): 164-173
- Murtando, H., Sahiri, N., & Madauna, I. (2016). Identifikasi Karakter Morfologi dan Anatomi Tanaman Jeruk Lokal (*Citrus* sp.) di Desa Karya Agung dan Karya Abadi Kecamatan Taopa Kabupaten Parigi Moutong. *Agrotekbis* 4(6): 642–649.
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. In *Noer. Identifikasi Bakteri secara Molekular EduBiologia* 1(1), 1-6.
- Patandjengi, B., Farham, M., Kuswinanti, T., Melina, Asman, & Tuwo, M. (2023). Detection of citrus vein phloem degeneration disease (*Candidatus Liberibacter asiaticum*) in orange cv. Selayar, *Citrus reticulata* L. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 1192(1): 1-9
- Purwanto, T. W., Sritamin, M., Pradnyawathi, N. L. M. (2019). Struktur Histopatologi Tangkai Daun Jeruk Siam (*Citrus nobilis* L. var. *microcarpa*) Terinfeksi Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) pada Tingkat Serangan Ringan dan Berat. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika* 8(1): 62-76
- Putra, I.K.P., Adiartayasa, W., dan Adnyana, I.M.M. (2016). Deteksi Keberadaan Penyakit CVPD (Citrus Vein Phloem Degeneration) dengan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) di Dusun Untalan. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika* 5(4): 374-383
- Rahmawati, R., Iliana, I., Rachmat, A., Zakaria, L., & Mukarlina, M. (2020). Detection of *Liberibacter asiaticus* causing Citrus Vein Phloem Degeneration from Siam Citrus leaves (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*) in Singkawang City plantation, Pontianak, West Kalimantan. *Microbiology Indonesia*, 14(3): 95–100.
- Rustiani, U.S., Endah, A.S., Nurjanah, N., Prasetiawan, A., Nurmaida, N. (2015). Deteksi Bakteri Penyebab CVPD pada Jeruk Menggunakan DNA Asal Tulang Daun Detection of Bacteria Causing CVPD on Citrus Using DNA Extracted from Leaf Midrib. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 11: 79–84.
- Sipangkar, V. V., Wijaya, I. N., & Sritamin, M. (2020). Kultur Jaringan Jeruk Keprok Tejakula (*Citrus reticulata* var. Tejakula) Menggunakan Tunas Muda dan Biji Serta Deteksi CVPD dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Agrotrop : Journal on Agriculture Science* 10(1): 49-58
- Vucelić-Radović, B., Lazić, D., & Nikšić, M. (2019). *Application of molecular methods and Raman microscopy/spectroscopy in agricultural sciences and food technology*. London: Ubiquity Press.
- Widiyanti, N.L.P.M., Maryam, S., Parwata, I.P., Mulyadharja, S. (2014). *Perbandingan Tampilan Pita Penanda DNA (Deoxyribonucleic Acid) Standar Dan Penentuan Panjang DNA Kromosom Y yang Diisolasi dari Darah Manusia pada Pemisahan dengan Menggunakan Media Berbeda*. Proceedings of the Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA IV Tahun 2024 (pp. 306-310).

- Wirawan, I.G.P., & Julyasih, K. S. M. (2015). Detection of Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) Disease By Polymerase Chain Reaction (PCR) and Protein Analysis Using SDS Page (A Review). *Asia Oceania Biosciences and Biotechnology Consortium* 3(1): 1-7
- Wirawan, I. G. P., Simanjuntak, S., Sritamin, M., & Wijaya, N. (2017). Detection of Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) disease and the quality of healthy fruits in nutrient deficiency of citrus. *Bali Medical Journal* 6(3): S117- S120
- Yang, Y., Zhou, Q., Zahr, K., Harding, M. W., Feindel, D., & Feng, J. (2021). Impact of DNA extraction efficiency on the sensitivity of PCR-based plant disease diagnosis and pathogen quantification. *European Journal of Plant Pathology* 159(3): 583–591.
- Yuniti, D. I. G. A. D. (2016). Bakteri *Liberobacter Asiaticum* Menyebar Pada Tanaman Jeruk Dengan Berbagai Gejala Serangan Penyakit Cvpd. *Jurnal Teknik Gradien* 8(2): 149- 166