

DETEKSI MENGGUNAKAN PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*) *CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS*, PENYEBAB HUANGLONGBING PADA JERUK SIEM DENGAN BEBERAPA TIPE GEJALA PADA DAUN

Achmad Himawan^{1,2}, Yohanes Berchmans Sumardiyono³,
Susanto Somowiyarjo³, Yohanes Andi Trisyono³ & Andrew Beattie⁴

ABSTRACT

Detection using PCR (Polymerase Chain Reaction) *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Huanglongbing causal Organism on Siem Mandarin with different types of symptoms. Huanglongbing (HLB) or Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD) is one of major diseases on Siem mandarin in Indonesia. HLB is caused by bacteria *Candidatus liberibacter asiaticus* (LAS). The bacteria only live in the phloem cells of host tree and only recently it was reported to be successfully cultured on agar medium. Early detection method of LAS is needed to support healthy Siem mandarin cultivation program. This research was conducted to detect LAS in different types of HLB leaf symptoms based on Polymerase Chain Reaction (PCR) method with specific primer forward MHO 353 and reverse MHO 354. The results suggested that 8 types of HLB leaf symptoms were found on the samples used in this experiment. LAS was detected at 60% on the leaves without any symptom followed by the leaves with completely chlorosis symptom at 66%. The leaves with unevenly yellow showing higher percentage of LAS detection ranged from 80-86%. PCR technique successfully amplified DNA of LAS with the size target of 600 bp.

Key words: Huanglongbing (HLB), Siem mandarin, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, PCR

PENDAHULUAN

Jeruk (*Citrus* spp.) merupakan salah satu buah unggulan yang dibudidayakan di Indonesia. Salah satu kendala dalam budidaya jeruk adalah penyakit *huanglongbing* (HLB) atau di Indonesia dikenal dengan *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD). Istilah CVPD, pertama kali dicetuskan oleh Tirtawidjaja (1964). Gejala HLB pada daun jeruk dapat diamati secara makroskopis dan secara mikroskopis. Secara makroskopis yaitu berdasarkan warna dan pola tulang daun. Secara mikroskopis yaitu berdasarkan kerusakan yang terjadi pada sel-sel jaringan floem pada ibu tulang daun.

Penyakit HLB dapat ditularkan lewat *grafting* dan serangga vektor, sehingga disimpulkan bahwa penyebab HLB adalah virus (Tirtawidjaja, 1964; Capoor *et al.*, 1967). Selanjutnya dilaporkan penemuan adanya *Micoplasma-like Organism* (MLO) di dalam sel-sel jaringan floem pada daun jeruk yang bergejala HLB (Lafleche & Bove, 1970). Penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa struktur dinding sel MLO tersebut

lebih tebal daripada membran sel mikoplasma pada umumnya, sehingga diragukan sebagai Mikoplasma, dan selanjutnya disebut *Bacterial-like Organism* (BLO) (Garnier *et al.*, 1976). Selanjutnya diketahui pula bahwa antibiotik Penicilin dapat menghambat timbulnya gejala HLB pada jeruk (Bove *et al.*, 1980; Aubert & Bove, 1980) sehingga lebih memperkuat dugaan bahwa patogen HLB adalah bakteri. Garnier *et al.* (1984) membuktikan bahwa penyebab HLB adalah bakteri gram negatif dengan melakukan pengujian keberadaan dan hilangnya lapisan peptidoglikan (PG) sebagai lapisan di antara lapisan dinding dan membran sel dengan perlakuan papain untuk memperjelas keberadaan PG dan perlakuan lisozyme untuk mendegradasi PG. Selanjutnya Jagoueix *et al.* (1994) mempublikasikan bahwa bakteri tersebut termasuk anggota dari subdivisi α -Proteobacteria, dan namanya diusulkan sebagai *Candidatus Liberobacter asiaticum* untuk strain Asia dan '*Candidatus Liberobacter africanum*' untuk strain Afrika (Jagoueix *et al.*, 1997). Berdasarkan peraturan Kode Internasional Tata Nama Bakteri yang baru, maka '*Candidatus Liberobacter asiaticum*' diubah namanya

¹ Program S-3 Fitopatologi Pasca Sarjana Fakultas Pertanian UGM. E-mail: achmadhim@yahoo.com

² CV AgriBioTech, Jl. Jambon 605, Gang Batan, Kricak, Yogyakarta, cvagribiotech.blogspot.com

³ Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian UGM

⁴ Center for Horticulture and Plant Sciences, University of Western Sydney, Australia

menjadi '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (LAS). Demikian juga untuk '*Candidatus Liberobacter africanum*' diubah namanya menjadi '*Candidatus Liberibacter africanus*' (LAF) (Garnier *et al.*, 2000).

Pada awal tahun 2009, LAS dilaporkan sudah dapat dikulturkan pada medium buatan (Sechler *et al.* 2009) sehingga karakterisasi bakteri tersebut untuk keperluan identifikasi dan deteksi akan lebih baik perkembangannya. Pada awalnya, deteksi penyakit HLB menggunakan metode pengirisan ibu tulang daun jeruk untuk melihat kerusakan sel-sel jaringan floem dan pewarnaan yodium (Tirtawidjaja, 1964). Peneliti selanjutnya menggunakan mikroskop elektron untuk melihat organisme penyebab HLB di dalam sel-sel jaringan floem (Lafleche & Bove, 1970; Garnier & Bove, 1983; Garnier *et al.* 1984; Ariovich & Garnier, 1989). Deteksi menggunakan metode *ELISA* dan imunofluoresen memakai antibodi monoklonal dikembangkan oleh Garnier *et al.* (1987) dan Hsu *et al.* (1991). Deteksi yang dikembangkan selanjutnya adalah hibridisasi DNA menggunakan *probe DNA* spesifik organisme penyebab HLB (Villeanoux *et al.*, 1992; Villeanoux *et al.*, 1993). Metode deteksi secara molekuler menggunakan *PCR* untuk HLB dilakukan oleh Jagoueix *et al.* (1994); Planet *et al.* (1995); Jagoueix *et al.* (1997); Subandiyah *et al.* (2000); Hoy *et al.* (2001); Hung *et al.* (2004). Alat deteksi yang masih berdasarkan penggandaan fragment DNA seperti *PCR* namun disederhanakan hanya menggunakan *water bath* dengan satu siklus suhu tunggal saja dan teknik tersebut dikenal dengan *LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)* dilaporkan mampu mendeteksi LAS (Okuda *et al.*, 2005). Kemajuan deteksi selanjutnya, yaitu menggunakan *quantitative real-time PCR* (Li *et al.*, 2007).

Penelitian gejala HLB pada daun jeruk ponkan mandarin (*C. reticulata* Blanco 'Suntala') yang berumur 3-4 tahun di Nepal, yang dihubungkan dengan keberadaan LAS telah dilakukan oleh Ohtsu *et al.* (1998). Mereka menggolongkan gejala pada daun menjadi 7 kelompok. Tipe I yaitu *mottling* (bercak), tipe II yaitu klorosis dengan urat-urat daun hijau mirip jaring, tipe III yaitu klorosis lanjut dengan ibu tulang daun hijau, tipe IV yaitu hijau pucat pada daun-daun muda, tipe V yaitu tulang daun menguning, tipe VI yaitu penebalan tulang daun/*vein corking* dan tipe VII yaitu *yellow blotching*.

Penelitian tentang deteksi LAS menggunakan *PCR* pada daun jeruk Siem di Indonesia antara lain pernah dilaporkan oleh Taufik *et al.* (2010). Mereka menggunakan primer spesifik OI1 dan OI2c. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati berbagai tipe gejala pada

daun dari tanaman jeruk Siem dan deteksi LAS menggunakan teknik *PCR (Polymerase Chain Reaction)* menggunakan primer spesifik MHO 353 dan MHO 354 (Hoy *et al.*, 2001).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari sampai April 2007 di Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Sampel daun bergejala HLB diambil dari kebun jeruk Siem, yang berumur 7-8 tahun milik Bapak Basiran, Desa Garongan, Kecamatan Panjatan, Kabupaten Kulon Progo, DIY. Luas kebun kurang lebih 2000 m² dengan jumlah pohon sekitar 230. Dipilih 10 pohon yang daunnya bergejala HLB dan positif mengandung LAS setelah dideteksi secara molekuler dengan teknik *PCR*. Berdasarkan pengamatan secara visual oleh penulis, ada 8 tipe gejala HLB pada daun berdasarkan klorosis daun dan penebalan tulang-tulang daun (Gambar 1). Pengambilan sampel daun dilakukan mulai dari pohon yang diberi kode nomor 1 sampai dengan nomor 10. Diambil 1 helai daun dari tiap gejala, sehingga ada 8 helai daun dari tiap pohon. Sampel daun dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi label nomor pohon dan tipe gejala. Pengambilan sampel daun dilakukan secara bertahap, yaitu tahap 1, 2 dan 3, dengan interval 2-3 minggu.

Ekstraksi DNA dan deteksi secara molekuler dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Tiap individu daun diambil ibu tulang daunnya. Selanjutnya ibu tulang daun diekstraksi dengan menggunakan *DNAMITE Plant Kit* (Microzone Ltd., UK). Satu helai ibu tulang daun dipotong kecil-kecil dan dimasukkan ke dalam mortar porselin. Sampel dituangi larutan ekstraksi dan digerus. Ekstrak sampel dipindahkan ke dalam tabung ependorf volume 1,5 ml. Proses selanjutnya dilakukan menurut petunjuk penggunaan kit. Proses terakhir pelet DNA dilarutkan dengan akuabides sebanyak 40 µl. Bila sampel DNA daun tidak langsung dideteksi secara molekuler, maka disimpan dahulu pada freezer -20°C. Penggandaan fragmen DNA spesifik LAS menggunakan metode *Long Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Sepasang primer spesifik yang dipakai adalah MHO 353 (5' GTG TCT CTG ATG GTC CGT TTG CTT CTT TTA 3') dan MHO 354 (5' GAA CCT TCC ACC ATA CGC ATA GCC CCT TCA 3') menurut Hoy *et al.* (2001). *PCR mix* yang dipakai adalah kit *MegaMix-Royal* (MMR, 2x konsentrasi) dari Microzone Ltd., UK.

Setiap sampel menggunakan volume akhir 20 μl , yang tersusun dari 10 μl MMR, 1 μl (5 pmol μl^{-1}) primer MHO 353, 1 μl (5 pmol μl^{-1}) primer MHO 354, akuabides 7 μl dan sampel DNA 1 μl . Program PCR yang dipakai adalah (i) 1 siklus 95°C 5 menit, (ii) 10 siklus (94°C 10 detik, 65°C 30 detik, 68°C 1 menit), (iii) 25 siklus (94°C 10 detik, 65°C 30 detik, 68°C 1 menit 20 detik), (iv) 1 siklus pemanjangan 68°C 5 menit dan (v) Hold pada 20°C. Produk PCR sebanyak 15 μl dituang dalam sumuran gel agarosa 1,5% yang telah ditambah dengan Etidium bromida. Elektroforesis dilakukan dengan MUPID set, menggunakan arus listrik 100 V selama 20-30 menit (Subandiyah *et al.*, 2000). Hasil elektroforesis dilihat di atas lampu UV dan didokumentasikan dengan kamera digital. Analisis data menggunakan metode persentase individu daun yang positif mengandung LAS. Selanjutnya di analisis menggunakan *Duncan Multiple Range Test* ($\alpha = 5\%$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan pengamatan secara visual oleh penulis, ada 8 tipe gejala HLB pada daun jeruk Siem yang ditemukan pada penelitian ini (Gambar 1).

Deteksi adanya LAS pada tiap tipe gejala pada daun menggunakan PCR dan memakai primer spesifik MHO 353 dan MHO 354, yang target produk *PCR*-nya 600 pasang basa (Gambar 2). Primer spesifik itu diklaim oleh penemu/pembuatnya (Hoy *et al.*, 2001) sebagai primer yang mampu menggandakan fragmen spesifik LAS sampai batas 100 sel bakteri per 1 μl sampel DNA (campuran DNA tanaman dan DNA LAS).

Berdasarkan deteksi PCR dari 30 individu daun tiap tipe gejala, maka persentase hasil deteksi positif HLB di atas 50% (Gambar 3). Pada tipe 0 (tidak bergejala HLB) ternyata mengandung LAS sebanyak 60%. Pada tipe 1-7 juga positif HLB dengan persentase antara 66-86%.

Berbagai cara deteksi telah dikembangkan untuk mendeteksi penyakit HLB, mulai dari yang sederhana sampai yang canggih. Deteksi menggunakan cara pengirisan ibu tulang daun dan pewarnaan yodium, merupakan cara deteksi yang sederhana. Cara tersebut relatif mudah, cepat dan murah. Namun, sensitifitas dan keakuratannya kurang dapat dipercaya, karena cara tersebut hanya melihat kerusakan sel-sel jaringan floem yang rusak dan adanya penumpukan pati atau amilum, bukan mendeteksi keberadaan bakterinya. Penggunaan



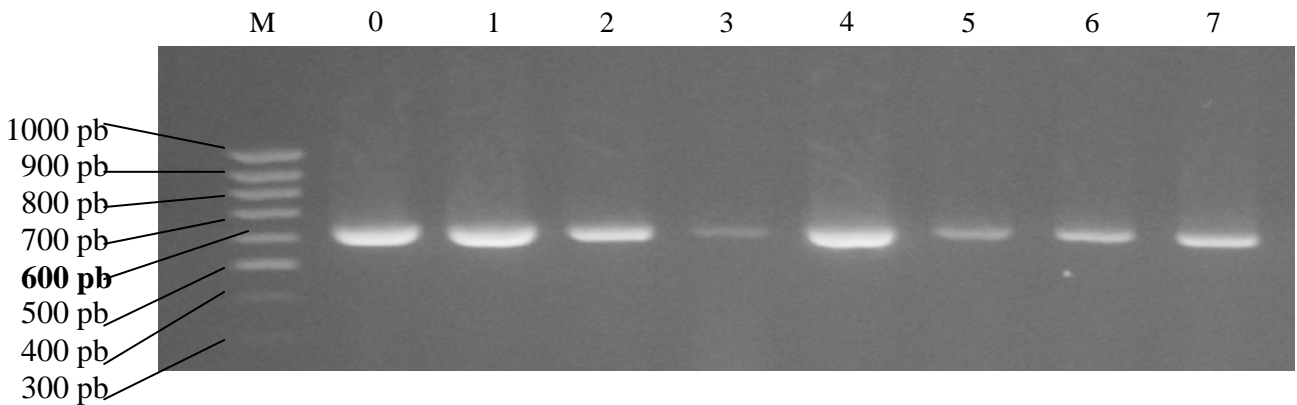
Gambar 1. Berbagai tipe gejala HLB pada daun jeruk Siem. Tipe 0: tidak bergejala HLB (warna dan pola tulang daun seperti pada daun sehat), tipe 1: bercak kuning masih sedikit, tipe 2: bercak kuning tampak pada separoh atau seluruh daun, tipe 3: menguning di antara tulang-tulang daun dan tulang daun berwarna hijau, tipe 4: mirip dengan tipe 3 tetapi warna kuning dan hijau terlihat lebih kontras, tipe 5: sebagian tulang daun menguning, tipe 6: helaian daun berwarna kuning kecuali ibu tulang daun masih berwarna hijau, dan tipe 7: penebalan tulang-tulang daun

mikroskop elektron untuk melihat morfologi bakteri di dalam sel-sel jaringan floem, merupakan cara deteksi yang lebih dipercaya keakuratannya. Namun, cara ini sulit, mahal dan memerlukan ketrampilan tinggi untuk preparasi sampel sampai pengoperasian mikroskop elektron.

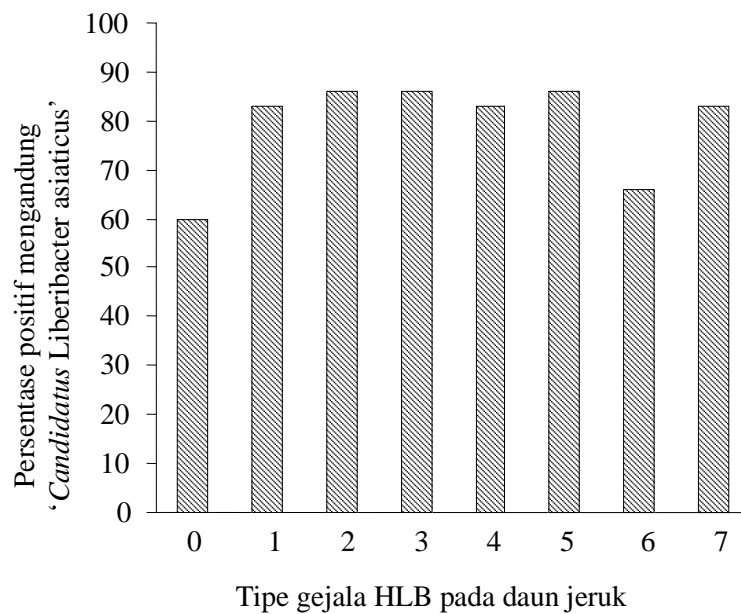
Deteksi secara serologi (ELISA) menggunakan antibodi monoklonal dan poliklonal juga telah dikembangkan pada jeruk Siem (Subandiyah *et al.*, 1995). Cara ini dapat mendeteksi bakteri dengan relatif

cepat dan akurat. Namun ada kelemahannya, yaitu antibodi monoklonal hanya mendeteksi isolat/strain bakteri tertentu saja, tidak bisa untuk deteksi secara umum. Kelemahan antibodi poliklonal yaitu protein tanaman pun juga ikut terdeteksi.

Penemuan metode penggandaan fragmen DNA spesifik organisme tertentu, dengan PCR, menyebabkan berkembangnya deteksi secara molekuler untuk mendeteksi keberadaan bakteri LAS (Planet *et al.*, 1995). Cara ini lebih sensitif dan akurat, lebih cepat,



Gambar 2. Deteksi ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ pada berbagai tipe gejala HLB pada daun jeruk Siem menggunakan PCR. M = marka DNA (100 bp DNA Ladder, Microzone Ltd., UK). 0-7 = gejala HLB pada daun jeruk Siem tipe 0-7 yang berasal dari pohon 1



Gambar 3. Persentase positif keberadaan ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ pada berbagai tipe gejala HLB pada daun jeruk Siem

dan lebih murah bila dibandingkan dengan menggunakan mikroskop elektron dan serologi.

Perkembangan terkini untuk deteksi tetap berdasarkan deteksi secara molekuler, yaitu menggunakan metode *quantitatif real-time PCR*. Cara ini menggunakan mesin *real-time PCR*. Primer dan dNTP-nya dilabel dengan fluoresen, penggandaan fragmen spesifik dideteksi dengan sensor yang peka terhadap cahaya fluoresen, sehingga hasil penggandaan fragmen spesifik dapat diikuti secara *real-time* berupa grafik pada layar monitor. Pada saat ini, cara tersebut yang dianggap paling cepat, sensitif dan akurat. Namun, cara tersebut relatif mahal bila dibandingkan dengan metode PCR konvensional, dan memerlukan ketrampilan khusus untuk mengoperasikan mesin *real-time PCR*.

SIMPULAN

Gejala HLB yang ditemukan pada daun tanaman jeruk Siem berumur 7 tahun dapat dikategorikan dalam 8 tipe mulai dari yang tidak tampak gejala, beberapa tipe khlorosis hingga gejala penebalan tulang-tulang daun. Semua tipe gejala sampel tunggal ibu tulang daun yang diuji mengandung LAS bila dideteksi menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik MHO 353 dan MHO 354. Daun yang tampak sehat tidak menunjukkan gejala menghasilkan 60% positif mengandung LAS, diikuti oleh daun yang menunjukkan gejala khlorosis merata pada helaian daun dengan 66% positif. Tipe gejala lain yang pada umumnya berupa khlorosis tidak merata pada helaian daun memberikan hasil persentasi positif yang lebih tinggi berkisar antara 80-86%.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariovich D & HM Garnet. 1989. The use of Immuno-Gold staining Technique for detection of a bacterium associated with greening diseased citrus. *Phytopathology* 79: 382-384.
- Aubert B & Bove JM. 1980. Effect of penicillin or tetracycline injections of citrus trees affected by greening disease under field conditions in Reunion Island. Pp. 103-108 In: Calavan EC, Garnsey SM & Timmer LW, eds. *Proceedings 8th Conf. IOVC*, University of California, Riverside.
- Bove JM, Bonnet P, Garnier M & Aubert B. 1980. Penicillin and tetracycline treatments of greening disease affected citrus plants in the glasshouse and the bacterial nature of the prokaryote associated with greening. Pp. 91-97 In: Calavan EC, Garnsey SM & Timmer LW, eds. *Proceedings 8th Conf. IOVC*, University of California, Riverside.
- Capoor SP, Rao DG & Viswanath SM. 1967. *Diaphorina citri* Kuway, a Vector of the Greening Disease of Citrus in India. *Indian J. Agric. Sci.* 37: 572-576.
- Garnier M, Daniel N & Bove JM. 1984. The Greening Organism is A Gram Negative Bacterium. Pp. 115-124 In Garnsey SM, Timmer LW & Dodds JA, eds. *Proceedings 9th Conf. of IOCV*, University of California, Riverside.
- Garnier M, Martin-Gross G & Bove JM. 1987. Monoclonal antibodies against the bacterial-like organism associated with citrus greening disease. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 138: 639-650.
- Garnier M, Jagoueix-Eveillard S, Cronje PR, Le Roux HF & Bove JM. 2000. Genomic Characterization of a Liberibacter Present in an Ornamental Rutaceous Tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of '*Ca Liberibacter africanus* subsp. *capensis*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2119-2125.
- Hoy MA, Jeyaprakash A & Nguyen R. 2001. Long PCR is a Sensitive Method for Detecting *Liberobacter asiaticum* in Parasitoids Undergoing Risk Assessment in Quarantine. *Biol. Control* 22: 278-287.
- Hung TH, Hung SC, Chen CN, Hsu MH & Su HJ. 2004. Detection by PCR of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to study of vector-pathogen relationships. *Plant Pathology* 53: 96-102.
- Hsu PD, Yang H, Ye XD & Ke C. 1991. Detection of the bacteria-like organism associated with citrus HLB by immunofluorescence and ELISA using monoclonal antibodies. Pp. 81-84 In: Chung K & Osman SB, eds. *Proceedings 6th International Asia Pasifik Workshop on Integrated Citrus Health Management*, UNDP-FAO, KL, Malaysia.

- Jagoueix S, Bove JM & Garnier M. 1994. The Phloem Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus is the Member of the α -subdivision of Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 379–386.
- Jagoueix S, Bove JM & Garnier M. 1997. Comparison of the 16S/23S Ribosomal Intergenic Regions of “*Candidatus Liberobacter asiaticum*” and “*Candidatus Liberobacter africanum*”, The Two Species Associated with Citrus Huanglongbing (Greening) Disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 224–227.
- Li W, Hartung JS & Levy L. 2007. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of ‘*Candidatus Liberibacter species*’ associated with citrus huanglongbing. *Plant Dis.* 91: 51–58.
- Ohtsu Y, Nakashima K, Prommintara M & Tomiyasu Y. 1998. Typical Symptoms of Citrus Greening on Mandarin Trees in Nepal, Supported by Detection and Characterization of Ribosomal DNA of the Causal Organisms. *Ann. Phytopatol. Soc. Jpn.* 64: 539–545.
- Okuda M, Matsumoto M, Tanaka Y, Subandiyah S & Iwanami T. 2005. Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* gene cluster of Citrus Greening (Huanglongbing) Organism in Japan and Indonesia and detection by Loop-mediated Isothermal Amplification. *Plant Dis.* 89: 705–711.
- Planet P, Jagoueix S, Bove JM & Garnier M. 1995. Detection and characterization of the African citrus greening *Liberobacter* by amplification, cloning, and sequencing of the *rplKAJL-rpoBC* operon. *Curr. Microbiol.* 30: 137–141.
- Sechler A, Scheunzel EL, Cooke P, Donnua S, Thaveechai N, Postnikova E, Stone AL, Schneider WL, Damsteegt VD & Schaad NW. 2009. Cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’, and ‘*Ca. L. americanus*’ Associated with Huanglongbing. *Phytopathology* 99: 480–486.
- Subandiyah S, Suryandari H, Somowiyarjo S & Artama WT. 1995. Serological characteristics of the organism associated with CVPD. *Jurnal Biosains* 1(3): 8–12.
- Subandiyah S, Iwanami T, Kondo Y, Kobayashi M, Ieki H & Tsuyumu S. 2000. Comparison of 16S-rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organism in Asia. *Plant Dis.* 84: 15–18.
- Taufik M, Khaerani A, Pakki T & Gianto. 2010. Deteksi keberadaan *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) di Sulawesi Tenggara. *J. Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* 10(1): 73–79.
- Tirtawidjaja S. 1964. Citrus Vein-Phloem Degeneration Virus Penyebab dari Citrus Chlorosis di Jawa. *Disertasi*. Institut Pertanian Bogor.
- Villechanoux S, Garnier M, Renoudin J & Bove JM. 1992. Detection of several strains of the bacterium-like organism of citrus greening disease by DNA probes. *Curr. Microbiol.* 24 : 89–95.
- Villechanoux S, Garnier M, Laigret F, Renaudin J & Bove JM. 1993. The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the *nusG-rplKAJL-rpoBC* gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase. *Current Microbiol.* 26: 161–166.