

LEMBAR PERSETUJUAN ARTIKEL PENELITIAN

Tahun Penelitian : 2012

Judul Artikel Penelitian : **DETEKSI PENYAKIT SISTEMIK *CITRUS VEIN PHLOEM DEGENERATION* (CVPD) MENGGUNAKAN TEKNIK PCR PADA CALON INDUKAN JERUK KEPROK TAWANGMANGU (*Citrus reticulata* Blanco ssp Tawangmangu)**

Penulis Artikel/NIP : 1. Einstivina Nuryandani, S.Si., M.Si / 19830312 200812 2 004
2. Drs. Sumarno, M.Pd. / 195410121980121001

Fakultas : 1. FMIPA
2. FKIP

Menyetujui:

Penelaah-1,



Dra. Subekti Nurmawati, M.Si
NIP 19670518 199103 2 001

Penelaah-2



Dra. Susi Sulistiana M.Si,
NIP. 196410021992032001

DETECTION OF CITRUS SYSTEMIC DISEASE, CITRUS VEIN PHLOEM
DEGENERATION (CVPD) FROM TAWANGMANGU CITRUS PARENT CANDIDATE
(*Citrus reticulata Blanco* ssp Tawangmangu) USING PCR TECHNIQUE

Einstivina Nuryandani (einstivina@ut.ac.id)

Biological Studies Program, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Open University
Of Indonesia

Sumarno

Faculty of Teaching and Education, Open University Of Indonesia

ABSTRACT

Original accession of *Citrus reticulata Blanco* ssp Tawangmangu is a potential plant to be developed as a parent plants candidate. However, breeding programs and development of *Citrus reticulata Blanco* ssp Tawangmangu need accurate information about the health condition of parent plants used. CVPD is an important disease of Tawangmangu citrus tangerine that can destroy crops. Therefore CVPD disease detection through PCR technique is very important to ensure the health of the parent plants used.

Twenty-five accession collected from Tawangmangu and Ngargoyoso district. Analysis using PCR techniques performed in Balitjestro, Tlekung, Malang. The result of PCR then visualized in gel electrophoresis and compared with DNA Marker and positive samples that infected by CVPD disease.

The results showed that there is a bright ribbon (band) on a DNA sample from positive samples that infected by CVPD disease for the 1160 bp when juxtaposed with DNA Marker. However, the DNA sample of twenty-five samples of prospective parent of Tawangmangu original tangerine does not found band on the size 1160 bp. This shows that the twenty-five samples tested are not infected by the CVPD disease.

Keywords: Tawangmangu indigenous tangerine Parent plants, PCR, CVPD

DETEKSI PENYAKIT SISTEMIK *CITRUS VEIN PHLOEM DEGENERATION* (CVPD) MENGGUNAKAN TEKNIK PCR PADA CALON INDUKAN JERUK KEPROK TAWANGMANGU (*Citrus reticulata* Blanco ssp Tawangmangu)

**Einstivina Nuryandani (einstivina@ut.ac.id)
Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Terbuka**

**Sumarno
Fakultas FKIP, Universitas Terbuka**

ABSTRAK

Asesi tanaman jeruk keprok asli Tawangmangu merupakan tanaman yang potensial untuk dikembangkan sebagai indukan. Namun program pemuliaan dan pengembangan jeruk keprok Tawangmangu (*Citrus reticulata* Blanco ssp Tawangmangu) membutuhkan informasi yang akurat mengenai kondisi kesehatan tanaman induk yang digunakan. CVPD merupakan penyakit penting tanaman jeruk keprok Tawangmangu yang dapat menghancurkan tanaman ini. Oleh karena itu deteksi penyakit CVPD melalui teknik PCR sangat penting untuk menjamin kesehatan tanaman induk yang digunakan.

Penelitian dilakukan di kecamatan Tawangmangu dan Ngargoyoso untuk pengambilan 25 sampel asesi dan proses analisis menggunakan teknik PCR dilakukan di Balitjestro, Tlekung, Malang. Hasil PCR kemudian divisualisasikan dalam gel elektroforesis dan dibandingkan dengan Marker DNA dan contoh sampel yang positif menderita penyakit CVPD.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pita terang pada DNA contoh sampel yang positif terkena CVPD pada 1160 bp jika disandingkan dengan Marker DNA. Namun pada contoh DNA dari dua puluh lima sampel calon induk jeruk keprok asli Tawangmangu tidak didapati pita pada besaran 1160 bp. Hal ini menunjukkan bahwa kedua puluh lima sampel yang diuji tidak terinfeksi oleh penyakit CVPD.

Kata Kunci : jeruk keprok asli Tawangmangu, PCR, CVPD

Konsumsi buah jeruk penduduk Indonesia pada tahun 2005 mencapai 2,6 kg per kapita per tahun (Shanti, 2007). Namun sebagian besar kebutuhan jeruk dalam negeri ini dipenuhi dari impor. Balitbang Pertanian (2005) mengemukakan bahwa Indonesia termasuk negara pengimpor jeruk terbesar kedua di ASEAN setelah Malaysia, dengan volume impor mencapai 94.696 ton.

Penelitian oleh Shanti (2007) yang melakukan analisis keputusan konsumen dalam mengkonsumsi jeruk memperlihatkan bahwa 85% responden mengkonsumsi buah jeruk impor dan hanya 15% saja yang mengkonsumsi jeruk lokal. Hal ini patut disayangkan, mengingat Indonesia juga memiliki potensi jeruk lokal yang sangat bagus.

Saat ini, Indonesia memiliki beberapa kultivar unggul jeruk keprok yang kualitasnya dapat menandingi jeruk impor. Beberapa kultivar jeruk keprok komersial hasil seleksi Balitjestro maupun dari Pemerintah Daerah yang sudah dilepas oleh Kementerian Pertanian dengan kualitas buah yang tidak kalah dengan jeruk impor antara lain Keprok Batu 55 berasal; dari Batu, Jawa Timur, keprok Garut dari Jawa Barat, keprok Pulung dari Jawa Timur, keprok Tawangmangu dari Jawa Tengah, dan keprok SOE dari NTT. Jenis keprok lainnya, seperti keprok Tejakula (Bali), keprok Madura, keprok Borneo Prima (Kaltim) dan keprok Trigas (Kalbar) tampaknya juga dapat berpotensi untuk dikembangkan di masa mendatang khususnya untuk dataran rendah (Hardiyanto, 2012 dan Menteri Pertanian Republik Indonesia, 2003).

Jeruk keprok Tawangmangu mengalami masa-masa kejayaan sekitar tahun 1980-1983. Namun masa kejayaan tersebut berakhir sekitar tahun 1984 dengan adanya serangan *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) (Giyanti, 2001). Hampir

seluruh tanaman jeruk Tawangmangu mati karena serangan penyakit tersebut, bahkan dewasa ini dapat dikatakan punah (Wahyuningsih, 2009).

Namun ternyata tidak semua tanaman induk jeruk keprok Tawangmangu tersebut telah punah. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) memiliki koleksi asesi jeruk keprok Tawangmangu (Hardiyanto, 2012). Penelitian Nuryandani (2012) juga menemukan 22 asesi tanaman induk jeruk keprok Tawangmangu yang ditanam pada pekarangan warga di daerah Tawangmangu. Asesi-asesi tersebut potensial untuk dikembangkan sebagai tanaman induk bagi pengembangan jeruk keprok Tawangmangu di masa datang.

Penelitian untuk mengembalikan Tawangmangu sebagai sentra jeruk Tawangmangu mulai dilakukan sekitar tahun 1996 (Hermawan, 2002). Namun, program rehabilitasi ini masih mengalami berbagai kendala. Program rehabilitasi sudah dilaksanakan namun penyakit ini masih menginfeksi ulang karena sumber-sumber penyakit masih terdapat di daerah sentra (Endarto *et al.*, 2006).

Strategi pengendalian hama dan penyakit di kebun jeruk telah diformulasikan dalam Pengelolaan Terpadu Kebun Jeruk Sehat (PTKJS). Salah satu faktor penting untuk melaksanakan PTKJS adalah ketersediaan bibit tanaman bebas penyakit (Endarto *et al.*, 2006).

Ketersediaan bibit yang bebas penyakit tidak luput dari kualitas indukan yang bebas penyakit. Selama ini indukan berasal dari Balitjestro Malang yang telah dikembangkan di Dinas Pertanian Kabupaten Karanganyar. Adanya penemuan 22 asesi pohon induk lain di luar pohon induk dari Balitjestro Malang (Nuryandani, 2012) membuka kemungkinan lebih jauh untuk mengembangkan tanaman ini. Namun

kendalanya adalah pohon indukan ini belum dapat dipastikan bebas dari penyakit sistemik CVPD.

Penyakit CVPD sulit untuk dideteksi karena keberadaannya dan penyebarannya pada tubuh tumbuhan yang hanya sedikit dan tidak merata. Penyakit ini sulit untuk dideteksi dengan metode konvensional seperti menggunakan mikroskop elektron, *bioassay*, maupun dengan teknik ELISA (Hung *et al.*, 1999.)

Beberapa teknik baru yang dikembangkan untuk mendeteksi penyakit CVPD antara lain menggunakan DNA Probe dan teknik PCR. Proses deteksi menggunakan hibridisasi titik menggunakan *DNA Probe* memakan waktu dua hari sedangkan menggunakan teknik PCR, hanya memerlukan waktu sekitar 6 jam. Teknik PCR lebih efektif dan efisien untuk mendeteksi penyakit CVPD pada tanaman jeruk (Hung *et al.*, 1999.)

Penelitian menggunakan teknik PCR untuk mendeteksi infeksi CVPD dan memastikan bahwa asesi-asesi tanaman yang ditemukan ini dapat digunakan sebagai calon indukan yang potensial untuk pengembangan tanaman jeruk keprok Tawangmangu.

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk melakukan identifikasi infeksi penyakit CVPD melalui teknik PCR pada dua puluh lima asesi calon pohon induk jeruk keprok Tawangmangu dan untuk mempersiapkan calon indukan tanaman jeruk keprok yang bebas penyakit sistemik CVPD.

METODOLOGI

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret sampai November 2012 di wilayah sekitar Kecamatan Tawangmangu dan Ngargoyoso, Karanganyar, Jateng, laboratorium Balitjestro, Tlekung, Malang, dan UPBJJ-UT Semarang. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tulang daun jeruk sebanyak 0,5 gram dari 25 sampel daun tanaman jeruk keprok yang memiliki gejala terinfeksi, tabung eppendorf, 1% -merkaptotanol, CIAA, isopropanol, alkohol 70%, buffer TE, 1 µl template DNA, primer forward, primer reverse MMR, 1% dalam 40 ml (w/v) gel agarosa, etidium bromide, DNA contoh yang positif terinfeksi CVPD, dan DNA ladder. Alat yang digunakan adalah tabung mortar, pistil, eppendorf, mikropipet, sentrifuse, alat elektroforesis, pH meter, UV transluminator, penangas air/waterbath, mesin PCR, kamera digital, timbangan digital, mortar, dan microwave.

Pengumpulan Sampel

Pengumpulan sampel dilakukan dengan mengambil daun muda yang menunjukkan satu dari lima gejala khas daun seperti terinfeksi CVPD yaitu belang-belang (tipe I), klorosis sedang dengan tulang daun hijau (tipe II), klorosis keras dengan tulang daun hijau (tipe III), klorosis dengan tulang daun kuning (tipe IV) dan tulang daun mengeras (tipe V) dikoleksi, kemudian diambil tulangnya sebanyak 0,5 gram.

Ekstraksi DNA

Tulang daun dipotong kecil-kecil berukuran 0,2-0,5 gram. Sampel dimasukkan ke dalam eppendorf yang berisi 1500 µl buffer isolasi DNA + 30 µl merkuptoetanol, dan dicampur rata. Kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 10-15 menit. Selanjutnya sampel disentrifuge pada kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Hasil dari proses sentrifuse akan memperlihatkan dua buah fase, yaitu pelet atau endapan di bagian bawah eppendorf dan supernatan atau cairan di bagian atas. Kemudian supernatannya diambil sebanyak ± 750 µl. Supernatan ini kemudian ditambah dengan larutan 1 ml Chloroform:Isoamylalkohol (CIAA) dengan perbandingan (24:1) kemudian dicampur rata dengan cara dikocok dengan kuat. Hasilnya kemudian disentrifuge pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Supernatan sebanyak ± 600 µl diambil, kemudian ditambah isopropanol dingin sebanyak jumlah supernatannya, selanjutnya dibolak-balik pelan hingga tercampur. Hasilnya kemudian disentrifuge selama 13000 rpm selama 10 menit.

Endapan yang merupakan DNA dicuci dengan alkohol 70% sebanyak 750 µl sambil dibolak-balik pelan kemudian disentrifuse pada kecepatan 10000 rpm selama 3 menit, supernatan dibuang dan pelet dikeringkan pada suhu ruangan sekitar 1 jam dengan cara membalik tabung Eppendorf. Selanjutnya endapan DNA contoh yang diperoleh dilarutkan dalam 100 µl bufer TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5; 10mM EDTA) dan disimpan pada freezer dengan suhu 0°C.

Amplifikasi DNA

Analisis PCR dilakukan berdasarkan metode Jagoeux et al., (1996). Primer spesifik yang digunakan adalah OI1 dan OI2. Urutan basa forward primer (OI 1) : 5'- GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA-3', dan reverse primer (OI2c) : 5' - GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3'. Campuran untuk PCR dalam 20 µl

berisi MMR 10 μ l, Primer forward = 1 μ l, Primer reverse = 1 μ l, H₂O 7 μ l, dan DNA sampel 1 μ l. Suhu yang digunakan pada saat PCR adalah denaturasi awal (Pre-treatment) pada suhu 92° C selama 30 detik (1 siklus), diikuti dengan 40 siklus yang terdiri dari 92oC selama 60 detik (denaturasi), 60oC selama 60 detik (annealing), dan 72oC selama 90 detik (ekstensi/pemanjangan) dengan siklus terakhir (post ekstension) 72oC selama 10 menit.

Elektroforesis dan Pewarnaan

Produk hasil amplifikasi sebanyak 5-8 μ l dianalisis menggunakan gel agarosa 1% dalam 40 ml (w/v) dan dideteksi menggunakan pewarnaan dengan etidium bromida (EtBr), dan difoto menggunakan gel-doc untuk mendokumentasikannya di atas UV Transiluminator. Sampel yang dikatakan positif terinfeksi CVPD akan terlihat sebagai pita terang dengan ukuran potongan sampel pada 1160 bp ketika dibandingkan dengan Ladder (Marker DNA).

Analisis Data

Data hasil elektroforesis dari 25 sampel yang diuji akan menunjukkan hasil positif jika didapati pita pada sampel saat di PCR pada 1160 bp jika dibandingkan dengan marker DNA, jika tidak terdapat pita, berarti tanaman tersebut tidak terinfeksi. Pita yang terang (positif) akan diberi tanda +, semakin terang pita, semakin tinggi tingkat infeksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Terdapat tiga puluh tiga sampel yang diambil daunnya dari tiga lokasi desa di dua Kecamatan, yaitu Kecamatan Tawangmangu dan Kecamatan Ngargoyoso, yaitu Desa Blumbang dan Gondosuli di Kecamatan Tawangmangu, dan Desa Ngargoyoso di Kecamatan Ngargoyoso.

Data ketiga puluh tiga sampel tanaman yang diambil pada tiga desa tersebut adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Data 33 sampel yang diambil sampel daunnya untuk deteksi penyakit CVPD.

NO	KODE ASESI	LOKASI PENANAMAN
1	TN1	Ngargoyoso
2	TN2	Ngargoyoso
3	TN3	Ngargoyoso
4	TN4	Ngargoyoso
5	TN5	Ngargoyoso
6	TN6	Ngargoyoso
7	TG1	Gondosuli
8	TG2	Gondosuli
9	TG3	Gondosuli
10	TG4	Gondosuli
11	TG5	Gondosuli
12	TG6	Gondosuli
13	TG7	Gondosuli
14	TG8	Gondosuli
15	TG9	Gondosuli
16	TG10	Gondosuli
17	TB21	Blumbang
18	TB2	Blumbang
19	TB3	Blumbang
20	TB4	Blumbang
21	TB5	Blumbang
22	TB6	Blumbang
23	TB7	Blumbang
24	TB8	Blumbang
25	TB9	Blumbang
26	TB18	Blumbang
27	TB19	Blumbang
28	TB20	Blumbang
29	TB21	Blumbang
30	TB23	Blumbang
31	TB24	Blumbang

32	TB25	Blumbang
33	TB26	Blumbang

Keterangan kode asesi : TN adalah pohon jeruk keprok Tawangmangu yang diambil dari Desa Ngargoyoso, TG adalah pohon jeruk keprok Tawangmangu yang diambil dari Desa, dan TB adalah pohon jeruk keprok Tawangmangu yang diambil dari Desa Blumbang.

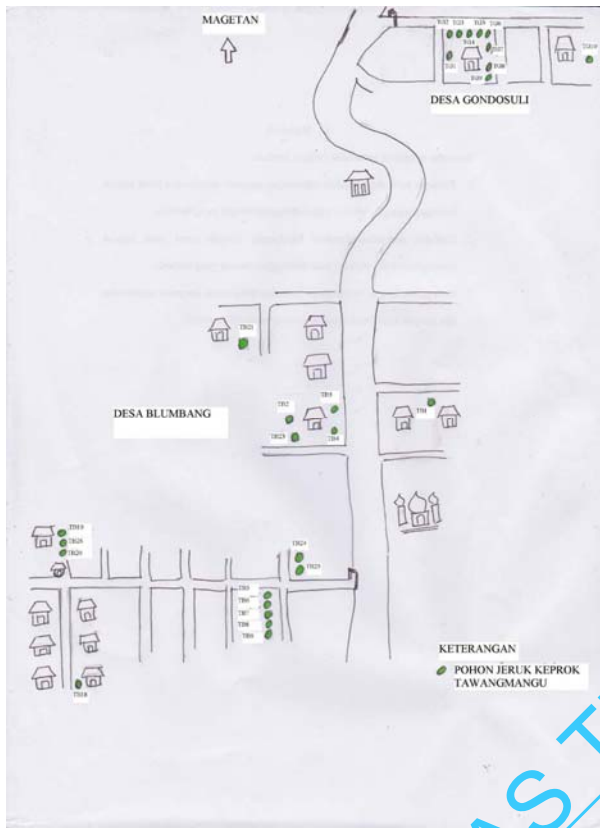
Ketiga puluh tiga sampel yang diambil memiliki umur yang beragam antara satu tahun hingga sekitar tiga puluh tahun. Meskipun memiliki perawakan yang berbeda-beda, dari wawancara dengan pemilik tanaman, sampel-sampel tanaman ini merupakan tanaman jeruk keprok asli Tawangmangu.

Lokasi sampel yang diambil tersebar di beberapa rumah penduduk. Terdapat rumah yang memiliki hanya satu buah sampel tanaman, namun ada juga rumah yang memiliki beberapa sampel tanaman yang hendak diuji.

Persebaran lokasi sampel yang diambil dari Desa Ngargoyoso, Desa Gondosuli, dan Desa Blumbang dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 1. Denah lokasi pengambilan sampel di Desa Ngargoyoso.



Gambar 2. Denah lokasi pengambilan sampel di Desa Gondosuli dan Blumbang.

Ketiga puluh tiga sampel ini kemudian dipilih dua puluh lima sampel yang paling baik untuk diuji untuk dideteksi terinfeksi CVPD atau tidak . Kedua puluh lima sampel tersebut adalah sebagai berikut :

Tabel 2. Dua puluh lima sampel yang diuji untuk deteksi penyakit CVPD

NO	KODE SAMPEL	KODE ASESI	LOKASI PENANAMAN
1	1	TN1	Ngargoyoso
2	2	TN2	Ngargoyoso
3	3	TN3	Ngargoyoso
4	4	TN4	Ngargoyoso
5	5	TG2	Gondosuli
6	6	TG3	Gondosuli
7	7	TG4	Gondosuli
8	8	TG5	Gondosuli
9	9	TG6	Gondosuli
10	10	TG7	Gondosuli
11	11	TG8	Gondosuli
12	12	TG9	Gondosuli
13	13	TG10	Gondosuli
14	14	TB21	Blumbang
15	15	TB2	Blumbang
16	16	TB23	Blumbang
17	17	TB3	Blumbang
18	18	TB4	Blumbang
19	19	TB1	Blumbang
20	20	TB5	Blumbang
21	21	TB6	Blumbang
22	22	TB7	Blumbang
23	23	TB19	Blumbang
24	24	TB20	Blumbang
25	25	TB18	Blumbang

Dua puluh lima asesi yang digunakan memiliki ukuran, umur, dan penampakan morfologi yang berbeda-beda. Penampakan morfologi kedua puluh lima sampel yang diuji tersebut adalah sebagai berikut :



(a) (b) (c) (d) (e)

Gambar 3. Penampakan morfologi (a) Sampel 1 (Asesi TN1), (b) Sampel 2 (Asesi TN2), (c) Sampel 3 (Asesi TN3), (d) Sampel 4 (TN4), dan (e) Sampel 5 (TG2).



(a) (b) (c) (d) (e)

Gambar 4. Penampakan morfologi (a) Sampel 6 (Asesi TG3), (b) Sampel 7 (Asesi TG4), (c) Sampel 8 (Asesi TG5), (d) Sampel 9 (Asesi TG6), dan (e) Sampel 10 (Asesi TG7)



(a) (b) (c) (d) (e)

Gambar 5. Penampakan morfologi (a) Sampel 11 (Asesi TG8), (b) Sampel 12 (Asesi TG9), (c) Sampel 13 (Asesi TG10), (d) Sampel 14 (Asesi TB21), dan (e) Sampel 15 (Asesi TB2).



(a) (b) (c) (d) (e)

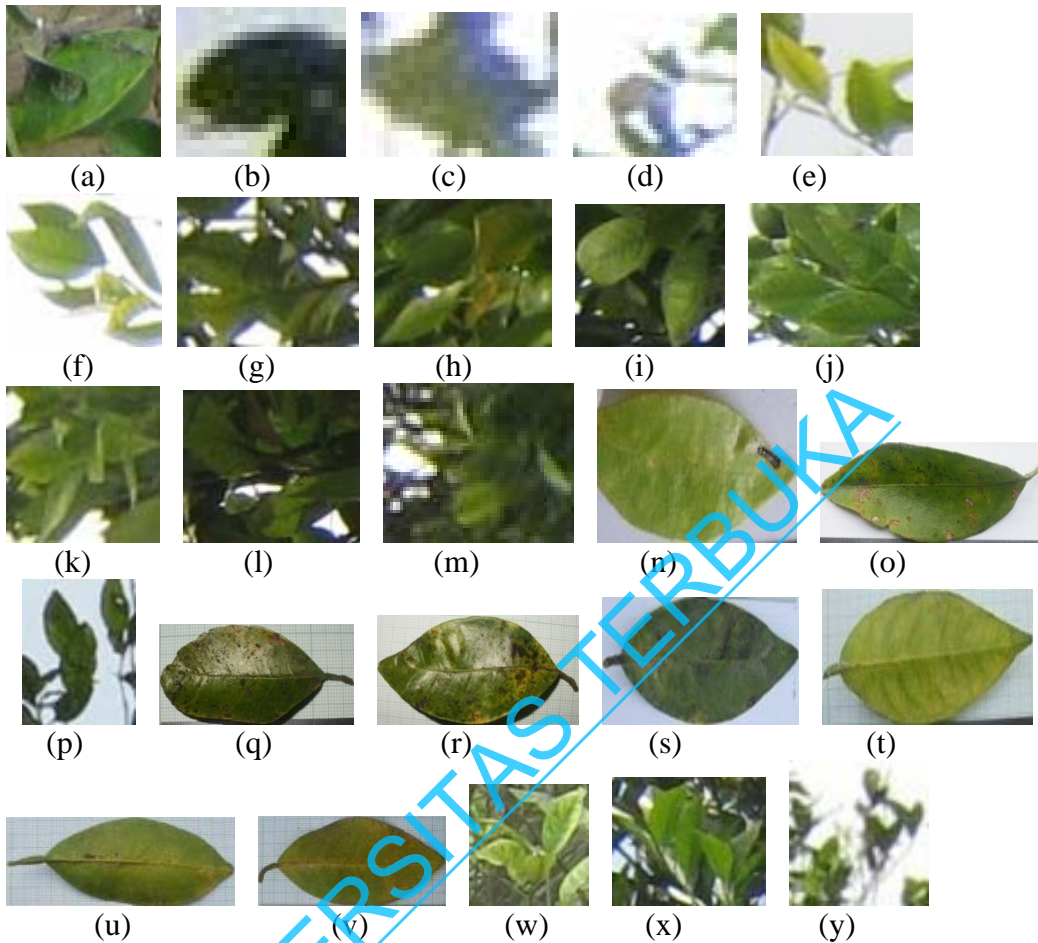
Gambar 6. Penampakan morfologi (a) Sampel 16 (Asesi TB23), (b) Sampel 17 (Asesi TB3), (c) Sampel 18 (Asesi TB4), (d) Sampel 19 (Asesi TB1), dan (e) Sampel 20 (Asesi TB5).



(a) (b) (c) (d)

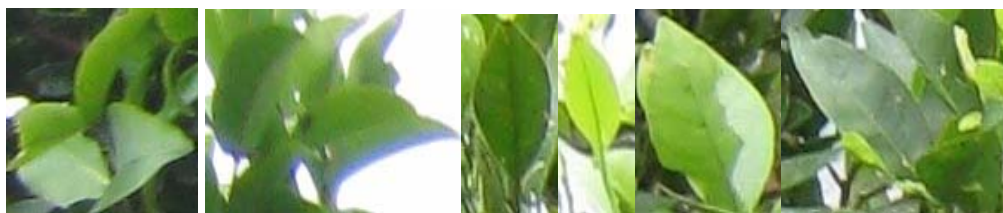
Gambar 7. Penampakan morfologi (a) Sampel 21 (Asesi TB6) dan Sampel 22 (Asesi TB7), (b) Sampel 23 (Asesi TB19), (c) Sampel 24 (Asesi TB20), dan (d) Sampel 25 (Asesi TB18)

Gambar berikut merupakan penampakan daun yang diambil sebagai sampel yang diuji. Daun-daun ini menunjukkan gejala/symptom daun yang terkena CVPD.



Gambar 8. Daun dari asesi (a)TN1, (b) TN2, (c) TN3, (d) TN4, (e) TG2 (f) TG3, (g) TG4, (h) TG5, (i) TG6, (j) TG7, (k) TG8, (l) TG9, (m) TG10, (n) TB21, (o) TB2, (p) TB23, (q) TB3, (r) TB4, (s) TB1, (t) TB5, (u) TB6, (v) TB7, (w) TB19, (x) TB20, dan (y)TB18

Gambar-gambar di atas dapat dibandingkan dengan daun dari tanaman sehat yang berasal dari tanaman jeruk keprok Tawangmangu yang bibitnya berasal dari dinas Pertanian Kecamatan Tawangmangu pada Gambar 9 berikut.



Gambar 9. Penampakan daun dari tanaman jeruk keprok Tawangmangu yang tidak menderita CVPD.

Pengujian Sampel Menggunakan Teknik PCR

Daun-daun jeruk keprok Tawangmangu yang digunakan sebagai sampel pada pengujian penyakit CVPD memiliki ciri-ciri antara lain daun dewasa berwarna kekuning-kuningan, tulang-tulang daun berwarna hijau kontras dengan warna daging daun yang menguning, dan pada beberapa daun pada beberapa daun mengalami bercak-bercak kuning/mengalami gejala seperti klorosis (*blotching*).

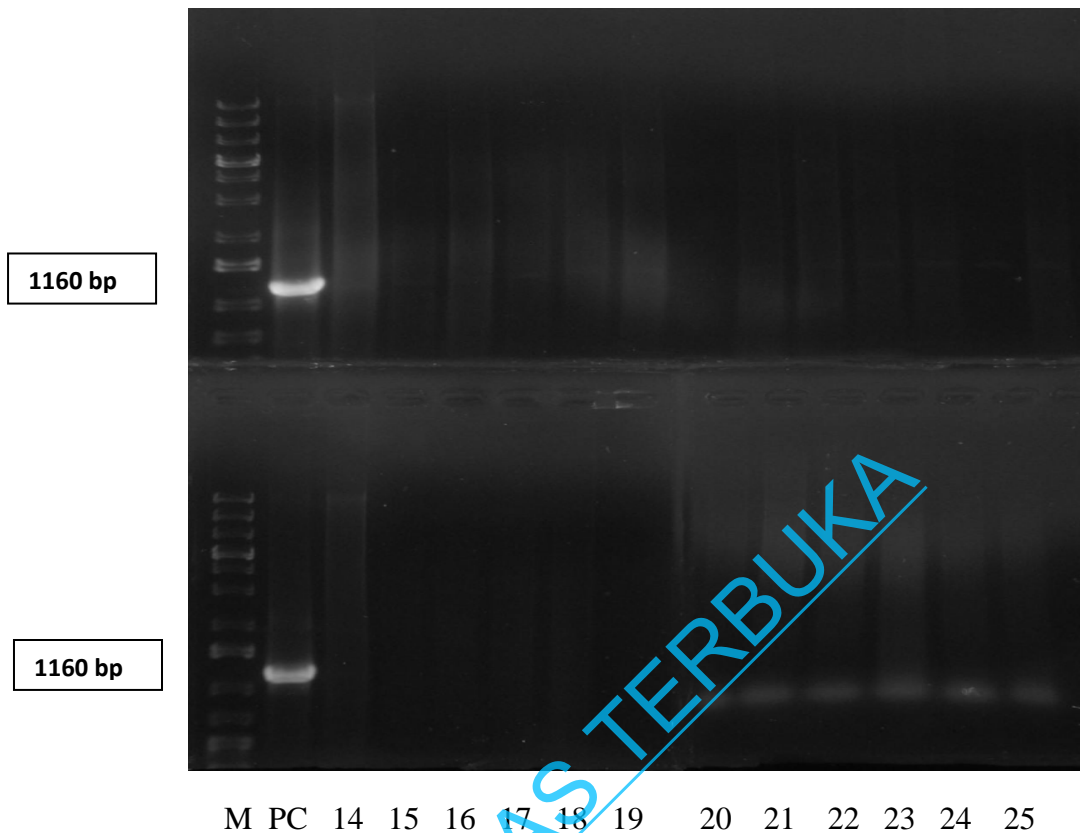
Hal ini senada dengan pernyataan Wahyuningsih (2009) dimana gejala luar yang ditimbulkan penyakit CVPD antara lain daun dewasa berwarna kekuning-kuningan pada daun dewasa, seperti halnya kekurangan unsur Zn, Mn, dan Fe serta tulang-tulang daun halus berwarna lebih hijau daripada jaringan helaian daunnya (Wahyuningsih, 2009).

Hal ini berbeda dengan penampakan morfologi daun yang tidak terkena CVPD dari jeruk keprok Tawangmangu yang ada pada Gambar 9 di atas. Daun tampak berkembang dengan baik dan berwarna hijau merata. Tidak terdapat perbedaan warna yang mencolok antara tulang daun dengan daging daunnya.

Sampel daun yang telah didapatkan kemudian diuji di laboratorium untuk mendeteksi adanya infeksi penyakit CVPD pada tanaman tersebut. Pengujian ini melibatkan sampel tanaman yang positif terkena penyakit CVPD dan ladder atau marker untuk mengetahui besaran DNA yang teramplifikasi sebagai pembanding.

Sekuen spesifik pada fragmen 16SrDNA hasil PCR dari sampel tanaman sakit menggunakan primer OI1 (forward) dan OI2 (reverse) untuk strain Asia akan mengamplifikasi DNA sekitar 1160 bp (Jagoeuix et.al., 1994). Fragmen DNA ini akan menunjukkan pita terang setelah divisualisasikan pada gel elektroforesis.

M PC 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Gambar 10. Visualisasi hasil PCR menggunakan elektroforesis, M menunjukkan marker atau DNA ladder, PC menunjukkan kontrol positif/sampel yang terkena CVPD, dan kode angka menunjukkan urutan sampel yang menunjukkan asesi, yaitu (1)TN1, (2) TN2, (3) TN3, (4) TN4, (5) TG2, (6) TG3, (7) TG4, (8) TG5, (9) TG6, (10) TG7, (11) TG8, (12) TG9, (13) TG10, (14) TB21, (15) TB2, (16) TB23, (17) TB3, (18) TB4, (19) TB1, (20) TB5, (21) TB6, (22) TB7, (23) TB19, (24)TB20, dan (25)TB18. Sampel dikatakan positif jika terdapat pita (band) pada 1160 bp.

Kontrol positif menunjukkan pita terang pada ukuran 1160 bp , hal ini berarti bahwa kontrol positif dapat digunakan sebagai pembanding bagi dua puluh lima sampel lainnya karena kontrol positif melalui proses ekstraksi, PCR, dan elektroforesis yang sama dengan yang digunakan pada dua puluh lima sampel yang diuji. Sekuen spesifik pada fragmen 16SrDNA hasil PCR dari sampel tanaman sakit menggunakan primer OI1 (forward) dan OI2 (reverse) untuk strain Asia akan mengamplifikasi DNA sekitar 1160 bp (Jagoeuix et.al., 1994).

Jadi, pita DNA atau band dari sampel yang menunjukkan suatu sampel terinfeksi oleh virus CVPD akan terlihat pada ukuran sekitar 1160 bp bila dibandingkan oleh marker DNA dan sejajar dengan pita dari hasil kontrol positif. Dua puluh lima buah sampel yang diuji tidak terlihat pita DNA pada ukuran 1160 bp yang berarti bahwa seluruh sampel calon tanaman indukan ini tidak terjangkit oleh penyakit CVPD.

Gejala yang diamati pada sampel daun jeruk keprok Tawangmangu seperti ciri-ciri daun dewasa berwarna kekuning-kuningan, tulang-tulang daun berwarna hijau kontras dengan warna daging daun yang menguning mirip dengan gejala defisiensi Zn dan Fe. Dwiastuti et.al. (2003) yang meneliti hubungan antara gejala blotching, defisiensi Zn dan Fe dengan hasil deteksi penyakit CVPD jeruk dengan PCR mendapati bahwa sampel yang memiliki gejala defisiensi Zn (vein banding) dan gejala defisiensi Fe (intervenal chlorosis) tidak membentuk pita pada gel agarose. Dwiastuti et.al. (2003) juga menyimpulkan bahwa gejala defisiensi Zn dan Fe tidak mempunyai gejala khas CVPD.

Hal ini berarti bahwa kemungkinan gejala yang timbul pada dua puluh lima sampel yang diuji bukan merupakan gejala khas CVPD dan ditimbulkan oleh sebab lain seperti defisiensi Fe dan Zn.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dua puluh lima sampel tanaman calon indukan jeruk keprok Tawangmangu yang diuji secara keseluruhan tidak terinfeksi oleh penyakit CVPD. Gejala yang ditimbulkan berasal dari sebab lain seperti defisiensi Zn dan Fe.

Namun, untuk dapat dijadikan indukan masih perlu dilakukan serangkaian pengujian terhadap beberapa penyakit sistemik lain yang seringkali terdapat pada jeruk seperti sporosis, exocortis, CTV, dan beberapa penyakit sistemik lain.

REFERENSI

- Balitbang Pertanian. (2005). *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Jeruk*. Jakarta: Departemen Pertanian.
- Dwiastuti, M.E., A. Triwiratno, dan U.N. Taflikah. 2003. Hubungan Gejala Blotching, Defisiensi Zn dan Fe dengan Hasil Deteksi Penyakit CVPD Jeruk dengan *Polymerase Chain reaction*. *J. Hort* 13 (2) : 131-137.
- Endarto, O. Supriyanto, A.; Wuryantini, S.; Triwiratno, A. (2006). Evaluasi Penerapan Pengelolaan Terpadu Kebun Jeruk Sehat (PTKJS) Pada Daerah Endemis CVPD. *Prosiding Seminar Nasional Jeruk Tropika Indonesia Batu*, 28 - 29 Juli 2005 : 277 -295.
- Giyanti, N. (2001). Inventarisasi dan Identifikasi Jeruk Keprok (*Citrus reticulata* Blanco) Asli Tawangmangu di Kecamatan Tawangmangu. [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret.
- Hardiyanto. (2012). Mampukan Jeruk Keprok Nasional Kita Menggeser Jeruk Impor? dari <http://balitjestro.litbang.deptan.go.id/id/476.html>. Diakses tanggal 14 Maret 2012.
- Hermawan, A., Juanda, D., & Samijan. (2002). Pola penataan pertanaman jeruk berwawasan usaha tani konservasi di lahan kering. *Prosiding Seminar Nasional Membangun Sistem Produksi Tanaman Pangan Berwawasan Lingkungan*. Pati, 7 November 2000. Soejitno, J; Sasa, I.J. ; Hermanto (eds). Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan.
- Hung, T.H., M.L. Wu, dan H.J. Su. (1999). Development of A rapid Method for the diagnosis of Citrus greening Disease using the Polymerase Chain Reaction. *J. Phytopathology* 147: 599 – 604.
- Jagoeux, S, Bove, JM, & Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the a subdivision of the Protobacteria. *Int.J.Syst. Bacteriol.*44:379-386.

- Jagoeux, S, Bove, JM, & Garnier, M. (1996). PCR detection of two “Candidatus” Liberobacter species associated with greening disease of citrus : Molecular and Celuler Probes 10 : 43-50.
- Nuryandani, E. (2012). Persebaran Dan Karakterisasi Induk Jeruk Keprok Tawangmangu Asli (*Citrus reticulata* Blanco ssp Tawangmangu). *J. Matematika, Sains, dan Teknologi* 13 (1): 33-42.
- Menteri Pertanian Republik Indonesia. (2003). Keputusan Menteri Pertanian Nomor 456/Kpts/PD.210/9/2003 tanggal 15 September 2003 tentang Pelepasan Jeruk Keprok Tawangmangu sebagai Varietas Unggul.
- Shanti, S. I. (2007). Analisis keputusan konsumen dalam mengkonsumsi jeruk lokal dan jeruk impor di ritel modern (Kasus Konsumen Giant Botani Square Bogor). [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Wahyuningsih, E. (2009). CVPD Pada Jeruk (*Citrus* spp.) dan Upaya Pengendaliannya. *Vis Vitalis*: 65-73.

UNIVERSITAS TERBUKA