

**LAPORAN PENELITIAN MADYA
BIDANG ILMU**



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

Einstivina Nuryandani, M.Si

einstivina@ut.ac.id

Drs. Sumarno, M.Pd.

marno@ut.ac.id

**UPBJJ-UT SEMARANG
UNIVERSITAS TERBUKA
2012**

LEMBAR PENGESAHAN

LAPORAN PENELITIAN MADYA BIDANG ILMU LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT UNIVERSITAS TERBUKA

1. a. Judul Penelitian : Deteksi Penyakit Sistemik *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) Pada Calon Indukan Jeruk Keprok Tawangmangu (*Citrus Reticulata* Blanco ssp. Tawangmangu) menggunakan teknik PCR
- b. Bidang Penelitian : Keilmuan
- c. Klasifikasi Penelitian : Madya
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap dan Gelar : Einstivina Nuryandani, S.Si., M.Si
- b. NIP : 19830312 200812 2 004
- c. Golongan kepegangatan : IIIa/Penata Muda
- d. Jabatan Akademik : Asisten Ahli
- Fakultas dan Unit Kerja
- e. Program Studi : Biologi/FMIPA
3. Anggota Peneliti
- a. Jumlah anggota : 1 orang
- b. Nama anggota dan unit kerja : Drs. Sumarno, M.Pd.(UPBJJ-UT Semarang)
- c. Program Studi : PGSD/FKIP
4. a. Periode Penelitian : 2012
- b. Lama Penelitian : 9 bulan
5. Biaya penelitian : Rp. 20.000.000,-
6. Sumber biaya : LPPM UNIVERSITAS TERBUKA
7. Pemanfaatan Hasil Penelitian :
- a. Seminar Nasional/Regional : Seminar regional
- b. Jurnal UT/Nasional : Jurnal nasional

Mengetahui
Kepala UPBJJ

Ketua Peneliti,



Purwaningdyah, M.W., S.H., M.Hum
NIP. 19600304 198603 2 001

Einstivina Nuryandani, S.Si., M.Si
NIP. 19830312 200812 2 004

Menyetujui,
Ketua LPPM

Menyetujui,
Kepala Pusat Keilmuan

Dra. Dewi Artati Padmo P., M.A., Ph.D.
NIP. 19610724 198710 2 001

Dra. Endang Nugraheni M.Ed., M.Si
NIP. 19570422 198503 2 001

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah, serta curahan kasih sayang-Nya semata penulis dapat menyajikan laporan penelitian keilmuan madya yang berjudul Deteksi Penyakit Sistemik *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) pada Calon Indukan Jeruk Keprok Tawangmangu (*Citrus reticulata* Blanco ssp. Tawangmangu) menggunakan Teknik PCR. Di dalam tulisan ini, disajikan upaya untuk mengetahui kesiapan calon induk jeruk keprok Tawangmangu dari segi kesehatan tanaman tersebut.

Nilai penting penelitian ini adalah dapat memberikan informasi tentang kondisi kesehatan calon induk jeruk keprok Tawangmangu dari segi ada atau tidaknya penyakit sistemik pada calon indukan tersebut sehingga dapat dipergunakan sebagai acuan dalam program penyediaan bibit tanaman jeruk keprok Tawangmangu yang sehat.

Disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, penelitian ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Semarang, 30 November 2012

Penulis,



Einstivina Nuryandani

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ABSTRAK.....	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Biologi Jeruk Keprok Tawangmangu	6
A.1. Klasifikasi Jeruk Keprok Tawangmangu.....	6
A.2. Morfologi Jeruk Keprok Tawangmangu (<i>Citrus reticulata</i> Blanco spp Tawangmangu).....	7
A.3. Persyaratan Tumbuh Jeruk Tawangmangu	8
A.4. Sejarah Perkembangan Jeruk Tawangmangu	10
A.5. Upaya Rehabilitasi Jeruk Tawangmangu.....	10
B. Tehnik PCR.....	11
C. Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD)	12

D. Deteksi infeksi CVPD menggunakan sistem PCR.....	14
BAB III METODE PENELITIAN	16
A. Waktu dan Tempat Penelitian	16
B. Bahan dan Alat	16
C. Prosedur Penelitian.....	16
C.1. Pengumpulan Sampel.....	16
C.2. Ekstraksi DNA	17
C.3. Amplifikasi DNA	17
C.4. Elektroforesis dan Pewarnaan	18
D. Analisis Data.....	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	20
A. Pengambilan Sampel.....	21
B. Pengujian Sampel Menggunakan Teknik PCR	28
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	31
DAFTAR PUSTAKA	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Denah lokasi pengambilan sampel di Desa Ngargoyoso	22
Gambar 2. Denah lokasi pengambilan sampel di Desa Gondosuli dan Blumbang.....	23
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).....	25
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).....	25
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)..	26
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).	26
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). ...	26
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.....	27
Gambar 9. Penampakan daun dari tanaman jeruk keprok Tawangmangu yang tidak menderita CVPD.	27
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.....	29

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Data 33 sampel yang diambil sampel daunnya untuk deteksi penyakit CVPD	21
Tabel 2. Dua puluh lima sampel yang diuji untuk deteksi penyakit CVPD.....	24

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 ¹⁾ Sumarno ²⁾

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

2) 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 *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) PADA CALON INDUKAN JERUK KEPROK TAWANGMANGU (*Citrus reticulata* Blanco ssp Tawangmangu) MENGGUNAKAN TEKNIK PCR

Einstivina Nuryandani¹⁾ Sumarno²⁾

¹⁾Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Terbuka

²⁾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 : Induk jeruk keprok asli Tawangmangu, PCR, CVPD

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Buah jeruk merupakan salah satu jenis buah yang memiliki citarasa, aroma, kesegaran, dan sumber vitamin bagi tubuh, sehingga buah jeruk sangat digemari masyarakat. 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% nya yang mengkonsumsi jeruk lokal. Adapun variabel yang berpengaruh terhadap keputusan mengkonsumsi jeruk lokal dan jeruk impor ada empat variabel, yaitu rasa buah jeruk, penampilan buah jeruk, jenis kelamin, dan pendapatan. Konsumsi terbesar buah jeruk ini didominasi oleh jeruk keprok.

Hal ini patut disayangkan, mengingat Indonesia juga memiliki potensi jeruk lokal yang sangat bagus. Indonesia memiliki luasan areal pertanaman jeruk yang tersebar di sentra-sentra produksi jeruk. Saat ini sentra produksi jeruk keprok banyak dijumpai di Jawa Timur khususnya di daerah Batu, Jember, dan Banyuwangi, Jawa Barat di daerah Garut, NTT di daerah Timor Timur Selatan, dan Bali. Di samping daerah tersebut, ada beberapa sentra areal jeruk yang berpotensi dikembangkan

seperti Berastagi (Sumatera Utara), Kerinci (Jambi), dan Kepulauan Selayar (Sulawesi Selatan), serta Kalimantan Timur (Hardiyanto, 2012).

Selain luasan areal pertanian, potensi jeruk keprok di Indonesia juga didukung oleh tingginya jenis plasma nutfah jeruk keprok di Indonesia. Hal ini terbukti dengan banyaknya asesi atau varietas yang telah dikoleksi di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) Batu, Jawa Timur yang berasal dari hasil eksplorasi maupun hasil introduksi. Koleksi plasmanutfah jeruk di Balitjestro sampai saat ini berjumlah 211 asesi dan merupakan koleksi terlengkap di Indonesia. Diantara koleksi yang ada, terdapat 85 asesi atau varietas jeruk keprok yang dapat digunakan sebagai materi seleksi dan perakitan varietas yang nantinya dapat dikembangkan menjadi jeruk keprok unggulan nasional (Hardiyanto, 2012).

Saat ini, Indonesia memiliki beberapa varietas unggul jeruk keprok yang kualitasnya dapat menandingi jeruk impor. Beberapa varietas 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 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 *et al.*, 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 cukup 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). Oleh karena itu diperlukan suatu penelitian menggunakan teknik PCR untuk mendeteksi infeksi CVPD dan memastikan bahwa asesi-asesi tanaman yang ditemukan dapat digunakan sebagai calon indukan yang potensial untuk pengembangan tanaman jeruk keprok Tawangmangu.

B. Perumusan Masalah

1. Adanya keterbatasan jumlah pohon induk jeruk keprok Tawangmangu karena serangan CVPD.
2. Adanya indikasi asesi-asesi calon pohon induk yang terinfeksi CVPD.

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk melakukan identifikasi infeksi penyakit CVPD melalui teknik PCR pada asesi-asesi calon pohon induk jeruk keprok Tawangmangu yang ditemukan. Selain itu penelitian ini juga bertujuan untuk mempersiapkan calon indukan tanaman jeruk keprok yang bebas penyakit sistemik CVPD.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat:

1. Memberikan manfaat dalam usaha penyediaan pohon induk jeruk keprok Tawangmangu.
2. Memberikan kontribusi dalam pengembangan jeruk keprok Tawangmangu.
3. Menjaga kelestarian plasma nutfah jeruk keprok Tawangmangu.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Biologi Jeruk Keprok Tawangmangu

Jeruk keprok Tawangmangu merupakan salah satu jeruk lokal komersial selain jeruk keprok Garut (Jawa Barat), Batu 55 (Jawa Timur), Pulung (Ponorogo), Madura (Pulau Madura), dan Tejakula (Bali). Berikut merupakan karakteristik jeruk keprok Tawangmangu (Hardiyanto *et al.*, 2007).

A.1. Klasifikasi Jeruk Keprok Tawangmangu

Klasifikasi botani tanaman jeruk Tawangmangu menurut Verheij dan Coronel (1992) dan Van Steenis (1975) adalah sebagai berikut.

- Divisi : Spermatophyta
- Sub divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonae
- Ordo : Rutales
- Keluarga : Rutaceae
- Genus : *Citrus*
- Spesies : *Citrus nobilis* Lour.
- Sub Spesies : Tawangmangu
- Sinonim : *Citrus reticulata* L., *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus deliciosa*, *Citrus chrysocarpa*.
- Nama daerah : Jeruk Keprok (Melayu dan Jawa, Jeruk Jepun (Sunda dan Sumatra), dan Jeruk Maseh

A.2. Morfologi Jeruk Keprok Tawangmangu (*Citrus reticulata* Blanco spp Tawangmangu)

Jeruk keprok Tawangmangu merupakan tumbuhan jenis pohon dengan tinggi mencapai 2-8 meter (Van Steenis, 1975). Penelitian Giyanti (2001) menyebutkan bahwa tinggi pohon jeruk keprok Tawangmangu berkisar antara 4,86 – 8,97 m. Sedangkan penelitian oleh Nuryandani (2012) menemukan bahwa pohon ini dapat mencapai ketinggian 9,24 meter.

Pohon ini memiliki ranting yang tidak berduri (Van Steenis, 1975 dan Giyanti, 2001). Diameter batangnya antara 8,27 – 24,82 cm (Giyanti, 2001). Penelitian oleh Nuryandani (2012) menyebutkan bahwa diameter batang tanaman ini dapat mencapai 30,57 cm. Tajuk tanaman 95%-nya memiliki bentuk tidak beraturan, hanya 5% yang mempunyai bentuk payung. Sedangkan bentuk percabangan semua menunjukkan asimetris (Giyanti, 2001).

Van Steenis (1975) menjelaskan bahwa tangkai daun bersayap sangat sempit sampai boleh dikatakan tidak bersayap, panjangnya 0,5 - 1,5 cm. Helaian daun tanaman ini berbentuk bulat telur memanjang, elliptis atau berbentuk lanset dengan ujung tumpul, melekok ke dalam sedikit, tepinya bergerigi beringgit sangat lemah dengan panjang 3,5-8 cm. Tangkai daunnya selebar 1 - 1,5 mm. Bunganya mempunyai diameter 1,5-2,5 cm, berkelamin dua, dan daun mahkotanya berwarna putih.

Warna kulit buah jeruk keprok Tawangmangu dari hijau sampai kuning tua, hal ini tergantung dari umur buah. Berat buah rata-rata jeruk keprok asli Tawangmangu 62,98 gram. Buah jeruk keprok asli Tawangmangu mempunyai aroma dan bau yang tajam, serta bentuk dari buah terdapat

tonjolan, seperti pusar, tekstur lembut, dan lunak. Buah yang masak sempurna rasanya manis dengan aroma yang tajam (Giyanti, 2001).

Menurut Van Steenis (1975) buah jeruk keprok berbentuk bola tertekan dengan tebal kulitnya 0,2 - 0,3 cm. Warna daging buah oranye (Van Steenis, 1975 dan Giyanti, 2001) dengan rata-rata jumlah juring 10,5 (Giyanti, 2001). Diameter buah rata-rata adalah 5,19 cm (Giyanti, 2001) atau 5-8 cm (Van Steenis, 1975) dengan bentuk buah bulat berlekuk dan di dalamnya terdapat rongga udara yang cukup lebar (Giyanti, 2001).

Bentuk biji buah jeruk keprok Tawangmangu adalah bulat pipih dengan warna biji krem/coklat muda (Giyanti, 2001). Biji jeruk keprok Tawangmangu bersifat poliembrional, artinya dalam 1 biji terdapat lebih dari 1 embrio yang dapat tumbuh. Embrio yang berasal dari hasil pembuahan disebut embrio genetik, sedangkan embrio yang bukan berasal dari hasil pembuahan disebut embrio somatik. Embrio somatik mempunyai sifat sama dengan induknya (Utama, 2002).

A.3. Persyaratan Tumbuh Jeruk Tawangmangu

Jeruk keprok seperti Batu, Garut, dan Tawangmangu sangat baik diusahakan di tempat-tempat yang ketinggiannya 700 – 1200 meter di atas permukaan laut (Sarwono,1993). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jeruk Tawangmangu yang ditanam pada ketinggian lebih dari 1.000 m dpl pada Tanah Acrudoxin Hapludands dengan curah hujan rata-rata sebesar 3.166 mm/tahun mempunyai kualitas internal yang lebih baik dibandingkan dengan jeruk Tawangmangu yang ditanam pada ketinggian kurang dari 1.000 m dpl pada tanah Typic Dystrudepts dengan curah hujan rata-rata sebesar 2.715 mm/tahun (Apriyana *et al.*, 2009).

Menurut Apriyana *et al.* (2009), jeruk keprok Tawangmangu dengan kualitas yang baik menghendaki suhu sekitar 19⁰C pada saat pembungaan, serta suhu yang lebih tinggi dan stabil sekitar 22-23⁰C dan radiasi sekitar 400 kal/cm² saat memasuki fase pembentukan buah sampai dengan pematangan buah .

Pada ketinggian lebih dari 1.000 m dpl total padatan terlarut dan angka asam nyata dipengaruhi oleh sebagian unsur makro, seperti N, P, K dan unsur mikro, seperti Fe, B, dan Cu, serta beberapa unsur mineral pasir, seperti Opak, Gelas Vulkanis, dan Labradorit. Pada ketinggian kurang dari 1.000 m dpl total padatan terlarut nyata dipengaruhi oleh KTK (Kapasitas Tukar Kation), Al (Aluminium), bahan organik, unsur mikro, serta mineral Opak, Gelas Vulkanis, dan Labradorit. Untuk angka asam nyata dipengaruhi oleh unsur-unsur makro. Sedangkan kandungan gula nyata dipengaruhi oleh ketersediaan Hornblende, Augit, dan Hiperstin. Dengan demikian jeruk Tawangmangu lebih cocok bila dibudidayakan pada tanah Typic Dystrudepts (tanah dengan tekstur berlempung liat berpasir) dengan ketinggian lebih dari 1.000 m dpl (Apriyana *et al.*, 2009).

Lahan ideal untuk menanam jeruk keprok yaitu lahan yang memiliki lapisan tanah yang dalam, hingga kedalaman 150 cm tidak ada lapisan kedap air, kedalaman air tanah \pm 75 cm, tekstur lempung berpasir, dan pH \pm 6. Jika pH tanah dibawah 5, unsur mikro dapat meracuni tanaman dan sebaliknya tanaman akan kekurangan jika pH di atas 7 (Sutopo, 2011). Lokasi yang cocok untuk budidaya jeruk keprok Tawangmangu, meliputi wilayah Kecamatan Karangpandan, Ngargoyoso, Tawangmangu, Jatiyoso, Jenawi, serta Matesih (Ernawati, 2007).

A.4. Sejarah Perkembangan Jeruk Tawangmangu

Tawangmangu merupakan sentra buah jeruk asli Tawangmangu dan sempat mengalami kejayaan pada tahun 1980 -1983 (Giyanti, 2001). Pada awal dekade 1980-an (Ernawati, 2007) atau pada tahun 1984 menurut Giyanti (2001), serangan *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) telah memusnahkan ratusan ribu batang tanaman jeruk keprok produktif yang dibudidayakan di wilayah Karanganyar.

Namun, tanaman tidak dapat langsung ditanam ulang di lokasi yang sama. Karena membutuhkan waktu belasan hingga puluhan tahun untuk menghilangkan pengaruh CVPD yang sudah merambah ke lahan yang semula ditanami jeruk keprok. Sejak saat itu, produksi jeruk keprok Tawangmangu hampir terhenti total (Ernawati, 2007).

A. 5. Upaya Rehabilitasi Jeruk Tawangmangu

Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Ungaran sejak 1996/1997-1999/2000 telah melaksanakan penelitian untuk mengembalikan sentra produksi jeruk keprok Tawangmangu. Penelitian dilaksanakan di Desa Sepanjang, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar (Hermawan, *et al.*, 2002).

Rehabilitasi jeruk keprok Tawangmangu secara besar-besaran juga telah dilakukan sejak beberapa tahun lalu yang dimotori Dinas Pertanian (Dispertan) Jateng. Sedikitnya 200.000 batang induk jeruk keprok setiap tahun didistribusikan kepada para petani di berbagai wilayah, khususnya di Bumi Intanpari. Kendati demikian, hasilnya belum optimal karena virus CVPD masih mengancam. Obat pemberantas CVPD hingga saat ini belum

ditemukan. Upaya menghindari penyebaran CVPD dapat dilakukan dengan karantina dan membakar tanaman yang menunjukkan gejala terserang (Ernawati, 2007).

Endarto *et al.*, (2006) menyatakan bahwa penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) merupakan penyakit penting yang sangat merugikan dalam budidaya tanaman jeruk. Program rehabilitasi sudah dilaksanakan namun penyakit ini masih menginfeksi ulang karena sumber-sumber penyakit masih terdapat di daerah sentra. Strategi pengendalian hama dan penyakit di kebun jeruk telah diformulasikan dalam Pengelolaan Terpadu Kebun Jeruk Sehat (PTKJS).

B. Tehnik PCR

Teknik PCR ditemukan pertama kali oleh Kary Mullis pada pertengahan tahun 1980. Penemuan ini mengakibatkan perubahan sangat cepat di bidang genetika molekuler dan kemungkinan pendekatan baru dalam mempelajari analisis gen (Watson *et al.*, 1992). 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 ekspresi gen: mRNA dikonversi menjadi cDNA memerlukan enzim reverse transkriptase 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).

Beberapa tahapan dalam PCR menurut Sambrook dan Russell (2001), antara lain.

1. Tahap denaturasi

Pada tahap ini, temperatur dinaikkan pada suhu mendekati titik didih. Hal ini dilakukan dengan tujuan *double strand* DNA akan terpisah menjadi *single strand* DNA, yang nantinya berfungsi untuk menyisipkan primer.

2. Tahap annealing (penempelan primer)

Ketika suhu diturunkan di sekitar suhu 50-65⁰C, DNA mulai berikatan kembali. Pada saat inilah kesempatan dari primer untuk menempati posisinya sesuai dengan susunan basa pada DNA, sehingga akan terbatas jumlah penempelan dari DNA awal. Suhu annealing ini berbeda-beda untuk masing-masing proses PCR, ini bergantung pada T_m masing-masing primer yang digunakan.

3. Tahap ekstensi

Tahap ini disebut juga tahap perpanjangan. Dengan bantuan enzim taq Polymerase, DNA baru disusun dengan menggunakan dNTP sebagai bahan baku dan *DNA template* sebagai cetakan.

C. Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD)

Penyakit CVPD merupakan penyakit terpenting tanaman jeruk (Yuniti, 2001). Penyakit CVPD disebut juga sebagai penyakit *Hualungbin* atau *Greening Disease* (Triwiratno *et al.*, 1999.) Penyakit ini disebabkan oleh organisme mirip bakteri yang belum dapat dikulturkan yaitu *Liberobacter* sp. Organisme yang menyerang tanaman jeruk di Indonesia umumnya adalah *Liberobacter asiaticum*. *Liberobacter asiaticum*

merusak bagian floem dari tanaman jeruk. Infeksi ini ditularkan oleh serangga *Diaphorina citri* (Yuniti, 2001; Wahyuningsih, 2009; dan Triwiratno *et al.*, 1999).

Penyakit ganas pada jeruk pertama-tama diketahui terdapat di Jawa Barat dan Jawa Tengah. Sekarang penyakit ini telah didapatkan pula di Sumatra (Wahyuningsih, 2009). Dewasa ini jeruk Garut dapat dikatakan punah karena CVPD, demikian juga dengan jeruk Tawangmangu. Di beberapa lokasi penyakit sedemikian meluasnya sehingga tempat-tempat ini dianggap sebagai daerah endemis yaitu Gumilia (Cilacap), Junggo dan Puntan (Batu), Pulung dan Plaosan (Magetan), Wonorejo/Karangpawitan (Garut), Kutoarjo, Ogan Komering Ilir dan beberapa lokasi di Lampung. Di Pulau-pulau lain penyakit ini ditemukan di Pontianak, Ujung Pandang, Banteng, dan Jeneponto (Tirtawidjaya, 1983).

Tanaman yang terinfeksi CVPD memiliki beberapa gejala. Gejala tersebut secara garis besar dapat dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu gejala luar dan gejala dalam. Gejala luar, antara lain daun dewasa berwarna kekuning-kuningan pada daun dewasa, seperti halnya kekurangan unsur Zn, Mn, dan Fe. Tulang-tulang daun halus berwarna lebih hijau daripada jaringan helaian daunnya (Wahyuningsih, 2009).

Apabila penyakit telah sampai pada stadium lanjut daun menjadi lebih kecil, kaku, lebih tebal, menjadi kuning pada sebagian atau seluruh tajuk, dan sering pula berbercak-bercak klorosis. Gejala ini mirip dengan gejala kelaparan seng (Zn). Pada daun-daun dewasa yang mengalami pertumbuhan yang cukup pesat, tulang-tulang daun yang halus berwarna lebih gelap sehingga kontras dengan daging daun yang berwarna kuning. Sedang gejala dalam, apabila dibuat irisan melintang dari ibu tulang daun atau tangkai daun yang helaian daunnya memperlihatkan gejala, akan terlihat kelainan pada floemnya. Jaringan floem daun dewasa memperlihatkan gejala yang

khas yaitu jauh lebih tebal daripada jaringan floem daun yang berwarna hijau (Wahyuningsih, 2009).

D. Deteksi infeksi CVPD menggunakan sistem PCR

Keberadaan *Liberobacter asiaticum* sebagai penyebab penyakit CVPD sulit untuk dideteksi keberadaannya karena belum dapat dikulturkan sehingga sulit untuk menentukan tanaman yang sehat dan yang telah terinfeksi dengan prosedur umum (Yuniti, 2001; Wahyuningsih, 2009; dan Triwiratno *et al.*, 1999). Selain itu, hal ini juga disebabkan oleh rendahnya jumlah bakteri tersebut dalam tubuh inang dan distribusinya yang tidak merata dalam tubuh inang (Hung *et al.*, 1999).

Salah satu metode yang secara tepat dan cepat dapat mendeteksi keberadaan agen penyebab penyakit CVPD ini adalah dengan menggunakan teknik PCR. Yuniti (2007) yang melakukan deteksi penyakit CVPD pada tanaman jeruk dengan menggunakan teknik PCR mendapati bahwa bakteri *Liberobacter asiaticum* terdeteksi hanya pada bagian tanaman yang menunjukkan gejala pada tanaman yang baru sedikit menunjukkan gejala infeksi dan dapat mendeteksi pada seluruh bagian tanaman pada tanaman yang telah terserang berat.

Penelitian oleh Hung *et. al*, (1999) menggunakan satu set primer yang diberi nama 226-primer pair untuk mendeteksi adanya infeksi pada 10 jenis tanaman jeruk dari seluruh Asia mendapatkan bahwa teknik ini secara cepat dan efektif dapat mendeteksi infeksi CVPD dalam waktu 6 jam. Senada dengan hal ini, penelitian oleh Triwiratno *et. A.*, (1999) yang mencoba mendeteksi penyakit ini menggunakan primer spesifik dan primer universal berhasil mendeteksi penyakit tersebut. Penelitian ini juga mendapati bahwa primer yang spesifik (OI1, OI2, OA1) lebih efektif dan spesifik dalam mendeteksi penyakit ini dibandingkan primer universal (fD1/rPI). Sedangkan

Li *et. Al*, (2006) juga berhasil mendeteksi CVPD pada jeruk manis menggunakan teknik PCR .

BAB III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret sampai November 2012 di wilayah sekitar Kecamatan Tawangmangu dan Ngarogoyoso, Karanganyar, Jateng, laboratorium Balitjestro, Tlekung, Malang, dan UPBJJ-UT Semarang.

B. Bahan dan Alat

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 seperti *vein banding*, *intervenal chlorosis*, maupun *blotching*. Bahan lainnya adalah tabung eppendorf, 1% -merkaptotanol, CIAA, isopropanol, alkohol 70%, buffer TE, 1 μ l 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, Ependorf, mikropipet, sentrifuse, alat elektroforesis, pH meter, UV transluminator, penangas air/waterbath, mesin PCR, kamera digital, timbangan digital, mortar, dan microwave.

C. Prosedur Penelitian

C.1. Pengumpulan Sampel

Daun muda yang telah berkembang sempurna, 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 tulang daunnya sebanyak 0,5 gram.

C.2. Ekstraksi DNA

Tulang daun dipotong kecil-kecil (0,2-0,5 gram). Sampel dimasukkan kedalam eppendorf yang berisi 1500 µl buffer isolasi DNA + 30 µl merkaptoetanol, kemudian 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 $\pm 750 \mu\text{l}$.

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 $\pm 600 \mu\text{l}$ diambil, kemudian ditambah isopropanol dingin sebanyak jumlah supernatannya kemudian 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 Ependorf.

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.

C.3. Amplifikasi DNA

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan primer yang didesain untuk mengamplifikasi 16S rDNA dari bakteri, dengan 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' (Jagoeuix *et al.*, 1996). Campuran untuk PCR dalam 20 µl berisi MMR 10 µl, Primer forward = 1 µl, Primer reverse = 1 µl, H₂O 7 µl, dan DNA sampel 1 µl. 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 92°C selama 60 detik (denaturasi), 60°C selama 60 detik (annealing), dan 72°C selama 90 detik (ekstensi/pemanjangan) dengan siklus terakhir (post ekstension) 72°C selama 10 menit.

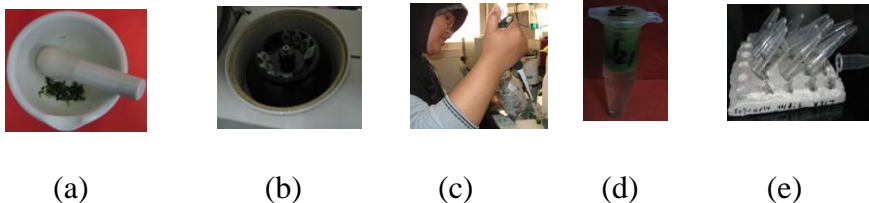
C.4. Elektroforesis dan Pewarnaan

Produk hasil amplifikasi sebanyak 5-8 µl 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).

Tahapan-tahapan pengumpulan data dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 1. Proses pengumpulan sampel daun terinfeksi



Gambar 2. Proses ekstraksi DNA (a) proses penggerusan sampel (b) proses sentrifugasi, (c) penambahan merkaptotanol, dan (e) pengeringan DNA

D. 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 infeksinya.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pengambilan Sampel

Proses pengumpulan sampel yang akan diuji pada calon indukan pohon jeruk keprok Tawangmangu dilakukan secara sederhana. Pertama-tama tanaman diamati daun muda yang memiliki ciri-ciri terkena penyakit CVPD, kemudian daun ini dipetik dan dimasukkan ke dalam kantong plastik untuk sampel, yang telah diberi kapas basah, kemudian ditutup dan disegel agar kelembapannya terjaga.

Karena beberapa pohon jeruk keprok Tawangmangu memiliki habitus berupa pohon dengan ketinggian 3 hingga belasan meter. Untuk beberapa pohon sampel yang memiliki ketinggian lebih dari 4 meter, sampel daun muda tidak dapat dipetik secara manual, sehingga harus menggunakan alat bantu berupa tangga ataupun galah.

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.

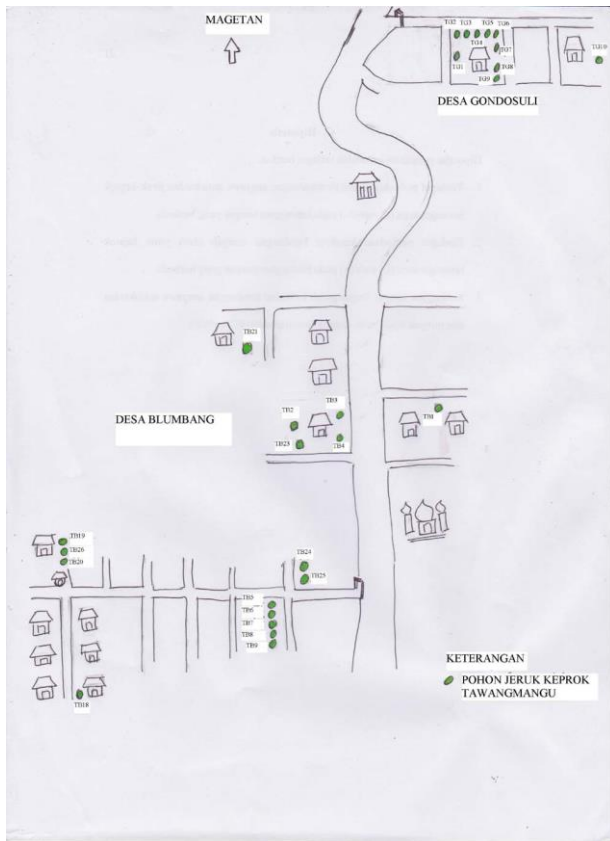
Ketiga puluh tiga sampel yang diambil memiliki umur yang beragam antara satu tahun hingga sekitar tiga puluh tahun. Meskipun memiliki perawakan yang berbeda-beda, dari wawancara dengan pemilik tanaman, sampel-sampel tanaman ini merupakan tanaman jeruk keprok asli Tawangmangu.

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)

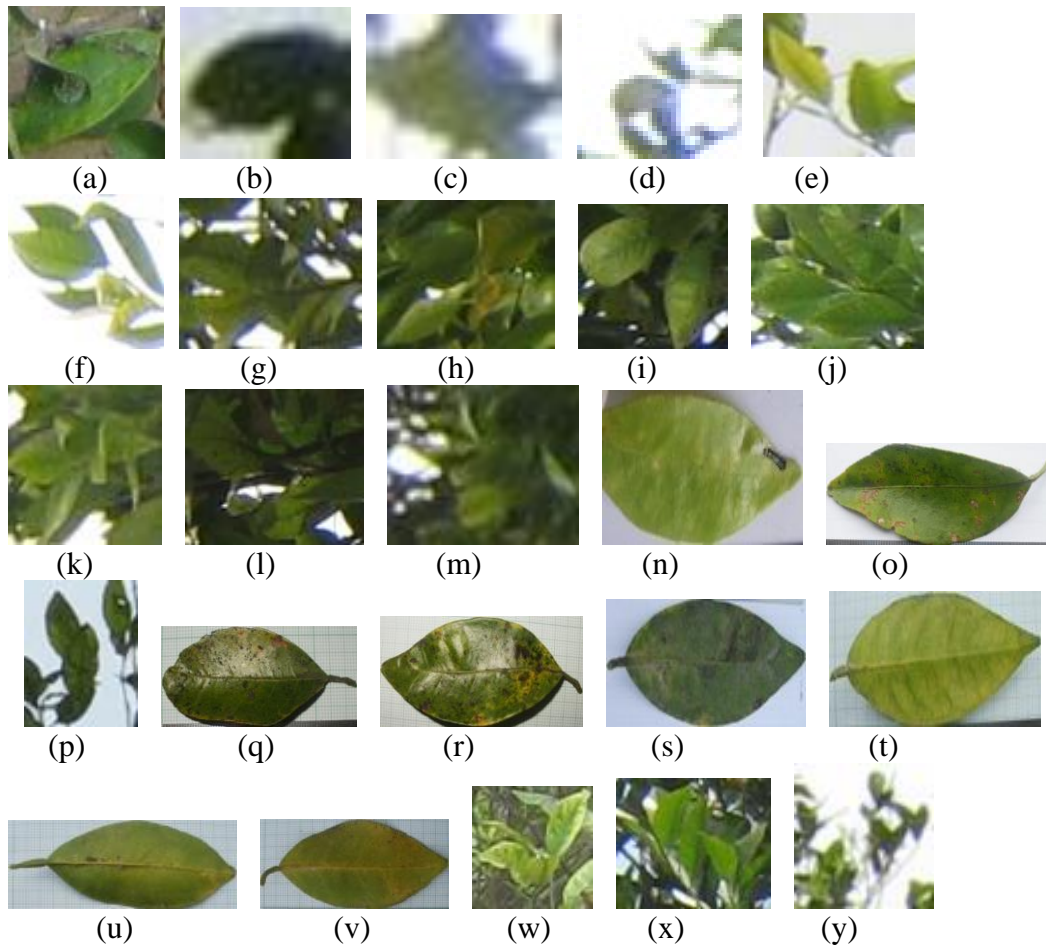
Gambar 6. Penampakan morfologi (a) Sampel 16 (Asesi TB23), (b) Sampel 17 (Asesi TB3), (c) Sampel 18 (Asesi TB4), (d) Sampel 19 (Asesi TB1), dan (e) Sampel 20 (Asesi TB5).



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

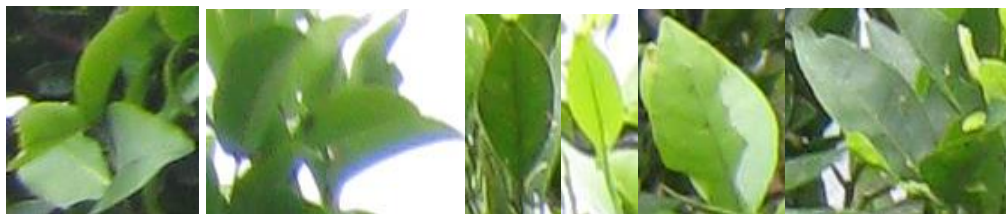
Gambar 7. Penampakan morfologi (a) Sampel 21 (Asesi TB6) dan Sampel 22 (Asesi TB7), (b) Sampel 23 (Asesi TB19), (c) Sampel 24 (Asesi TB20), dan (d) Sampel 25 (Asesi TB18)

Gambar berikut merupakan penampakan daun pada pohon 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.

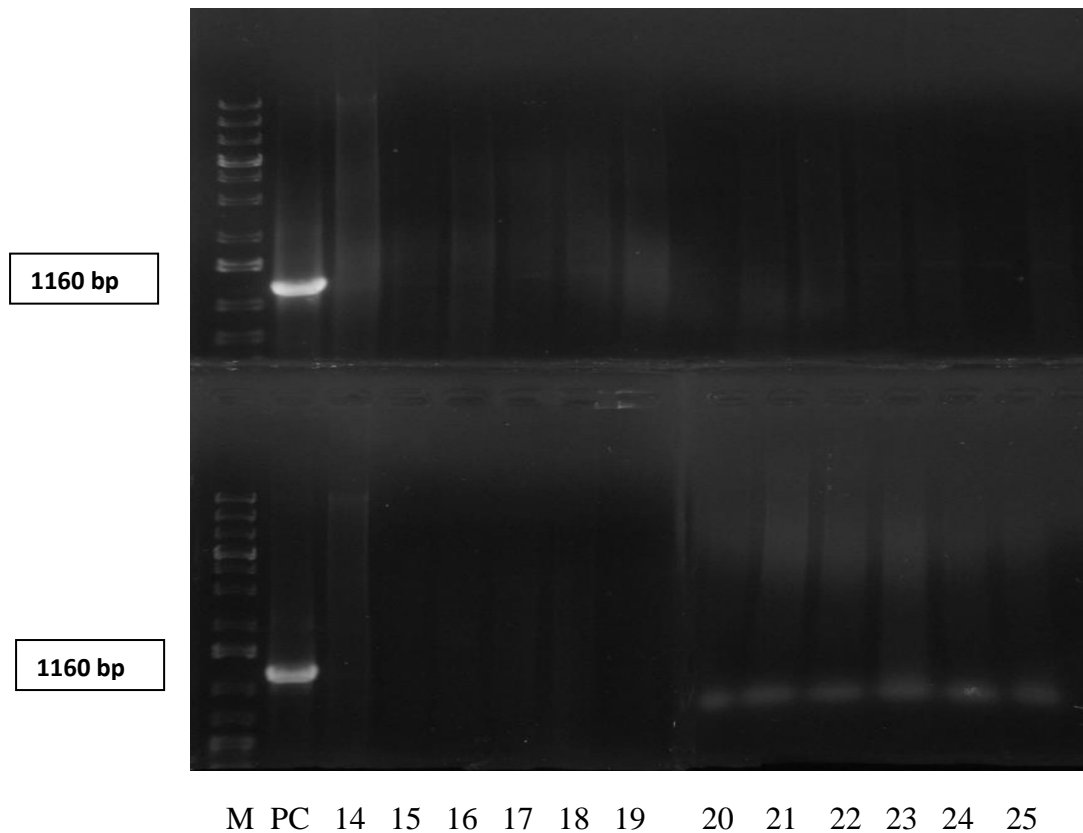
Daun-daun jeruk keprok Tawangmangu yang digunakan sebagai sampel pada pengujian penyakit CVPD memiliki ciri-ciri antara lain daun dewasa berwarna kekuning-kuningan, tulang-tulang daun berwarna hijau kontras dengan warna daging daun yang menguning, dan pada beberapa daun pada beberapa daun mengalami bercak-bercak 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.

B. Pengujian Sampel Menggunakan Tehnik PCR

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.

BAB V 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.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriyana, Y., Haryono, dan Suciantini. (2009). Analisis Peubah Iklim dan Tanah Sebagai Faktor Penentu Mutu Internal Jeruk Keprok Tawangmangu. *J. Tanah dan Iklim* no 29.
- 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.
- Ernawati, R. (2007). Jeruk Keprok Tawangmangu, Dulu, Kini, dan Esok. <http://www.solopos.net/index.detail.asp?id=23817>. Diakses tanggal 12 Desember 2010.
- 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). Mampukah Jeruk Keprok Nasional Kita Menggeser Jeruk Impor? dari <http://balitjestro.litbang.deptan.go.id/id/476.html>. Diakses tanggal 14 Maret 2012.
- Hardiyanto, E. Mujiarto, & E.S.Sulasmi. (2007). Kekerabatan Genetik Beberapa Spesies Jeruk Berdasarkan Taksonometri. *J. Hortikultura* 17 (3): 203-216.
- 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.
- Li, W., J. S. Hartung , & L. Levy. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104–115.
- 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.
- Sambrook, J., & Russell, D. W., (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 3rd edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarwono, B. (1993). *Jeruk dan Kerabatnya*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- 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.
- Sutopo. (2011). Panduan Budidaya Tanaman Jeruk. Artikel. www.balitjestro.litbang.deptan.go.id/id/234 html. Diakses tanggal 11 Desember 2011.
- Tirtawidjaya, S. (1983). Citrus Vein Phloem Degeneration Virus : Penyebab citrus chlorosis di Jawa. [Disertasi]. Bogor: Intitut Pertanian Bogor.
- Triwinanto, A., M.E. Dwiastuti, dan A. Supriyanto. (1999). Quick detection of citrus greening by PCR method with spesific and universal primers. *Indonesian Journal of Biotechnology*: 271 -275.
- Utama, D.S. (2002). Pengaruh Pemberian Ekstrak Tauge dan Air Kelapa terhadap Multiplikasi Jeruk Keprok Tawangmangu [Skripsi]. Surakarta : Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret.

- Van Steenis, C.G., (1975). *Flora Voor de Scholen in Indonesie*, diterjemahkan oleh Sorjowinoto, M., edisi VI, Jakarta: PT. Pradnya Paramitha.
- Verheij, E. W. dan R. E. Coronel. (1992). *Prosea Sumber Daya Nabati Asia Tenggara 2: Buah-buahan yang Dapat Dimakan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Wahyuningsih, E. (2009). CVPD Pada Jeruk (*Citrus* spp.) dan Upaya Pengendaliannya. *Vis Vitalis*: 65-73.
- Watson JD, Gilman M, & Witkowsky J. (1992). *Recombinant DNA*. 2nd edition. New York: Freeman.
- Yuniti, I. G.A. D. (2007). Penyebaran bakteri *Liberobacter asiaticum* pada tanaman jeruk dalam beberapa tingkat gejala serangan penyakit CVPD. *Widyanata 2* (2): 4 -22.

