

Peningkatan Kemampuan Beberapa Antibiotik dalam Eliminasi Bakteri *Liberibacter asiaticus* untuk Mendapatkan Bibit Jeruk Bebas CVPD

Capability Increasing of Some Antibiotics for Eliminate Liberibacter asiaticus Bacteria to Find the Free-CVPD Citrus Seedling

Siti Zubaidah

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang

ABSTRACT

Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD), is considered to be one of the most serious diseases of citrus, having been responsible for the loss of tens millions trees. It is caused by phloem-limited bacteria, *Liberibacter asiaticus* which are transmitted by citrus psyllids. The bacteria could be found in the budwood as the matter for producing seedling. The use of free-pathogen seedling for citrus plantation was the one of the disease control mechanism. Founding the way to eliminate CVPD bacteria from budwood to produce the free-pathogen seedling was the goal of this research. The study was also compared to the previously research. The research used budwood from *L. asiaticus* infected-Siem and healthy-Japansche Citroen (JC) which were detected by PCR (polymerase chain reaction). Before grafting, budwoods was soaked in penicillin, kanamycine, tetracyclin, and choramphenicol with concentration 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 ppm and time of soaking was 25 – 30, 40 – 45, and 55 – 60 minutes. The detection of *L. asiaticus* in the leaves of seedlings was done by PCR. The research showed that (1) penicillin from 400 ppm to 1000 ppm and tetracyclin from 300 ppm to 1000 ppm with time of soaking 25 – 30, 40 – 45, and 55 – 60 minutes, could eliminate the CVPD bacteria from budwood; (2) kanamycine could not eliminate the CVPD bacteria and causes phytotoxis in budwood; (3) choramphenicol could not eliminate the CVPD bacteria. The penicillin and tetracyclin results different with previously research, but kanamycine and choramphenicol not different with previously research. The information from this research supports that some antibiotics could eliminate the bacteria from budwood for producing the free-CVPD seedlings.

Keywords: Antibiotic, *Liberibacter asiaticus*, CVPD citrus seedling

PENDAHULUAN

Jeruk merupakan salah satu jenis buah-buahan yang paling banyak digemari oleh masyarakat Indonesia, dan selalu tersedia sepanjang tahun karena tanaman jeruk tidak mengenal musim berbunga yang khusus. Populasi tanaman mengalami peningkatan dari tahun ke tahun, namun sampai saat ini produk buah jeruk belum memenuhi harapan karena masalah produktivitas. Produktivitas jeruk di Indonesia sampai saat ini masih rendah yaitu berkisar 8,6 – 15 ton/ha/tahun, sedangkan di daerah tropik lainnya mencapai 20 ton/ha, bahkan di daerah produsen utama jeruk dunia di daerah subtropik dapat mencapai 40 ton/ha (Ditlin 1994). Hal ini disebabkan oleh keterbatasan pengetahuan para petani dalam bercocok tanam yang benar, selain kendala adanya serangan penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*). Di Indonesia, serangan CVPD paling parah pernah terjadi di Sambas (Kalimantan Barat) dan Tejakula (Bali) pada tahun 1985, yang

mengakibatkan terjadinya kematian ranting-ranting muda (Nurhadi *et al.* 1989).

CVPD adalah salah satu penyakit tanaman jeruk, yang sering dikenal dengan *citrus greening*, *yellow shoot*, *leaf mottle* (Filipina), *likubin* atau *decline* (Taiwan), *citrus dieback* (India), *blotchy-mottle* atau *mottling disease* (Afrika); dengan nama internasional *huanglongbing* (China), karena diketahui berasal dari China sejak tahun 1919. CVPD menyerang hampir semua kultivar jeruk di sebagian besar negara Asia dan Afrika. CVPD disebabkan oleh bakteri Gram negatif *Liberibacter* dan disebarkan oleh serangga vektor *Diaphorina citri* Kuw. (Ahmad *et al.* 2008). Gejala khas CVPD adalah bercak-bercak kekuningan (*blotching*, *mottle*) tidak teratur atau klorosis pada daun. Bercak pada bagian atas dan bawah daun adalah sama. *Blotching* berkembang mulai bagian ujung tanaman pada daun dewasa (*yellow shoot*). Tidak ada gejala yang jelas pada batang, cabang dan ranting pohon. Buah menjadi lebih

kecil, tidak simetris (*lop sided*), banyak yang jatuh secara prematur, kadang *red nose* (warna orange pada bagian dekat tangkai). Seringkali ujung styler tetap hijau atau keseluruhan buah tetap hijau pucat, oleh karena itu dikatakan *greening*. Buah rasanya masam atau lebih pahit dan biji banyak yang abortus (Kim & Wang 2009; Planck 1999).

CVPD menyebabkan produksi berkurang atau gagal, memperpendek masa hidup tanaman, dan dapat mematikan tanaman dalam 1-2 tahun. Kerugian yang diakibatkan CVPD mencapai puluhan sampai ratusan milyar rupiah per tahun. CVPD juga menyebabkan berkurangnya keragaman jeruk karena jeruk tawangmangu (Semangun 1994), garut (Mawardi 2003), malangke (Taslim 2004) dan limau kamang (Subhan 2008) dapat dikatakan punah.

Upaya-upaya pengendalian CVPD di Indonesia yang telah dilakukan cukup beragam, di antaranya dengan infus larutan antibiotik oksitetra-siklin, pemotongan bagian tanaman bergejala, pemasangan *yellow trap* untuk serangga vektor, penyemprotan dan penyaputan insektisida pada batang, eradikasi tanaman terinfeksi diikuti dengan masa tanpa jeruk selama sekitar satu tahun, pelarangan pengangkutan bibit antar pulau, dan pengadaan bibit bebas CVPD (Semangun 1994; Kadiono 1987). Namun demikian sampai saat ini CVPD ternyata masih menyerang tanaman jeruk. Kondisi tersebut diakibatkan oleh berbagai hal di antaranya infus larutan antibiotik tidak menyembuhkan tanaman sakit, memerlukan biaya mahal, dapat menimbulkan resistensi patogen terhadap antibiotik (Semangun 1994). Produksi bibit bebas penyakit melalui metode *shoot tip grafting* dengan hasil akhir mata tunas yang distribusinya dikelola dinas (Soelarlo 1996) juga menemui kendala karena patogen dari tanaman tidak tereliminasi seluruhnya (Bove 1995) dan keengganan petani menggunakan mata tunas dari dinas (komunikasi pribadi dengan beberapa petani dan penangkar bibit). Dengan demikian penggunaan bibit terinfeksi masih menjadi masalah, sehingga perlu dicari upaya eliminasi patogen dengan cara lain.

Penularan yang sering terjadi adalah melalui bibit yang berasal dari *grafting* mata tunas terinfeksi (Hung *et al.* 2000), sehingga salah satu upaya pengendalian CVPD adalah penggunaan bibit bebas patogen. Bibit bebas

patogen hanya dapat dihasilkan dari bahan tanam yaitu biji dan mata tunas yang bebas patogen, tetapi bahan tanam dari tanaman induk yang sehat sulit diperoleh petani karena banyak tanaman telah terinfeksi bakteri CVPD. Biji sebagai bahan tanaman bawah untuk *grafting*, diketahui tidak menularkan penyakit (Zubaidah 2004). Zubaidah (2004) juga membuktikan bahwa mata tunas sebagai bahan bibit tanaman memang merupakan sumber infeksi patogen yang penting, sehingga keberadaan patogen dalam mata tunas sebagai bahan *grafting* untuk memproduksi bibit jeruk perlu dikendalikan.

Berbagai upaya dilakukan untuk mendapatkan bahan tanam yang diharapkan bebas bakteri CVPD, di antaranya dengan perendaman bahan tanam dalam larutan antibiotik. Antibiotik adalah zat kimia yang dihasilkan mikroorganisme tertentu, yang dalam jumlah amat kecil bersifat menghambat pertumbuhan (bersifat bakteriostatik) atau membunuh mikroorganisme yang lain (bersifat bakterisida) (Todar 2003). Sifat bakteriostatik atau bakterisida tidak mutlak karena tergantung beberapa hal, antara lain konsentrasi antibiotik, lama kontak, jenis dan fase pertumbuhan bakteri, dan ukuran populasi bakteri (Coppoc 1996).

Antibiotik tertentu diketahui dapat mengeliminasi bakteri pada mata tunas. da Graca (1991) menyatakan bahwa larutan tetrasiklin hidroklorida dan penisilin-carbendazin dapat mengeliminasi bakteri CVPD, tetapi tetrasiklin hidroklorida dapat mengakibatkan terjadinya fitotoksik. Mata tunas yang direndam dalam larutan tetrasiklin hidroklorida 250 ppm ternyata tidak dapat hidup setelah *grafting*. Norminet Philippines (2001) menganjurkan perendaman batang bermata-tunas dalam tetrasiklin 1.000 ppm selama 25-30 menit, sebelum *digrafting*. Namun demikian, informasi tentang proses dan hasil perlakuan antibiotik pada mata tunas masih kurang sehingga perlakuan tersebut perlu dicoba.

Antibiotik seperti penisilin, tetrasiklin dan antibiotik lain, tersedia banyak di pasaran, dalam kondisi yang tidak murni. Beberapa macam antibiotik di pasaran tersebut telah dicoba oleh Zubaidah (2004) untuk mengendalikan *L. asiaticus* pada mata tunas sebagai bahan pembuatan bibit jeruk. Hasilnya ternyata kurang menggembirakan karena masih

banyak bibit yang terdeteksi mengandung bakteri CVPD dan mata tunas mengalami fitotoksis (data tidak dipublikasikan). Hasil yang tidak jauh berbeda ditemukan pula pada saat digunakan antibiotik murni (Zubaidah 2004), data disertakan pada bagian Hasil sebagai pembanding hasil penelitian ini. Ada dugaan bahwa kegagalan pada penelitian tersebut disebabkan oleh karena penanganan antibiotik yang tidak sesuai, misalnya larutan tidak disiapkan sesaat sebelum perlakuan, larutan antibiotik tidak terlindung dari cahaya matahari, antibiotik tidak disimpan dalam suhu dingin dan sebagainya.

Pada penelitian ini dicoba menggunakan antibiotik murni dengan memperhatikan penanganan antibiotik yang sepatutnya, mulai dari cara penyiapan sampai penyimpanan antibiotik, misalnya pembuatan larutan sesaat sebelum perlakuan, antibiotik disimpan di suhu dingin dan dihindarkan dari sinar matahari, dan sebagainya. Upaya tersebut dilakukan dengan harapan akan diperoleh hasil yang lebih baik daripada yang dilakukan sebelumnya. Oleh karena kerja antibiotik dipengaruhi antara lain oleh macam antibiotik, konsentrasi, dan lama kontak, maka dicoba perlakuan perendaman mata tunas dengan beberapa macam larutan antibiotik dengan konsentrasi dan lama perendaman berbeda.

Antibiotik yang digunakan pada penelitian ini sama seperti pada penelitian sebelumnya, yaitu penisilin, tetrasiklin, kanamisin dan kloramfenikol dengan konsentrasi 100-1000 ppm dan lama perendaman 25-60 menit. Tetrasiklin, kanamisin dan kloramfenikol bekerja dengan menghambat sintesis protein; sedangkan penisilin diketahui bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel (Kee & Hayes 1996). Apabila kemampuan antibiotik dapat ditingkatkan, baik dengan menghambat sintesis dinding sel atau sintesis protein bakteri, diharapkan bakteri dalam mata tunas dapat tereliminasi, yang pada akhirnya diharapkan dapat digunakan sebagai salah satu cara memperoleh bibit bebas CVPD sebagai salah satu cara pengendalian penyakit terhadap CVPD.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen di lapang. Bahan penelitian ini adalah mata tunas tanaman jeruk siem terinfeksi bergejala berat untuk batang atas dan tanaman batang bawah JC

(Japansche Citroen) sehat, yang diketahui dari deteksi dengan PCR (*polymerase chain reaction*). Mata tunas diambil dari batang dengan disayat menggunakan pisau okulasi, direndam dalam larutan antibiotik penisilin, tetrasiklin, kanamisin, dan kloramfenikol (Sigma) dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 dan 1000 ppm dan lama perendaman 25-30, 40-45 dan 55-60 menit. Pada penelitian ini digunakan dua macam kontrol yaitu kontrol positif dari mata tunas tanaman terinfeksi yang diperoleh dari Kromasan, Tulungagung, Jawa Timur dan kontrol negatif dari mata tunas tanaman sehat yang diperoleh dari Poncokusumo, Malang, Jawa Timur. Kondisi positif atau negatif tanaman terhadap bakteri CVPD diketahui dari deteksi dengan PCR. Mata tunas yang digunakan sebagai kontrol tidak direndam dalam larutan antibiotik tetapi langsung ditempel pada tanaman batang bawah.

Grafting dilakukan dengan cara sebagai berikut: tanaman batang bawah disayat dengan pisau okulasi dengan lebar sekitar 8 mm dan panjang sekitar 1 cm. Mata tunas pada tanaman batang atas disayat dengan ukuran yang sama, ditempelkan pada luka sayatan tanaman batang bawah, kemudian dibalut dengan plastik tembus pandang pada bagian mata tunas. Setelah *grafting* berumur sekitar 3 minggu atau 1 bulan, plastik dibuka. Jika mata tunas berwarna hijau berarti *grafting* berhasil, tetapi apabila berwarna coklat kering atau membusuk berarti gagal. Jika *grafting* berhasil, batang di atas mata tunas dikerat sedalam sekitar setengah tebal batang, kemudian batang dilengkungkan. Setelah daun-daun yang tumbuh dari mata tunas cukup banyak, bagian batang yang dilengkungkan dipotong, kemudian bibit dipelihara sampai daun-daun cukup dewasa dan siap dianalisis dengan teknik PCR.

Isolasi DNA

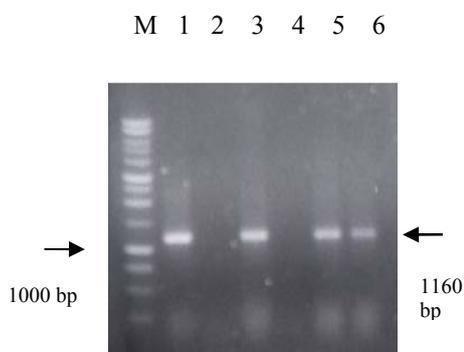
Daun jeruk dari setiap bibit diambil secara acak sebanyak 5 helai, tulang daun diambil dan dipotong kecil-kecil, kemudian ditambah nitrogen cair dan dihaluskan dengan *mortar* dan *pestle* sampai menjadi serbuk. Serbuk dimasukkan ke tabung *ependorf* berisi larutan buffer CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 1% PVP, 1% merkaptoetanol), diinkubasi pada suhu 65°C pada *waterbath* selama 10 – 15 menit. Setelah itu disentrifus dengan dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit, supernatan diambil, dicampur C:I (24:1) dengan menggunakan *vortex* dan disentrifus kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. DNA pada supernatan dipresipitasi menggunakan isopropanol kemudian disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Pellet DNA dicuci dengan alkohol 70%, dikeringkan dan dilarutkan dengan buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Cara isolasi DNA yang dilakukan tersebut mengacu pada Zubaidah *et al.* (2005).

Amplifikasi 16S rDNA bakteri CVPD dengan PCR

Amplifikasi DNA dilakukan pada mesin *thermocycler*, menggunakan sepasang primer yaitu *forward primer* OI1: 5'GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG 3' dan *reverse primer* OI2c: 5'GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA 3'. DNA yang akan teramplifikasi dengan primer tersebut berukuran sekitar 1160 pasang basa, yang merupakan 16S rDNA bakteri CVPD (Jagoueix *et al.* 1996). PCR dilakukan dengan cara mengacu pada Zubaidah *et al.* (2005), dengan langkah sebagai berikut: *pre-treatment* (92°C 30 det); 40 siklus yang terdiri dari *denaturation* (92°C 60 det), *annealing* (60°C 30 det), *elongation* (72°C 90 det); dan *extension* (72°C 10 min). Komposisi PCR *reaction mix* untuk setiap 25 µl adalah: H₂O (18 µl), buffer PCR 10x (2.5 µl), MgCl₂ (50 mM) (1µl), dNTPmix 100 mM (0.25 µl), Primer (Forward) (1 µM), Primer (Reverse) (1 µM), Taq-polimerase 5U (0.25 µl), dan DNA *template* (1 µl).

Visualisasi DNA dengan elektroforesis

Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dilakukan pada gel agarosa 1% selama 1 jam dengan tegangan 100V (BioRad). DNA dipotret dengan kamera polaroid di atas UV transilluminator (DS-54). Keberadaan *L. asiaticus* ditandai dengan adanya pita DNA berukuran sekitar 1160 bp. Contoh visualisasi hasil deteksi ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Contoh visualisasi DNA hasil amplifikasi dengan PCR. Pada lajur 1, 3, 5 dan 6 menunjukkan sampel mengandung bakteri CVPD karena menampilkan pita DNA berukuran 1160 bp, sedangkan lajur 2 dan 4 menunjukkan sampel tidak mengandung bakteri CVPD karena tidak menampilkan pita DNA berukuran 1160 bp. Lajur M: Marker DNA ladder 1 kb.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan terhadap bibit hasil *grafting* menunjukkan bahwa semua mata tunas yang diperlakukan dengan penisilin, tetrasiklin dan kloramfenikol pada konsentrasi 100-1000 ppm dapat tumbuh dalam waktu 7-8 minggu setelah *grafting*. Perendaman dalam larutan kanamisin pada konsentrasi 100-1000 ppm menyebabkan kematian pada hampir semua mata tunas (Tabel 1). Dari 90 mata tunas yang direndam dalam kanamisin 100 ppm hanya 2 mata tunas yang dapat tumbuh. Pada penelitian sebelumnya, dari 90 mata tunas yang direndam dalam kanamisin 100 ppm hanya 3 mata tunas yang dapat tumbuh (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa kanamisin bersifat fitotoksik terhadap mata tunas, sedangkan penisilin, tetrasiklin, dan kloramfenikol tidak bersifat fitotoksik. Bibit tanaman jeruk yang berasal dari mata tunas yang telah direndam dalam kanamisin dan berhasil hidup juga masih terdeteksi mengandung bakteri CVPD.

Pada penelitian sebelumnya (Tabel 2) tampak bahwa tidak semua mata tunas yang diperlakukan bebas dari bakteri karena pada setiap perlakuan masih terdapat bibit yang terdeteksi mengandung bakteri. Pada perlakuan penisilin, tetrasiklin dan kloramfenikol dengan konsentrasi 100 ppm, sudah terdapat bibit yang tidak mengandung bakteri, akan tetapi pada konsentrasi 1000 ppm masih terdapat bibit yang mengandung bakteri. Bibit yang dapat tumbuh dari mata tunas yang diperlakukan dengan kanamisin semuanya terdeteksi mengandung bakteri.

Pada hasil penelitian ini diketahui bahwa bibit tanaman jeruk yang berasal dari mata tunas yang telah direndam dalam penisilin berkonsentrasi 100, 200, dan 300 ppm dengan lama perendaman mulai 25 – 60 menit masih menunjukkan adanya bibit yang mengandung bakteri CVPD. Pada konsentrasi mulai 400 ppm sampai 1000 ppm bibit tidak lagi terdeteksi mengandung bakteri CVPD. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya, yang berarti telah terdapat peningkatan kemampuan antibiotik dalam melakukan eliminasi bakteri pada mata tunas. Bibit tanaman jeruk yang berasal dari mata tunas yang telah direndam dalam tetrasiklin berkonsentrasi 100 dan 200 ppm dengan lama perendaman 25-30, 40-45, dan 55-60 menit

masih menunjukkan adanya bibit yang mengandung bakteri CVPD. Pada konsentrasi mulai 300 ppm sampai 1000 ppm bibit tidak lagi terdeteksi mengandung bakteri CVPD. Hal ini juga berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya, yang berarti telah terjadi peningkatan kemampuan antibiotik dalam melakukan eliminasi bakteri pada mata tunas.

Tabel 1. Hasil deteksi keberadaan bakteri CVPD dengan perlakuan macam antibiotik, konsentrasi dan lama perendaman pada mata tunas.

Macam antibiotik	Waktu (menit)	Konsentrasi (ppm)									
		100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Penisilin	25 – 30	1. -	1. +	1. +	1. -	1. +	1. -	1. +	1. +	1. +	1. -
		2. +	2. -	2. -	2. +	2. +	2. -	2. +	2. -	2. -	2. +
		3. +	3. -	3. +	3. -	3. -	3. +	3. +	3. +	3. -	3. -
	40 – 45	1. +	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. -	1. +	1. -	1. +
		2. -	2. -	2. +	2. -	2. +	2. +	2. +	2. -	2. +	2. -
		3. +	3. +	3. +	3. -	3. -	3. -	3. -	3. +	3. -	3. -
	55 – 60	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -
		2. +	2. -	2. -	2. +	2. +	2. -	2. -	2. +	2. +	2. +
		3. -	3. +	3. +	3. -	3. +	3. +	3. +	3. -	3. -	3. -
Tetrasiklin	25 – 30	1. -	1. -	1. +	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. +	1. -
		2. -	2. +	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. +	2. -	2. +
		3. +	3. -	3. +	3. +	3. +	3. +	3. +	3. -	3. -	3. -
	40 – 45	1. +	1. +	1. -	1. +	1. -	1. +	1. -	1. +	1. -	1. -
		2. -	2. -	2. +	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. +	2. +
		3. +	3. +	3. +	3. +	3. +	3. -	3. +	3. -	3. -	3. -
	55 – 60	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. +	1. +	1. -	1. -	1. -
		2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. +	2. +
		3. -	3. -	3. +	3. -	3. +	3. -	3. -	3. +	3. -	3. -
Kanamisin	25 – 30	1. +	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -
		2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -
		3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -
	40 – 45	1. +	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -
		2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -
		3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -
	55 – 60	1. +	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -
		2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -
		3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -
Kloramfenikol	25 – 30	1. +	1. +	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. -	1. +	1. -
		2. +	2. -	2. -	2. +	2. -	2. +	2. -	2. -	2. -	2. +
		3. +	3. +	3. +	3. -	3. +	3. -	3. +	3. +	3. -	3. -
	40 – 45	1. +	1. +	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. +	1. +	1. -
		2. +	2. -	2. +	2. -	2. -	2. -	2. +	2. -	2. -	2. -
		3. +	3. -	3. +	3. +	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. +
	55 – 60	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. +	1. +	1. -	1. -	1. +
		2. +	2. +	2. -	2. -	2. +	2. -	2. -	2. +	2. +	2. -
		3. +	3. -	3. +	3. +	3. -	3. -	3. +	3. -	3. -	3. +
Kontrol +	1. +			2. +			3. +				
Kontrol -	1. -			2. -			3. -				

Keterangan: Arsiran: mata tunas tidak hidup
 + : terdeteksi adanya bakteri CVPD
 - : tidak terdeteksi adanya bakteri CVPD

Tabel 2. Hasil deteksi keberadaan bakteri CVPD dengan perlakuan macam antibiotik, konsentrasi dan lama perendaman pada mata tunas (Zubaidah 2004).

Macam antibiotik	Waktu (Menit)	Konsentrasi (ppm)									
		100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Penisilin	25 – 30	1. -	1. +	1. +	1. -	1. +	1. -	1. +	1. +	1. +	1. -
		2. +	2. -	2. -	2. +	2. +	2. -	2. +	2. -	2. -	2. +
		3. +	3. -	3. +	3. -	3. -	3. +	3. +	3. +	3. -	3. -
	40 – 45	1. +	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. -	1. +	1. -	1. +
		2. -	2. -	2. +	2. -	2. +	2. +	2. +	2. -	2. +	2. -
		3. +	3. +	3. +	3. -	3. -	3. -	3. -	3. +	3. -	3. -
	55 – 60	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -
		2. +	2. -	2. -	2. +	2. +	2. -	2. -	2. +	2. +	2. +
		3. -	3. +	3. +	3. -	3. +	3. +	3. +	3. -	3. -	3. -
Tetrasiklin	25 – 30	1. -	1. -	1. +	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. +	1. -
		2. -	2. +	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. +	2. -	2. +
		3. +	3. -	3. +	3. +	3. +	3. +	3. +	3. -	3. -	3. -
	40 – 45	1. +	1. +	1. -	1. +	1. -	1. +	1. -	1. +	1. -	1. -
		2. -	2. -	2. +	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. +	2. +
		3. +	3. +	3. +	3. +	3. +	3. -	3. +	3. -	3. -	3. -
	55 – 60	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. +	1. +	1. -	1. -	1. -
		2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. +	2. +
		3. -	3. -	3. +	3. -	3. +	3. -	3. -	3. +	3. -	3. -
Kanamisin	25 – 30	1. +	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -
		2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -
		3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -
	40 – 45	1. +	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -
		2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -
		3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -
	55 – 60	1. +	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -	1. -
		2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -	2. -
		3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -
Kloramfenikol	25 – 30	1. +	1. +	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. -	1. +	1. -
		2. +	2. -	2. -	2. +	2. -	2. +	2. -	2. -	2. -	2. +
		3. +	3. +	3. +	3. -	3. +	3. -	3. +	3. +	3. -	3. -
	40 – 45	1. +	1. +	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. +	1. +	1. -
		2. +	2. -	2. +	2. -	2. -	2. -	2. +	2. -	2. -	2. -
		3. +	3. -	3. +	3. +	3. -	3. -	3. -	3. -	3. -	3. +
	55 – 60	1. +	1. +	1. +	1. +	1. -	1. +	1. +	1. -	1. -	1. +
		2. +	2. +	2. -	2. -	2. +	2. -	2. -	2. +	2. +	2. -
		3. +	3. -	3. +	3. +	3. -	3. -	3. +	3. -	3. -	3. +
Kontrol +	1. +				2. +				3. +		
Kontrol -	1. -				2. -				3. -		

Keterangan: Arsiran: mata tunas tidak hidup

+ : terdeteksi adanya bakteri CVPD

- : tidak terdeteksi adanya bakteri CVPD

Sebagai bahan perbandingan untuk mengetahui adanya perubahan hasil penelitian ini dengan hasil penelitian sebelumnya, pada Tabel 2 tampak data hasil penelitian sebelumnya (Zubaidah 2004) dengan

menggunakan perlakuan yang sama. Semua bibit tanaman jeruk yang berasal dari mata tunas yang telah direndam dalam kloramfenikol berhasil hidup, namun pada setiap konsentrasi yaitu mulai 100 –1000 ppm dan lama

perendaman mulai 25 – 60 menit masih menunjukkan adanya bibit yang mengandung bakteri CVPD. Polanya juga tidak menunjukkan kekhususan, dalam hal ini pada semua perlakuan masih terdapat bibit yang terdeteksi mengandung bakteri CVPD, namun ada pula yang tidak terdeteksi mengandung bakteri CVPD. Bibit tanaman yang terdeteksi mengandung CVPD menunjukkan gejala bercak-bercak kekuningan (*blotching, mottle*) yang tidak beraturan pada daun atau klorosis, sedangkan bibit tanaman yang tidak terdeteksi mengandung bakteri CVPD menunjukkan daun yang hijau segar. Dengan demikian, diketahui bahwa pada penelitian ini kemampuan antibiotik kloramfenikol tidak mengalami peningkatan dari penelitian sebelumnya.

Pada penelitian sebelumnya (ditunjukkan pada Tabel 2), hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perendaman mata tunas dalam semua macam antibiotik, yaitu larutan penisilin, tetrasiklin, kanamisin, dan kloramfenikol pada konsentrasi 100 –1000 ppm selama 25 – 60 menit, tidak dapat mengeliminasi bakteri yang terdapat pada seluruh mata tunas, karena pada setiap perlakuan masih terdapat bibit yang mengandung bakteri. Pada penelitian ini (ditunjukkan pada Tabel 1), tidak semua antibiotik dapat digunakan untuk melakukan eliminasi bakteri pada mata tunas tanaman jeruk yang akan digunakan dalam memproduksi bibit tanaman jeruk. Larutan penisilin mulai konsentrasi 400 – 1000 ppm dan larutan tetrasiklin mulai konsentrasi 400 – 1000 ppm dengan lama perendaman 25 –60 menit dapat digunakan untuk eliminasi bakteri CVPD pada mata tunas untuk bibit jeruk. Penisilin dan tetrasiklin, dapat untuk dimanfaatkan sebagai bahan eliminasi bakteri karena antibiotik-antibiotik tersebut diketahui tidak menimbulkan fitotoksis pada mata tunas meskipun konsentrasi yang diaplikasikan cukup tinggi yaitu sampai 1000 ppm. Pada penelitian ini tetrasiklin 1000 ppm tidak menyebabkan fitotoksis pada mata tunas, meskipun menurut da Graca (1991) tetrasiklin hidroklorida dengan konsentrasi 250 ppm menimbulkan fitotoksis pada mata tunas. Dengan demikian, penelitian ini berhasil meningkatkan kemampuan antibiotik penisilin dan tetrasiklin dalam eliminasi bakteri pada mata tunas untuk bibit jeruk.

Hasil penelitian tentang kanamisin dan koramfenikol pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya, sehingga dapat diduga memang kedua antibiotik tersebut tidak dapat digunakan untuk upaya eliminasi bakteri pada mata tunas untuk bibit jeruk. Kanamisin pada konsentrasi yang cukup rendah, yaitu 100 ppm diketahui sudah dapat menimbulkan fitotoksis karena mata tunas mengalami kematian sebelum tumbuh. Mata tunas yang dapat tumbuh dari perendaman kanamisin semuanya masih terdeteksi mengandung bakteri, sehingga kanamisin tidak dapat dijadikan bahan eliminasi bakteri pada mata tunas. Larutan kloramfenikol tidak dapat digunakan untuk eliminasi bakteri pada mata tunas untuk bibit jeruk karena pada setiap perlakuan masih dapat terdeteksi bakteri CVPD.

Oleh karena itu anjuran Norminet Philippines (2001) untuk melakukan perendaman batang yang bermatatunas dalam tetrasiklin 1.000 ppm selama 25 – 30 menit sebelum di-*grafting*, perlu dipertimbangkan. Namun, penulis lebih menyarankan lebih baik perendaman langsung mata tunas yang telah diambil dari batang, daripada batang bermatatunas yang direndam. Roesmiyanto *et al.* (2000) pernah melakukan perendaman batang jeruk bermatatunas dalam larutan penisilin 1000 ppm selama 24 jam, tetapi ternyata perlakuan tersebut tidak dapat mengeliminasi bakteri pada tanaman secara keseluruhan.

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa antibiotik penisilin dan tetrasiklin dapat dimanfaatkan sebagai bahan eliminasi bakteri karena antibiotik-antibiotik tersebut diketahui tidak menimbulkan fitotoksis pada mata tunas meskipun konsentrasi yang diaplikasikan cukup tinggi yaitu sampai 1000 ppm. Pada penelitian ini tetrasiklin (murni) 1000 ppm tidak menyebabkan fitotoksis pada mata tunas. Menurut da Graca (1991) tetrasiklin (tidak murni) berupa tetrasiklin hidroklorida dengan konsentrasi 250 ppm menimbulkan fitotoksis pada mata tunas.

Pelczar & Chan (1996) dan Kee & Hayes (1996) menjelaskan bahwa penisilin adalah agen antibakteri yang dihasilkan jamur genus *Penicillium*. Penisilin berfungsi menghambat pembentukan dinding sel bakteri dengan cara mencegah penggabungan asam N-asetilmuramat ke dalam struktur mukopeptida

yang memberi struktur kaku pada dinding sel bakteri. Bakteri akan mati akibat lisis sel. Penisilin dapat bersifat bakterisidal atau bakteriostatik tergantung dari dosisnya. Tetrasiklin merupakan agen antibakteri yang diisolasi dari *Streptomyces aureo-faciens*, merupakan antibiotik berspektrum luas yang efektif melawan bakteri gram positif dan gram negatif serta banyak mikroorganisme lainnya seperti mikobakterium, riketsia, spirokaeta, dan klamidia. Tetrasiklin bekerja dengan menghalangi pengikatan RNA transfer aminoasil pada *site* spesifik di ribosom selama pemanjangan rantai peptida sehingga sintesis protein terhambat dan mempunyai efek bakteriostatik.

Penelitian ini mendukung upaya-upaya pengendalian CVPD seperti dijelaskan berikut. Semangun (1994), Syamsidi (1989) dan Roesmiyanto *et al.* (2000) menjelaskan berbagai cara pengendalian CVPD, di antaranya perendaman batang berminatunas dalam penisilin sebelum mata tunas di-*grafting*, dan penggunaan antibiotik Terramycin dengan diinfuskan langsung pada batang tanaman. Tirtawidjaja (1983) melaporkan bahwa tiga bulan setelah tanaman diinfus oksitetrasiklin diketahui dapat menekan gejala CVPD pada tanaman jeruk Siem dan Garut di desa Tarogong, Wanaraja dan Karangpawitan di daerah Garut. Dosis infusan yang pada saat itu diaplikasikan adalah 500, 1.000, dan 2.000 ppm dengan antibiotik Terramisin 21,6 SP dan oksitetrasiklin HCl. Mulya *et al.* (1983) menemukan bahwa antibiotik yang sama dengan dosis 2.000 dan 3.000 ppm menunjukkan pengaruh penekanan gejala CVPD yang terbaik pada tanaman jeruk Siem berumur 5 tahun. Namun demikian, hasil-hasil penelitian tersebut tidak sejalan dengan hasil penelitian-penelitian berikut. Djas (1985) menemukan bahwa Terramisin 21,6 SP dengan konsentrasi 1.000 – 1.500 ppm ternyata tidak menunjukkan hasil yang menggembirakan, sehingga dia mencari alternatif dengan berusaha menekan serangan vektor menggunakan pestisida sistemik dan non sistemik. Kadiono (1987) melaporkan bahwa antibiotik tersebut tidak menyembuhkan tanaman sakit, bahkan gejala lebih berat dan akhirnya tanaman mati, juga memerlukan biaya mahal. Syamsidi (1989) juga menemukan efek samping infus tersebut yaitu adanya residu antibiotik dalam buah. Pada tahun-tahun

berikutnya cara infusan ini tidak banyak digunakan lagi, namun Kapur *et al.* (1996) mempublikasikan lagi cara injeksi batang tanaman jeruk dengan penisilin dan tetrasiklin hidroklorida 1000 ppm secara tunggal maupun dikombinasikan dengan zinc-sulfat ke dalam tanaman jeruk berumur 6 tahun. Hasilnya menunjukkan bahwa tetrasiklin hidroklorida + zinc-sulfat mempunyai pengaruh yang cukup baik dalam menurunkan tingkat klorosis, yaitu sebesar 92%, sedangkan *recovery* sebesar 32% diperoleh dari perlakuan injeksi zinc-sulfat secara tunggal.

Masih banyak hal yang perlu dikembangkan dari penelitian ini, meskipun hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa larutan penisilin mulai konsentrasi 400 ppm dan tetrasiklin mulai konsentrasi 300 ppm dapat digunakan untuk eliminasi bakteri pada mata tunas untuk menghasilkan bibit bebas patogen. Pertama, penelitian ini baru skala kecil sehingga perlu dikembangkan untuk skala yang lebih besar. Kedua, antibiotik yang digunakan adalah antibiotik murni. Aplikasi di lapang dalam skala besar memerlukan antibiotik yang sudah diperkaya dengan bahan-bahan tertentu semacam pengawet atau penstabil supaya perlakuannya tidak terlalu rumit dan harga di pasar tidak terlalu mahal. Ketiga, solusi yang ditawarkan hasil penelitian ini tidak dapat diterapkan secara sendirian dalam menanggulangi serangan penyakit CVPD, namun harus didukung dengan penerapan berbagai cara pengendalian seperti pengendalian serangga vektor CVPD (*D. citri*), sanitasi kebun, pemeliharaan tanaman secara optimal, dan koordinasi penerapan teknologi. Hal tersebut disebabkan bahwa sekalipun bibit telah bebas bakteri CVPD, namun setelah bibit ditanam di lapang, akan menghadapi masalah baru, antara lain yang terkait dengan adanya vektor yang kemungkinan membawa patogen di lapangan.

Penyediaan bibit bebas CVPD seperti yang diharapkan dari hasil penelitian ini, merupakan salah satu komponen dari formulasi lima komponen PTKJS (Pengelolaan Terpadu Kebun Jeruk Sehat) yang digaungkan Deptan (2007). Kelima komponen tersebut harus diterapkan secara utuh dan tidak bisa dipisahkan satu dengan yang lainnya untuk keberhasilan pertanaman jeruk, yaitu: penggunaan bibit jeruk bebas penyakit, pengendalian serangga vektor CVPD (*D. citri*),

sanitasi kebun, pemeliharaan tanaman secara optimal, dan koordinasi penerapan teknologi. Menurut Subandiyah (2009) penggunaan bibit bebas penyakit mutlak dilakukan sebagai langkah awal pengendalian CVPD, sementara pengendalian hama diperlukan saat pertumbuhan tunas-tunas baru atau pada masa-masa trubus tanaman. Cara pengendalian hama yang paling efektif adalah melalui aplikasi insektisida sistemik (imidacloprid) yang diaplikasikan melalui saputan batang dan dapat diserap oleh seluruh bagian tanaman. Cara lain yang direkomendasikan, adalah dengan melakukan penanaman selingan antara dua varietas jambu batu dan jambu sukun dengan tanaman jeruk atau dengan penanaman pada lahan berketinggian lebih dari 1.000 meter di atas permukaan laut.

KESIMPULAN

Antibiotik penisilin dan tetrasiklin dapat ditingkatkan kemampuannya dalam eliminasi bakteri pada mata tunas untuk bibit tanaman jeruk, yaitu mulai konsentrasi 400 – 1000 ppm untuk larutan penisilin dan mulai konsentrasi 300 – 1000 ppm larutan tetrasiklin dengan lama perendaman 25 – 60 menit.

Antibiotik kanamisin dan kloramfenikol tidak dapat digunakan untuk eliminasi bakteri CVPD karena kanamisin mengakibatkan fitotoksik mata tunas dan pada bibit-bibit jeruk hasil setiap perlakuan dengan kloramfenikol masih dapat terdeteksi bakteri CVPD.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad K, Sijam K, Habibuddin, Kadir J & Rastan SOS. 2008. Occurrence and spread of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the causal agent of Huang-longbing disease of citrus in Malaysia. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. **4**(1): 103-111.
- Bove JM. 1995. *Virus and Virus-like Diseases of Citrus in the Near East Region*. Italy: FAO.
- Coppoc GL 1996. Introduction to Antimicrobial Drugs. <http://www.vet.purdue.edu/depts/bms/courses/chmrx/intmier.htm>. [6 Nopember 2003]
- da Graca JV. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**:109-36.
- Deptan. 2007. Strategi Pengendalian CVPD. Tersedia pada http://www.deptan.go.id/ditlinhorti/pht/lanjutan_07.html. [10 Juni 2007].
- Ditlin (Direktur Bina Perlindungan Tanaman). 1994. *Pengelolaan Organisme Pengganggu Tumbuhan secara Terpadu pada Tanaman Jeruk*. Jakarta. Direktorat Jenderal Pertanian Tanaman Pangan.
- Djas F. 1985. *Rehabilitasi Tanaman Jeruk Akibat CVPD dengan Menggunakan Pestisida Sistemik dan Non Sistemik*. dalam Gatra Penelitian Penyakit Tumbuhan dalam Pengendalian Secara Terpadu.
- Hung TH, Wu ML & Su HJ. 2000. Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. *J. Phytopathology*. **148**:321-326.
- Jagoueix S, Bove JM & Garnier M. 1996. PCR detection of the two 'Candidatus' *Liberibacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes*. **10**:43-50.
- Kadiono S. 1987. *Perkembangan Tanaman Jeruk di Jawa Timur*. Makalah pada Lokakarya Implementasi Rehabilitasi Jeruk. Batu. 21-22 Agustus 1987.
- Kapur S, Kapur SP & Kang SS. 1996. Chemo-trunk injection for the control of citrus greening. *Indian Journ. of Virol.* Jan. **12**(1):55-57.
- Kee JL & Hayes ER. 1996. *Farmakologi, Pendekatan Proses Keperawatan*. Terjemah oleh Peter Anugerah. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kim J & Wang N. 2009. Characterization of copy numbers of 16S rDNA and 16S rRNA of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and the implication in detection in planta using quantitative PCR. *BMC Research Note*. **2**:3.
- Mawardi D. 2003. Jeruk Garut Tinggal Sejarah? *Pikiran Rakyat*. (<http://www.pikiran-rakyat.com> [16 Juni 2004]).
- Mulya K, Tirtawidjaya S, Dachlan U & Natasasmita S. 1983. *Pengaruh beberapa Konsentrasi Infusan Antibiotika Oksitetrasiklin HCl dan Terramisin 21,6 SP terhadap Gejala Penyakit CVPD pada Tanaman jeruk Siem*. Laporan Hasil Penelitian Balai Penelitian Hortikultura Lembang. Bandung.
- Norminet Philippines. 2001. *Citrus Growing*. (<http://hrdc.pcarrd.dost.gov.ph/consortia/nomcard/dost.10/document/Technology/English/citrus.com>. [5 Januari 2002].
- Nurhadi LS & Handoko. 1989. Biologi kutu psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Penelitian Hortikultura* **3** (3). Solok: Balai Penelitian Hortikultura.
- Pelczar MJ & Chan ECS. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Terjemah oleh Ratna Siri Hadioetomo. Cet.1. Jakarta: UI-Press.
- Planck J. 1999. Citrus Greening (Huanglongbing) Watch Out for This Exotic Disease. *Animal and Plant health*. <http://www.dpi.qld.gov.au/health/5639.html> [5 Januari 2008].

- Roesmiyanto, Setyobudi L & Handayani S. 2000. Pengkajian penisilin untuk elemen pendukung ketahanan bibit jeruk terhadap CVPD. *J. Hort.* **10**(2):121-125.
- Semangun H. 1994. *Penyakit-penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Soelarso B. 1996. *Budidaya Jeruk Bebas Penyakit*. Jakarta: Penerbit Kanisius.
- Subandiyah S. 2009. Penyakit CVPD Bisa Dikendalikan. <http://regional.kompas.com/read/xml/2009/04/20/23403218>.
- Subhan M. 2008. *Hama CVPD Tamatkan Riwayat Limau Kamang Agam*. <http://www.kabarindonesia.com>. [15 Mei 2008].
- Syamsidi, S.R.Ch. 1989. *Chemical Control of CVPD Disease in Citrus*. Paper Presented to the Asian Citrus Rehabilitation Conference. Malang, July 4 – 14 1989.
- Taslim RSA. 2004. Terserang CVPD, Jeruk Malangke Terancam Punah. *Kompas*. <http://www.kompas.co.id> [16 Juni 2004].
- Todar K. 2002. *The Mechanisms of Bacterial Pathogenicity*. <http://www.bact.wisc>. [17 September 2008].
- Zubaidah S. 2004. *Identifikasi, Variasi Genetik, Distribusi, dan Upaya Eliminasi Bakteri Penyebab CVPD (Citrus Vein Phloem Degeneration)*. Program Pasca Sarjana Unibraw: Disertasi Tidak Diterbitkan.
- Zubaidah S, Wirawan IGP, Syamsidi SRC & Sulistyowati L. 2005. *Cara Isolasi DNA Daun Jeruk untuk Deteksi Bakteri Liberibacter asiaticus Penyebab CVPD (Citrus Vein Phloem Degeneration) dengan Teknik PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Seminar Nasional dan Kongres III Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia (PBPI), Universitas Brawijaya – Malang, 12-13 April 2005.