

Keragaman Morfologi, Fisiologi, Biokimia dan Virulensi Galur *Xanthomonas citri* sub sp. *citri* Penyebab Penyakit Kanker pada Jeruk

Diversity of Morphology, Physiology, Biochemistry and Virulence of *Xanthomonas citri* sub sp. *citri* Causes Cancer in Citrus

Agusti Kristi, Kikin Hamzah Mutaqin*, Giyanto
Departemen Proteksi Tanaman, IPB University, Bogor 16680

ABSTRAK

Kanker jeruk adalah penyakit penting tanaman jeruk di dunia, termasuk Indonesia. Identifikasi patogen oleh petani masih berdasarkan gejala penyakit, padahal patogen memiliki keragaman virulensi, patotipe, genetika, dan tanaman inang. Tujuan penelitian untuk mengetahui keragaman morfologi, fisiologi, biokimia, molekuler, dan virulensi dari bakteri kanker jeruk. Bakteri diisolasi dari sampel lemon (*Citrus limon*), nipis (*C. aurantifolia*), purut (*C. hystrix*), siam (*C. sinensis*), dan fortunella (*Fortunella margarita*) yang menunjukkan gejala khas penyakit kanker di Bogor dan Kabupaten Lima Puluh Kota, Sumatera Barat. Karakteristik bakteri dilakukan berdasarkan morfologi, fisiologi, biokimia, dan molekuler menggunakan PCR primer universal, serta patogenisitas pada kultivar jeruk, yaitu lemon, nipis, purut, siam, dan fortunella. Sebanyak 16 galur bakteri patogen dari sampel tanaman jeruk menunjukkan gejala khas penyakit kanker. Koloni bakteri patogen beragam berdasarkan ukuran, warna, dan tekstur koloni; secara fisiologi dan biokimia juga beragam berdasarkan kemampuan protease, oksidase, hidrolisis kasein, dan hidrolisis pati; demikian juga patogenisitasnya pada empat kultivar jeruk juga beragam. Diketahui ada empat galur yang virulen (LB04, NP02, PB05, dan SP05) pada jeruk lemon, nipis, purut, dan siam dengan masa inkubasi 23–27 hari, insidensi 22.25–90.15%, dan keparahan 15.80–78.85%. Galur LB04 paling virulen berdasarkan nilai insidensi, keparahan, dan AUDPC; kultivar jeruk nipis paling rentan. Berdasarkan hasil analisis nukleotida gen 16S rRNA maka galur PB01 terkonfirmasi sebagai *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (MK121207.1) dengan homologi 99.7% sehingga termasuk patotipe A (Asiatik).

Kata kunci: AUDPC, intensitas penyakit, patogenisitas

ABSTRACT

Citrus cancer is an important disease of citrus plants in the world, including Indonesia. Identification of pathogens by farmers is still based on disease symptoms, even though pathogens have a diversity of virulence, pathotypes, genetics, and host plants. The aim of the study was to determine the morphological, physiological, biochemical, molecular, and virulence diversity of citrus cancer bacteria. Bacteria isolated from samples of lemon, lime, kaffir lime, siam and fortunella which showed typical symptoms of cancer in Bogor and Kabupaten Lima Puluh Kota West Sumatra. Bacterial characteristics were carried out based on morphology, physiology, biochemistry and molecular using universal primer PCR, as well as pathogenicity in citrus cultivars lemon, lime, kaffir lime, siam, and fortunella. The results obtained 16 strains of pathogenic bacteria from samples of citrus plants that showed typical symptoms of cancer.

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Jalan kamper, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.
Tel: 0251-8629354, Faks: 0251-8629362; Surel: kmutaqin@apps.ipb.ac.id

Colonies of pathogenic bacteria vary according to colony size, color, and texture; physiologically and biochemically also varied based on the ability of protease, oxidase, casein and starch hydrolysis as well as their pathogenicity in the four citrus cultivars also varied. There were four virulent strains (LB04, NP02, PB05, and SP05) in lemon, lime, kaffir lime and siam with incubation period of 23–27 days, incidence 22.25–90.15%, and severity 15.80–78.85%. The most virulent strain LB04 based on incidence, severity, and AUDPC; lime cultivars are the most susceptible. Based on the nucleotide analysis of the 16S rRNA gene, the PB01 strain was confirmed as *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (MK121207.1) with 99.7% homology so that it is included in pathotype A (Asiatic).

Keywords: AUDPC, disease intensity, pathogenicity

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara produsen jeruk terbesar ke-8 di dunia setelah Brazil, China, India, Amerika (USA), Mexico, Spanyol, Mesir (FAO 2019). Produksi jeruk Indonesia mencapai 1 744 330 ton pada tahun 2015, 2 014 206 ton pada tahun 2016, 2 165 184 ton pada tahun 2017, 2 408 029 pada tahun 2018 dan 2 444 518 pada tahun 2019 (BPS 2020). Produksi jeruk seringkali terkendala masalah cekaman biotik, termasuk penyakit kanker bakteri *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Kehilangan hasil akibat penyakit ini tahun 2015 mencapai 30–40% (Memon 2017).

Patogen kanker menginfeksi daun, buah, batang, ranting, dan pucuk. Gejala berupa lesio bulat kuning berukuran 1 mm, berubah menjadi lesio coklat berukuran 10 mm dikelilingi lingkaran klorosis dan bagian tengahnya bertekstur kasar seperti gabus. Bakteri kanker jeruk memiliki keragaman patotipe berdasarkan sebaran geografi, kisaran inang, dan karakteristik genotipe tertentu. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* patotipe A (Asiatik) memiliki kisaran inang dan sebaran paling luas di dunia serta insidensi penyakit paling parah. Bakteri *X. citri* pv. *aurantifolii* B menginfeksi jeruk jeruk asam, lemon, nipis, dan pamelon di Argentina, Paraguay, dan Uruguay pada, sedangkan *X. citri* subsp. *aurantifolii* patotipe C menginfeksi limau dan nipis di Brazil (Constantin *et al.* 2016).

Beberapa jenis jeruk yang rentan terinfeksi kanker jeruk ialah jeruk purut (*Citrus histrix*), jeruk nipis (*C. aurantifolia*), pamelon (*C. maxima*), siam (*C. sinensis*), dan lemon

(*C. limon*) terutama yang tumbuh pada suhu 20–35 °C (Triwiratno dan Subandiyah 2003). Penyakit ini dilaporkan menginfeksi jeruk nipis di Kabupaten Jombang dan Magetan dengan insidensi penyakit berturut-turut sebesar 18.7% dan 2.9% (Triwiratno dan Muharam 2007). Kanker jeruk juga ditemukan di Papua, Maluku, Halmahera, Sumba, Selayar, Makasar, Jawa Timur, dan Jawa Tengah (Subegti dan Subandiyah, unpublished, <http://etd.repository.ugm.ac.id/penelitian/detail/192887>).

Identifikasi penyebab penyakit kanker jeruk oleh petani masih mengandalkan pada pengamatan gejala penyakit di lapangan. Namun, karena patogen penyebab kanker pada jeruk memiliki beberapa patotipe, yaitu A, B, dan C maka perlu dicari metode yang lebih akurat untuk membedakan variasi patotipe tersebut. Akhir-akhir ini ditemukan gejala kanker jeruk di perkebunan jeruk Koto Tinggi, Kecamatan Gunung Omeh, Kabupaten Lima Puluh Kota, Sumatra Barat, dan di tempat penjualan bibit tanaman di Kota Bogor. Penjualan bibit jeruk yang telah terinfeksi patogen akan sangat berisiko menyebarkan patogen ke daerah lain. Oleh karena itu, metode identifikasi secara molekuler diharapkan dapat memberikan informasi awal tentang keberadaan dan keragaman patogen yang lebih akurat untuk mendukung strategi pencegahan dan pengendalian penyakit. Penelitian ini bertujuan menentukan keragaman bakteri patogen kanker jeruk berdasarkan ciri morfologi, fisiologi, biokimia, dan molekuler serta virulensinya.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel Tanaman Bergejala dan Isolasi Bakteri

Sampel tanaman diambil di perkebunan jeruk Koto Tinggi Kecamatan Gunuang Omeh Kabupaten Lima Puluh Kota, Sumatra Barat dan dari penjual bibit tanaman di Kota Bogor untuk selanjutnya dianalisis di laboratorium. Pemilihan lokasi pengambilan sampel disebabkan karena sejauh ini laporan tentang sebaran dan patogenisitas penyakit kanker jeruk terutama Sumatra Barat dan Jawa Barat belum ada.

Sampel tanaman sakit diambil dari daun jeruk dengan gejala bercak klorosis kecokelatan yang diikuti lingkaran halo berwarna kuning pada jeruk siam, nipis, lemon, purut, dan fortunella (*Fortunella margarita*). Daun jeruk disterilisasi permukaan dengan alkohol 70%, digerus dalam mortar dan dilakukan pengenceran berseri hingga 10^{-5} . Sebanyak 0.1 mL suspensi bakteri disebar pada medium *Yeast dextrose carbonate agar* (YDCA) (*yeast extract* 10 g L⁻¹, *dextrose* 20 g L⁻¹, kalsium karbonat 20 g L⁻¹, dan agar-agar 15 g L⁻¹) dan selanjutnya dibuat biakan murni (Schaad 2001).

Karakterisasi Morfologi, Fisiologi, dan Biokimia

Pengamatan karakter morfologi koloni bakteri pada medium YDCA meliputi ukuran, bentuk, ketinggian, tepian, permukaan, optikal, tekstur, dan warna koloni (Schaad 2001). Karakter fisiologi dan biokimia bakteri hasil isolasi terdiri atas uji Gram, katalase, oksidase, reduksi nitrat, hidrolisis pati, hidrolisis kasein, hidrolisis gelatin, tween 80, uji susu litmus, aktivitas protease dan pertumbuhan pada TTC 0.2% dan 0.1%.

Uji Gram. Pewarnaan Gram dilakukan sesuai dengan metode Schaad (2001), satu ose bakteri dicampurkan dengan air steril dan difiksasi dengan lampu bunsen. Kemudian ditetaskan kristal violet selama 1 menit dan dicuci dengan air steril. Setelah itu ditetaskan larutan iodin selama 1 menit dan dicuci dengan air steril. Ditetaskan alkohol 70% selama

30 detik dan dicuci dengan air steril. Terakhir ditetaskan safranin selama 10 detik dan dicuci dengan air steril. Setelah itu dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop. Sel bakteri yang berwarna merah menunjukkan bersifat Gram negatif, sedangkan yang berwarna ungu merupakan bakteri Gram positif. Uji Gram juga dilakukan dengan metode KOH 3%; yaitu sebanyak 1 ose bakteri dicampurkan dengan 2–3 tetes KOH 3%, kemudian diaduk. Suspensi bakteri yang mengental menandakan bakteri Gram negatif, sedangkan jika encer berarti bakteri Gram positif.

Uji Katalase. Satu bakteri disuspensikan dengan H₂O₂ 3% di atas kaca objek, kemudian diaduk. Produksi katalase diindikasikan oleh adanya gelembung gas oksigen (Schaad 2001).

Uji Oksidase. Satu ose bakteri dioleskan di atas kertas saring yang sebelumnya sudah ditetesi larutan *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride* 1%, kemudian diamati perubahan warnanya. Oksidase positif ditandai dengan perubahan warna kertas saring menjadi keunguan (Schaad 2001).

Uji Reduksi Nitrat. Uji reduksi nitrat dilakukan mengikuti metode Schaad (2001). Sebanyak 1 ose bakteri dicampurkan dengan 4 mL medium *nitrate broth* di dalam tabung reaksi dan inkubasi 24–48 jam, kemudian diamati hingga terbentuk busa yang mengindikasikan adanya produksi gas. Setelah itu ditambahkan 1 mL larutan *N,N-dimethyl-1 naphthylamine* 0.6% dan 1 mL larutan asam sulfanilat 0.8% pada 5 N asam asetat (1 bagian asam asetat glasial untuk 2.5 bagian air). Warna pink atau merah pada medium mengindikasikan adanya nitrat (positif). Apabila selama 1 jam tidak terjadi perubahan warna menjadi pink atau merah, maka tambahkan bubuk Zn. Jika tetap tidak terjadi perubahan warna mengindikasikan hasil ujinya negatif.

Uji Hidrolisis Pati. Satu koloni tunggal bakteri digores secara garis lurus pada medium *nutrient starch agar* dan inkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Setelah diinkubasi, permukaan agar-agar dibasahi dengan larutan iodin selama 30 detik. Hidrolisis pati positif

ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar goresan bakteri (El-Goorani 1989).

Uji Hidrolisis Kasein. Satu koloni tunggal bakteri digores secara garis lurus pada medium agar-agar susu skim dan dinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Hidrolisis kasein positif ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar goresan bakteri (El-Goorani 1989).

Uji Hidrolisis Gelatin. Sebanyak 4–5 ose koloni bakteri yang berumur 24 jam dimasukkan ke dalam medium gelatin nutrien dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama 30 menit atau sampai tabung kontrol membeku. Reaksi hidrolisis gelatin positif ditandai dengan mencairnya seluruh atau sebagian medium pada tabung yang diinokulasi pada suhu 4 °C, sedangkan untuk tabung kontrol tetap membeku (El-Goorani 1989).

Uji Hidrolisis Tween 80. Satu koloni tunggal bakteri digoreskan pada medium yang mengandung tween 80 dan diinkubasi 3 × 24 jam. Adanya zona berwarna putih susu di sekitar bakteri menandakan bakteri positif menghidrolisis tween 80. Jika sebaliknya berarti bakteri negatif untuk hidrolisis tween 80 (El-Goorani 1989).

Uji susu litmus. Sebanyak empat tetes suspensi bakteri yang berumur 24 jam diteteskan pada medium susu lakmus dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24–48 jam. Setelah itu diamati perubahan yang terjadi selama tujuh hari dengan indikasi perubahan, reaksi alkali (lakmus berubah menjadi biru), reaksi asam (lakmus berubah menjadi merah) dan tidak terjadi perubahan (Schaad 2001).

Aktivitas Protease. Sebanyak 1 µL suspensi biakan bakteri diinokulasikan pada medium agar-agar susu 10% dan diinkubasi pada suhu 28 °C selama enam hari. Pengamatan dilakukan dengan mengamati zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri yang mengindikasikan aktivitas protease (Jalan *et al.* 2013).

Pertumbuhan pada *Triphenyl Tetrazolium Chloride* (TTC)

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui salah satu karakter patotipe bakteri. Satu koloni

tunggal bakteri digoreskan pada medium yang mengandung TTC 0.02% dan 0.1%, kemudian diamati bakteri yang tumbuh (El-Goorani 1989). Bakteri positif pada medium TTC ditandai oleh adanya koloni bakteri yang tumbuh dan berwarna merah, sedangkan negatif jika tidak ada bakteri yang tumbuh.

Pengujian Patogenisitas dan Virulensi Bakteri

Pengujian Patogenisitas. Bakteri yang bersifat Gram negatif dan positif uji reaksi hipersensitif digunakan pada uji patogenisitas. Uji dilakukan dengan menginokulasi isolat patogen pada masing-masing tanaman inang. Sebanyak 10⁸ cfu. mL⁻¹ suspensi bakteri diinokulasikan pada permukaan bawah daun jeruk menggunakan alat suntik. Daun diamati setiap hari selama 15–20 hari hingga muncul gejala kanker. Galur bakteri paling virulen pada uji patogenisitas digunakan pada uji virulensi mewakili masing-masing jenis jeruk (Francis *et al.* 2010).

Pengujian Virulensi. Pengujian virulensi patogen dilakukan dengan menginokulasikan sebanyak 10⁸ cfu mL⁻¹ suspensi bakteri pada permukaan bawah daun jeruk lemon, nipis, purut dan siam menggunakan alat suntik (Francis *et al.* 2010). Selanjutnya tanaman disungkup dengan plastik selama 1 × 24 jam, dan diinkubasi pada suhu 25–30 °C hingga muncul gejala. Pengujian ini disusun dalam rancangan acak lengkap faktorial dengan lima ulangan pada tanaman jeruk yang berumur tiga bulan. Faktor pertama ialah galur bakteri patogen (LB04, NP02, PB05, dan SP05) dan faktor kedua merupakan jenis tanaman jeruk (jeruk lemon, nipis, purut, dan siam). Analisis statistika meliputi analisis ragam (ANOVA) dan uji Tukey pada α 95%.

Pengamatan dilakukan terhadap masa inkubasi, insidensi, dan keparahan penyakit, serta AUDPC. Masa inkubasi diamati setiap hari sejak tanaman diinokulasi galur bakteri sampai muncul gejala pertama. Tanaman jeruk yang terinfeksi akan menimbulkan gejala klorosis dan nekrosis pada permukaan daun.

Insidensi penyakit (IP) dihitung mulai satu minggu setelah inokulasi patogen hingga pengamatan terakhir menggunakan rumus:

$$IP = \frac{n}{N} \times 100\%, \text{ dengan}$$

n, jumlah tanaman terserang; dan N, jumlah tanaman yang diamati.

Keparahan penyakit (KP) dihitung mulai satu minggu setelah inokulasi patogen hingga akhir pengamatan dengan cara mengelompokkan tanaman berdasarkan skala dan gejala serangan (Tabel 1). Perhitungan keparahan penyakit dengan rumus:

$$KP = \frac{\sum_{i=0}^i (n_i \times v_i)}{N \times V} \times 100\%, \text{ dengan}$$

n, jumlah daun yang terserang pada kategori ke-i; v, kategori kerusakan ke-i; N, jumlah daun yang diamati; V, jumlah kategori serangan tertinggi.

Setelah diperoleh nilai persentase insidensi dan keparahan penyakit, dilakukan perhitungan nilai area di bawah kurva perkembangan penyakit (AUDPC) menggunakan rumus:

$$AUDPC = \sum_{i=0}^n \left[\frac{(X_{i+1} + X_i)}{2} \right] \times (t_2 - t_1), \text{ dengan}$$

X_i, keparahan penyakit pada pengamatan ke-i; n, pengamatan pada saat terminal penyakit (terakhir); dan t, waktu pengamatan (minggu ke-1, 2, 3).

Deteksi dan Identifikasi Secara Molekuler

Galur bakteri yang dikarakterisasi secara molekuler merupakan galur bakteri yang positif menimbulkan gejala kanker pada saat uji patogenisitas. Ekstrasi DNA bakteri dengan metode CTAB 2% (Green dan Sambrook 2017). Amplifikasi PCR dengan primer universal 16S rRNA 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3') /1429R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3'). Amplifikasi dengan primer universal dilakukan dengan program PCR yaitu denaturasi awal selama 5 menit pada 95 °C, diikuti oleh 35 siklus denaturasi pada 95 °C selama 30 detik, aneling 55 °C selama 30 detik dan elongasi pada 72 °C selama 1 menit, dengan ekstensi akhir pada 72 °C selama 10 menit. PCR untuk setiap sampel

Tabel 1 Skoring keparahan penyakit kanker jeruk

Skor	Deskripsi gejala
0	Daun tidak bergejala
1	≥ 10% luas daun terinfeksi (kalus)
2	11–25% luas daun terinfeksi (kalus dan klorosis)
3	26–50% luas daun terinfeksi (kalus, klorosis dan nekrosis)
4	51–80% luas daun terinfeksi (kalus, klorosis dan nekrosis)
5	>80% luas daun terinfeksi (kalus, nekrosis dan klorosis)

Sumber: El-Goorani 1989 (dimodifikasi)

dilakukan dengan mencampurkan sebanyak 9.5 µL ddH₂O, 12.5 µL master mix (Go Taq Green, Promega), 1 µL primer forward, 1 µL primer reverse, dan 1 µL DNA templat ke dalam tube, sehingga volume akhir menjadi 25 µL. Sebanyak 5 µL hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa 2% pada 50 V selama 50 menit. Selanjutnya gel diamati dengan lampu UV dan didokumentasikan. Ukuran fragmen DNA hasil PCR diperkirakan menggunakan marker DNA ladder dengan ukuran 1 kb.

Amplikon PCR gen 16S rRNA yang berhasil teramplifikasi kemudian ditentukan urutan nukleotidanya dengan menganalisis hasil PCR, menggunakan jasa sikuensing komersial. Runutan nukleotida dianalisis dengan piranti lunak Bioedit, Mega X dan *basic local alignment search tool* (BLAST) di laman NCBI. Sekuensing gen 16S DNA dilakukan untuk menentukan hubungan filogenetika antar bakteri dan jarak genetik suatu spesies.

HASIL

Gejala Penyakit Kanker

Gejala kanker pada daun jeruk fortunella, lemon, nipis, purut, dan siam sepiintas mirip satu sama lain di lapangan. Gejala umum pada semua jenis daun jeruk ialah lesio klorosis berwarna kecokelatan yang dikelilingi halo berwarna kuning. Perbedaan gejala berupa lesio yang terangkat ke permukaan membentuk jaringan gabus tampak pada jeruk nipis dan purut, sedangkan pada jeruk fortunella, lemon, siam membentuk lesio bertekstur halus dan datar tanpa jaringan

gabus. Perbedaan lainnya ialah *water soaking* di sekitar lesio pada permukaan bawah daun jeruk lemon, nipis, purut dan siam, sedangkan pada fortunella tidak nampak (Gambar 1).

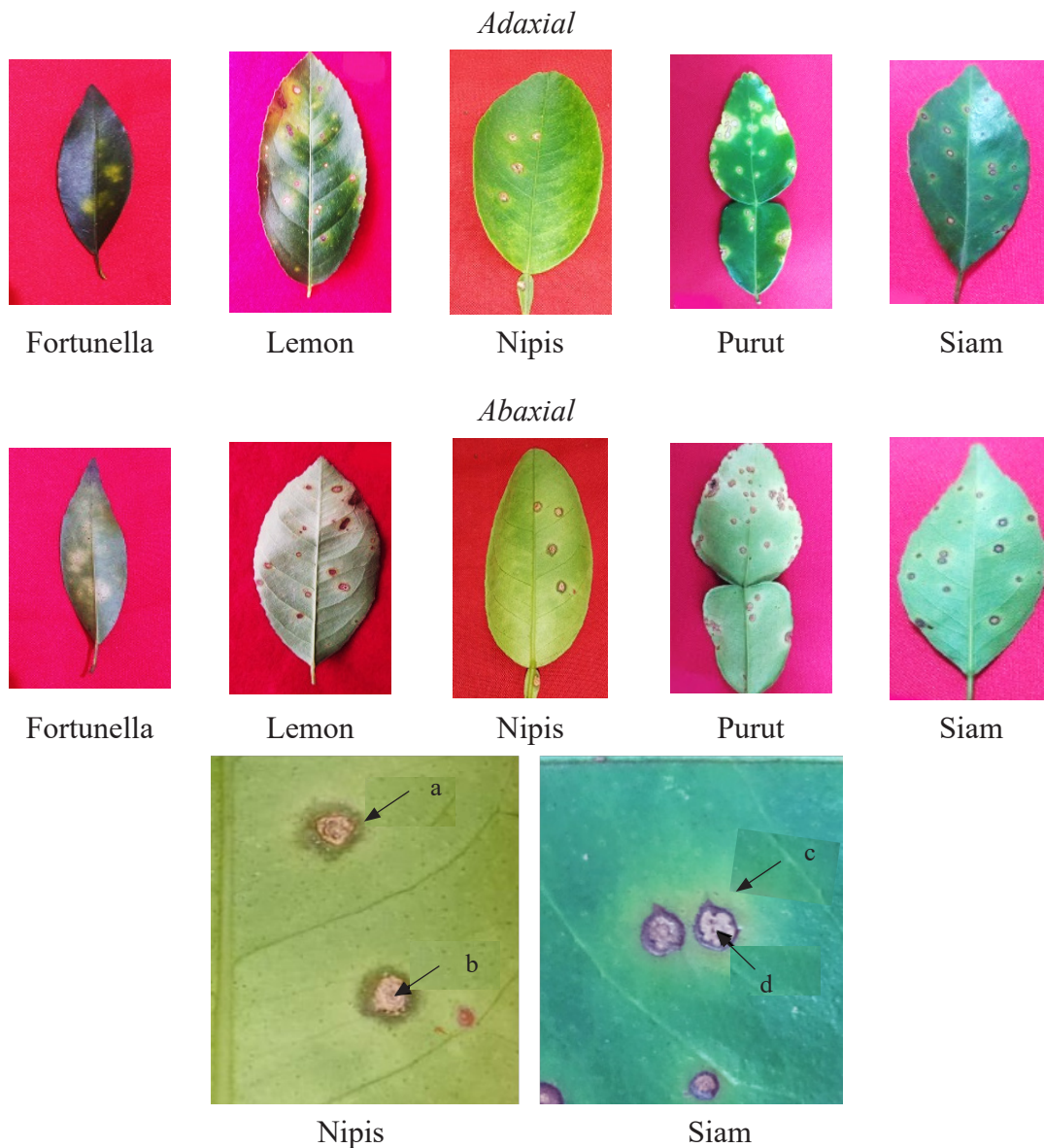
Karakter Morfologi, Fisiologi, dan Biokimia Bakteri

Morfologi 16 galur bakteri dari Kabupaten Lima Puluh Kota dan Kota Bogor cukup beragam mulai dari koloni berukuran kecil, sedang, dan besar, bentuk koloni bulat, tepian rata, ketinggian cembung, permukaan halus dan mengkilat, tidak tembus cahaya, tekstur berlendir dan seperti mentega, serta warna

koloni mulai dari krem, krem kekuningan, kuning dan kuning cerah (Gambar 2).

Karakteristik fisiologi dan biokimia dari bakteri yang diperoleh bervariasi (Tabel 2). Semua galur bakteri bersifat Gram negatif, memiliki bentuk sel batang dan motil. Gram negatif ditandai dengan sel bakteri berubah warna menjadi merah pada saat pewarnaan Gram. Hasil pengujian KOH 3% menunjukkan semua bakteri bersifat Gram negatif yang ditandai dengan suspensi berlendir pada saat pengujian (Gambar 3).

Semua galur bakteri bersifat katalase positif yang ditandai dengan terbentuknya gelembung-

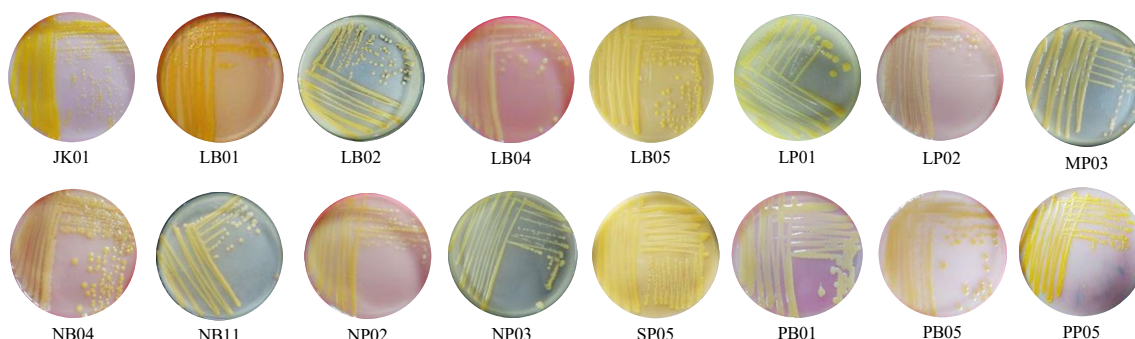


Gambar 1 Penampakan gejala kanker pada beberapa kultivar daun jeruk di lapangan (atas), dan deskripsi gejala kanker (bawah). a, *Water soaking*; b, Jaringan gabus; c, lingkaran klorosis berwarna kuning (halo); dan d, Lesio datar dan halus.

Tabel 2 Karakter fisiologi dan biokimia bakteri dari jeruk sakit dengan pembanding bakteri *Xanthomonas citri*

Asal	Jenis jeruk	Galur bakteri	Uji fisiologi biokimia											
			KS	HG	HT	LM	RN	T1	T2	PS	OS	HK	HP	
		<i>Xanthomonas citri</i>	+	+	+	A	-	-	-	+	-	+	+	
Bogor	Fortunela	JK01	+	+	+	R	-	-	+	-	-	-	+	
		Lemon	LB02	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	-
			LB05	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	-
			LB04	+	+	+	R	-	-	+	-	-	-	-
			LB01	+	+	+	R	-	-	+	-	+	-	-
	Nipis	NB04	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	-	
		Purut	NB11	+	+	+	R	-	-	+	+	+	+	+
			PB01	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	+
		PB05	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	-	
Padang	Lemon	LP02	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	-	
		LP01	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	-	
	Nipis	MP03	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	-	
		NP02	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	-	
		NP03	+	+	+	R	-	-	+	+	+	+	-	
		PP05	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	+	
	Siam	SP05	+	+	+	R	-	-	+	+	-	+	-	

Keterangan: KS, katalase; HG, hidroksi gelatin; HT, Hidroksi tween 80; LM, Susu litmus; RN, Reduksi nitrat; T1, Medium TTC 0.1%; T2, Medium TTC 0.02%; PS, Protease; OS, Oksidase; HK, Hidroksi kasein; HP, Hidroksi pati. A, Alkali; R, Reduksi; +, Reaksi positif; dan -, Reaksi negatif.



Gambar 2 Penampakan morfologi koloni 16 bakteri patogenik dari jeruk pada medium *Yeast dextrose carbonate agar* setelah inkubasi 3 × 24 jam.

gelembung oksigen pada suspensi. Hal ini berarti bakteri memiliki enzim katalase yang memediasi pemecahan H₂O₂ menjadi oksigen dan air. Berdasarkan uji oksidase, sebanyak tiga galur bersifat oksidase positif (LB01, NP11 dan NP03) dan tiga belas galur lainnya bersifat oksidase negatif (Gambar 4).

Hasil uji reduksi nitrat menunjukkan bahwa semua galur bersifat negatif. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung pada suspensi bakteri. Begitu juga semua bakteri bersifat reduksi menjadi putih (Gambar 5).

Hasil uji hidrolisis kasein menunjukkan sebanyak tiga galur bakteri (JK01, LB04 dan LB01) bersifat negatif yang ditandai dengan tidak adanya zona bening di sekitar bakteri dan 13 galur positif menghidrolisis kasein yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar bakteri. Hidrolisis pati menunjukkan hanya empat bakteri yang positif ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar bakteri dan lainnya negatif (Gambar 6).

Uji hidrolisis gelatin menunjukkan bahwa semua bakteri bereaksi positif, memiliki



Gambar 3 Uji Gram bakteri penyebab kanker jeruk dengan metode pewarnaan dan KOH 3%. a, Gram positif ditandai dengan sel yang berwarna biru; b, Gram negatif ditandai dengan sel berwarna merah; c, Gram positif ditandai dengan suspensi bakteri yang encer; dan d, Gram negatif yang ditandai dengan suspensi bakteri yang kental.



Gambar 4 Uji oksidase dan katalase bakteri patogen penyebab kanker jeruk. a, Reaksi positif oksidase yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi ungu pada kertas saring; b, Reaksi negatif oksidase yang ditandai dengan tidak terjadi perubahan warna pada kertas saring; c, Reaksi positif katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung oksigen; d, Reaksi negatif oksidase yang ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung oksigen.



Gambar 5 Uji reduksi nitrat dan litmust milk isolat bakteri patogen penyebab kanker jeruk. a, Reaksi positif reduksi nitrat yang ditandai dengan terbentuknya gelembung pada suspensi; b, Reaksi negatif reduksi nitrat yang ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung pada suspensi; c, Kontrol positif uji susu litmus berwarna ungu; d, Sifat reduksi untuk uji susu litmus dengan warna suspensi berubah dari ungu menjadi putih.

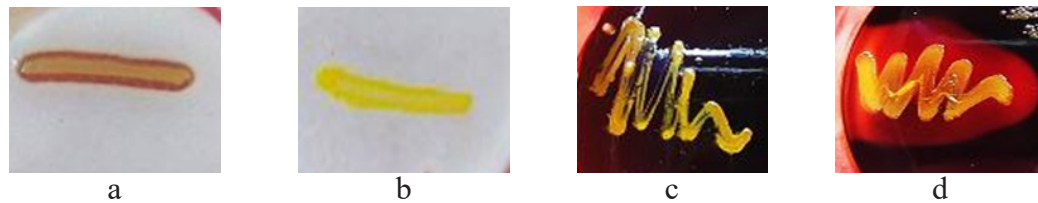
kemampuan dalam menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler (gelatinase) untuk mencairkan gelatin. Sebanyak 13 galur memiliki aktivitas protease yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar bakteri. Uji ini menjadi tanda bahwa bakteri mampu menghidrolisis protein menjadi peptida-peptida yang lebih kecil atau unit asam amino (Gambar 7).

Semua bakteri hanya tumbuh pada medium TTC 0.02%. Hasil pengujian pada medium tween 80 menunjukkan semua bakteri mampu

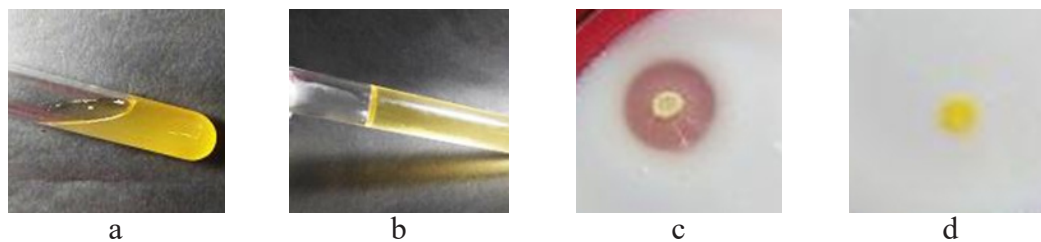
tumbuh dan membentuk zona putih susu di sekitar bakteri. (Gambar 8).

Patogenisitas dan Virulensi Bakteri

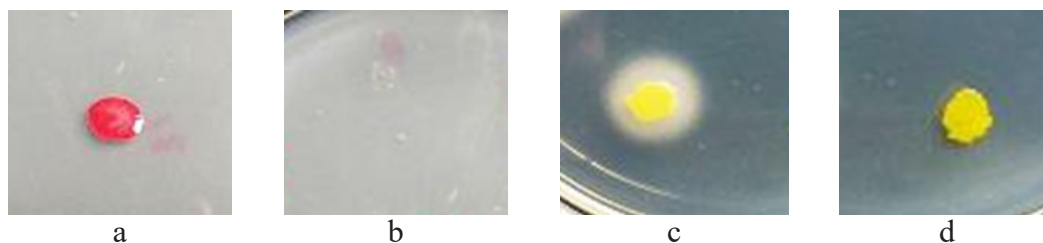
Sebanyak 16 galur bakteri positif uji patogenisitas pada masing-masing tanaman inang asal isolasi dengan munculnya gejala kanker, kecuali galur asal fortunella menimbulkan gejala pada jeruk lemon, nipis, purut dan siam. Galur fortunella merupakan satu-satunya galur yang tidak tersedia tanaman inang asalnya, sehingga diujikan ke kultivar



Gambar 6 Uji hidrolisis kasein dan pati bakteri patogen penyebab kanker jeruk. a, Reaksi positif dari uji hidrolisis kasein yang ditandai dengan terbentuknya zona bening; b, Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening; c, Reaksi positif uji hidrolisis pati yang ditandai dengan terbentuknya zona bening; d, Reaksi negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening.



Gambar 7 Uji hidrolisis gelatin dan aktivitas protease bakteri patogen penyebab kanker jeruk. a, Reaksi positif uji hidrolisis gelatin yang ditandai dengan mencairnya seluruh medium; b, Reaksi negatif uji hidrolisis gelatin yang ditandai dengan tetap membekunya seluruh medium; c, Reaksi positif aktivitas protease yang ditandai dengan terbentuknya zona bening; d, Reaksi negatif aktivitas protease yang ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening.



Gambar 8 Pertumbuhan bakteri pada medium TTC dan uji hidrolisis pada medium tween 80. a, Bakteri patogen kanker jeruk pada medium TTC 0.02%; b, Bakteri tidak mampu tumbuh pada medium TTC 0.1%; c, Reaksi positif hidrolisis tween 80 yang ditandai dengan zona putih susu (*opacity*); d, Reaksi negatif hidrolisis tween 80 yang ditandai dengan tidak terbentuknya opasitas.

lain untuk mengetahui patogenisitasnya. Galur bakteri dengan virulensi tertinggi dipilih untuk uji lanjut berdasarkan jenis jeruk asal isolasi, berturut-turut yaitu lemon, nipis, purut dan siam: Galur LB04 (masa inkubasi 13 hari, insidensi 83%), NP02 (masa inkubasi 15 hari, insidensi 82%), PB05 (masa inkubasi 16 hari, insidensi 80%) dan SP05 (masa inkubasi 15 hari, insidensi 60%) (Tabel 3). Bakteri galur LB04, PB05, dan SP05 memiliki virulensi tinggi dan mampu menginfeksi semua jenis jeruk dengan keparahan berturut-turut ialah 73–84%, 36–62% dan 31–36%,

sedangkan NP02 memiliki tingkat virulensi terendah, yaitu menginfeksi jeruk nipis dengan keparahan sebesar 63% (Gambar 9).

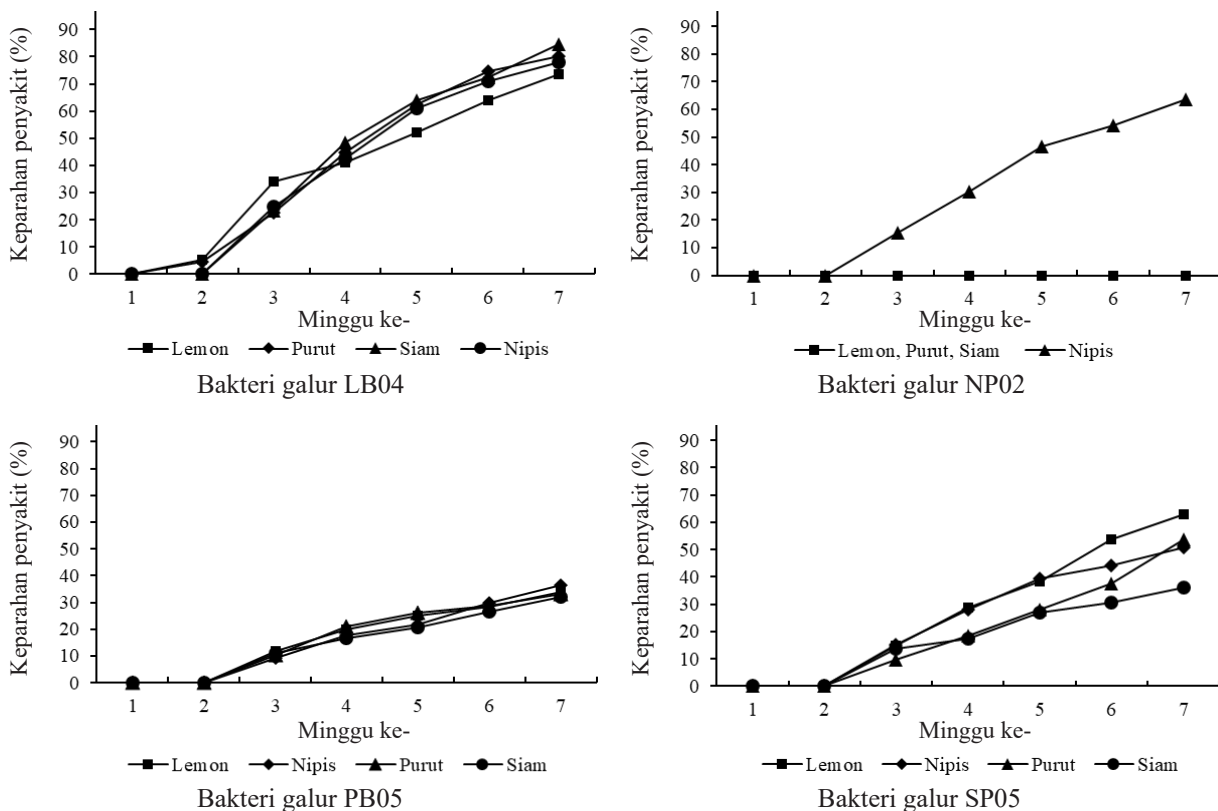
Masa inkubasi gejala pada empat galur tersebut tidak berbeda nyata. Namun berdasarkan nilai insidensi dan keparahan penyakit di akhir pengamatan serta nilai AUDPC kedua peubah tersebut, maka galur dengan tingkat virulensi dari yang tertinggi berturut-turut adalah LB04, PB05, SP05 dan NP02 (Tabel 4).

Tingkat kerentanan jenis tanaman jeruk terhadap empat galur bakteri tidak berbeda

Tabel 3 Masa inkubasi dan insidensi penyakit pada uji patogenisitas galur bakteri di masing-masing tanaman jeruk inang asal

Galur bakteri	Tanaman uji	Masa inkubasi (hari)	Insidensi penyakit (%)
LB01	Lemon	21 a	80
LB02	Lemon	19 b	64
LB04	Lemon	13 c	83
LB05	Lemon	19 b	64
LP01	Lemon	19 b	64
LP02	Lemon	19 b	67
NB04	Nipis	19 b	70
NB11	Nipis	20 a	50
NP02	Nipis	15 d	82
NP03	Nipis	20 a	60
MP03	Nipis	17 c	41
PB05	Purut	16 c	80
PB01	Purut	19 b	60
PP05	Purut	21 a	60
SP05	Siam	15	60
JK01	Lemon	25 a	50
JK01	Nipis	25 a	50
JK01	Purut	25 a	55
JK01	Siam	25 a	50

Angka pada lajur yang sama pada kelompok jenis jeruk yang sama dan diikuti huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji Tukey α 5%.



Gambar 9 Perkembangan keparahan gejala penyakit kanker dari empat galur bakteri patogen pada empat jenis jeruk.

Tabel 4 Masa inkubasi, insidensi dan keparahan penyakit kanker jeruk pada uji virulensi empat galur bakteri pada tanaman jeruk

Galur	Masa inkubasi (hari)	Insidensi penyakit		Keparahan penyakit	
		%	AUDPC	%	AUDPC
LB04	23 b	90.15 a	322 a	78.85 a	243 a
NP02	27 a	22.25 c	70 c	15.80 d	45 c
PB05	27 a	74.90 b	234 b	50.45 b	137 b
SP05	25 ab	70.50 b	230 b	33.50 c	98 b

Angka pada lajur yang sama dan diikuti huruf berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji Tukey 5%.

Tabel 5 Tingkat kerentanan jenis jeruk terhadap empat galur bakteri

Inang	Masa inkubasi (hari)	Insidensi penyakit		Keparahan penyakit	
		%	AUDPC	%	AUDPC
Lemon	24.20 a	54.25 b	185 b	42.30 b	126 ab
Nipis	25.45 a	74.00 a	249 a	56.85 a	166 a
Purut	25.73 a	65.00 ab	213 ab	41.45 b	118 b
Siam	25.33 a	64.55 ab	209 ab	38.00 b	112 b

Angka pada lajur yang sama yang diikuti huruf berbeda menunjukkan perbedaan nyata uji Tukey 5%

nyata berdasarkan masa inkubasi gejala. Namun berdasarkan nilai AUDPC, insidensi dan keparahan penyakitnya dapat diurutkan mulai dari rentan sampai paling tahan ialah tanaman jeruk nipis, purut, siam dan lemon (Tabel 5).

Karakter Molekuler Galur Bakteri

Enam belas galur bakteri patogenik memberikan hasil PCR positif menggunakan primer universal prokariota 16S rRNA dengan pita DNA berukuran sekitar 1500 pb (Gambar 10), termasuk galur LB04, PB01, SP05 dan NP02. Hasil sikuensing terhadap empat galur terpilih selanjutnya dibandingkan dengan sikuen 4 galur *X. citri* subsp. *citri* dari GenBank (Tabel 6). Galur PB01 merupakan galur yang memiliki nilai kemiripan tertinggi dengan keempat galur pembanding. Nilai persentase identitasnya ialah >97.5%, yaitu nilai demarkasi minimum suatu spesies prokariota. Ketiga galur lainnya yang memiliki persentase identitas <97.5%, yaitu NP02 (85.5–95.7%), LB04 (86.1–86.2%), dan SP05 (23–23.6%).

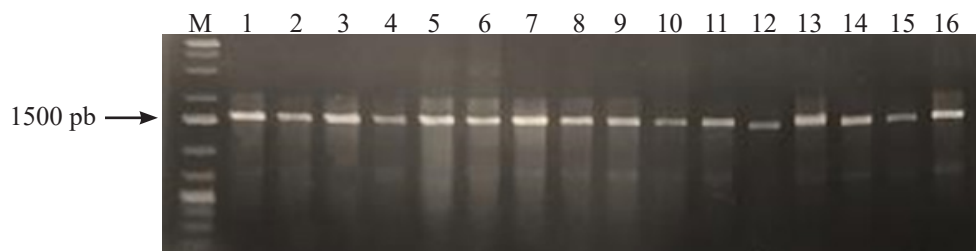
PEMBAHASAN

Gejala penyakit kanker pada tanaman jeruk yang ditemukan di lapangan memiliki sedikit perbedaan, bergantung pada jenis tanaman

inang. Hal ini sesuai dengan Lin *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa kanker jeruk memiliki sedikit perbedaan gejala di antara jenis tanaman inang, seperti ada atau tidaknya pembentukan jaringan gabus, *water soaking*, dan lingkaran klorosis (*halo*). Ukuran lesio kanker dan jenis gejala yang muncul bergantung pada jenis bakteri, usia jaringan inang dan jenis kultivar jeruk pada saat terinfeksi (Gottwald 2001).

Koloni isolat bakteri cukup beragam, terutama warna koloni mulai dari krem hingga kuning, ukuran koloni, dan tekstur koloni. Menurut Goto (1992), koloni bakteri berubah dari warna krem hingga kuning dan mengandung banyak lendir pada 24–72 jam. Beberapa isolat bakteri tidak memiliki aktivitas protease, tidak mampu menghidrolisis pati dan kasein. Hal ini karena setiap galur bakteri kanker memiliki kemampuan yang berbeda dalam sifat fisiologi dan biokimia. Hal ini sejalan dengan penelitian Wei (2019) yang menunjukkan bahwa patogen kanker jeruk mampu menghidrolisis pati dan memiliki aktivitas protease.

Perbedaan virulensi galur bakteri nampak dari perkembangan tingkat insidensi dan keparahan penyakit. Galur LB04, PB05, dan SP05 terbukti virulen dan mampu menginfeksi semua jenis jeruk, sedangkan NP02 hanya menginfeksi jeruk nipis. Beberapa galur



Gambar 10 Amplifikasi DNA bakteri patogen kanker jeruk menggunakan primer universal 27F/1429R. M, marker 1kb; 1, PB01; 2, PP05; 3, NP02; 4, PB05; 5, LB02; 6, LP02; 7, LP01; 8, MP03; 9, NB04; 10, LB05; 11, SP05; 12, NB11; 13, NP03; 14, JK01; 15, LB04; 16, LB01.

Tabel 6 Homologi galur bakteri penyebab kanker batang pada tanaman jeruk di Indonesia dengan pembandingan *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc)

Galur bakteri	Nilai Homologi (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Xcc (MK121207)	ID							
2. Xcc-A (MZ558178.1)	99.9	ID						
3. Xcc-B (NR104963.1)	99.8	99.7	ID					
4. Xcc-C (NZLAUI01000275.1)	99.9	99.8	99.9	ID				
5. LB04	86.2	86.1	86.1	86.2	ID			
6. NP02	95.6	95.6	95.6	95.7	85.5	ID		
7. PB01	99.7	99.6	99.5	99.6	85.9	95.3	ID	
8. SP05	23.3	23.3	23.3	23.3	23.0	23.6	23.4	ID

bakteri *X. citri* subsp. *citri* yang diisolasi dari jeruk nipis memiliki kisaran inang yang terbatas (Gordon *et al.* 2015). Perbedaan perkembangan gejala dapat sangat kontras menunjukkan tingkat virulensi yang berbeda nyata (Ebrahimi *et al.* 2020). Terdapat korelasi antara intensitas penyakit dan kerapatan stomata khususnya pada daun berumur 13–15 hari, makin tinggi kerapatan stomata maka makin tinggi intensitas penyakitnya (Triwiratno dan Muharam 2007).

Berdasarkan tingkat kerentanan tanaman terhadap isolat bakteri, jeruk nipis ialah paling rentan, lemon paling tahan, sedangkan jeruk purut dan siam berada di antaranya. Induksi lesio pada daun jeruk bergantung pada resistensi tanaman inang. Jeruk nipis menunjukkan kerentanan yang lebih besar dibandingkan dengan jenis jeruk lainnya. Pada tanaman yang menunjukkan toleransi, bakteri patogen dapat berkembang pada jaringan inang, tetapi infeksi tidak menyebabkan gejala penyakit yang berat bahkan tidak khas. Beberapa jenis jeruk yang penting secara komersial, seperti jeruk manis, jeruk bali,

jeruk nipis, dan lemon juga rentan terhadap penyakit kanker jeruk (Gottwald *et al.* 2002).

Nukleotida gen 16S rRNA galur PB01 hasil PCR terkonfirmasi sebagai *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (MK121207.1). Nilai homologi nya ialah 99.7%, sedangkan homologi tiga galur bakteri lainnya ialah <97.5%.

Keragaman morfologi bakteri ditunjukkan dengan perbedaan ukuran, tekstur, warna koloni bakteri, sedangkan keragaman berdasarkan sifat fisiologi dan biokimia bakteri dapat dilihat dari kemampuan hidrolisis kasein, hidrolisis pati, oksidase, dan protease. Galur bakteri yang paling virulen yaitu LB04, NP02, PB05, dan SP05 dan kultivar jeruk yang paling rentan ialah jeruk nipis. Identifikasi patogen secara molekuler menggunakan primer universal 16S rRNA belum dapat membuktikan keragaman bakteri sampai tingkat patotipe sehingga diperlukan penelitian lanjut terkait keragaman molekuler bakteri seperti penggunaan beberapa teknik analisis RFLP, sidik jari genom, dan analisis rDNA yang dilaporkan bisa digunakan untuk identifikasi keragaman hingga tingkat patotipe.

Pemanfaatan metode identifikasi patogen secara molekuler dapat mengidentifikasi secara lebih akurat keberadaan *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pada tanaman jeruk yang menunjukkan gejala kanker pada daun di dua lokasi penelitian, yaitu Kabupaten Lima Puluh Kota, Padang dan Kota Bogor. Keberadaan *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pada bibit jeruk asal Bogor, sangat berisiko menyebarkan patogen ke daerah lainnya. Oleh karena itu, metode identifikasi secara molekuler yang sudah diuji pada penelitian ini dapat digunakan untuk memonitor penyebaran penyakit kanker di wilayah Indonesia, sekaligus untuk mencegah penyebaran patogen lebih luas.

DAFTAR PUSTAKA

- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2020. Produksi Buah-buahan dan Sayuran Tahunan di Indonesia. <https://www.bps.go.id/indicator/55/62/2/produksi-tanaman-buah-buahan.html> [diakses 15 Agustus 2021].
- Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos P, Cottyn B. 2016. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathol.* 65(5):792–806. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12461>.
- Ebrahimi Z, Rezaei R, Masoumi-Asl A, Charehgani H. 2020. Variation in the aggressiveness of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathotypes A and A* on three *Citrus* species, and epiphytic growth on some citrus weeds. *Crop Pasture Sci.* 71(3):260–267. DOI: <https://doi.org/10.1071/CP19448>.
- El-Goorani MA. 1989. The occurrence of citrus canker disease in United Arab Emirates. *J Phytopathol.* 125:257–264. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1989.tb01067.x>.
- [FAO] Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2019. *FAOSTAT*. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> [diakses 15 Agustus 2021].
- Francis MI, Kostenyuk I, Orbović V, Loskutov A, Zolotukhin M, Graham JH. 2010. Automated needle-free injection method for delivery of bacterial suspensions into citrus leaf tissues. *J Phytopathol.* 159(5): 347–351. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01774.x>.
- Gordon JL, Lefeuvre P, Escalon A, Barbe V, Cruveiller S, Gagnevin L, and Pruvost O. 2015. Comparative genomics of 43 strains of *Xanthomonas citri* pv. *citri* reveals the evolutionary events giving rise to pathotypes with different host ranges. *BMC Genomics.* 16(1):1098. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2310-x>.
- Goto M. 1992. Citrus canker. Di dalam: *Plant Diseases of International Importance: Diseases of Fruit Crops (Vol. III)*. Singh US, Mukhopadhyay AN, Kumar J, Chaube HS, editor. New Jersey (US): Prentice Hall. Hlm 170–208.
- Gottwald TR, Hughes G, Graham JH, Sun X, Riley T. 2001. The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. *Phytopathology* 91:30–34. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.1.30>.
- Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. *Plant Health Prog.* 3(1):1–34. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHP-2002-0812-01-RV>.
- Green MR, Sambrook J. 2017. *Molecular Cloning Collection*. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093450>.
- Jalan N, Kumar D, Yu F, Jones JB, Graham JH, Wang N. 2013. Complete genome sequence of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strain AW12879 a restricted-host-range citrus canker causing bacterium. *Genome Announce.* 1(3):e00235-13. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00235-13>.
- Lin HC, Hsu ST, Hwang HS, Tzeng KC, Lin HC, Hsu ST, Hwang AS. 2005. Phenotypic and genetic characterization of novel

- strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* which induce atypical symptoms on citrus leaves in Taiwan. *Plant Pathol Bull.* 14:227–238.
- Memon NA. 2017. Citrus fruit (Kino): Punjab produced 98% of production. *Pak Food J.* 29–31.
- Schaad NW. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, third ed. St. Paul (US): APS Press. 1–16. 373.
- Triwiratno A, Muharam A. 2007. Status dan patogenisitas penyakit kanker jeruk (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) di Jawa Timur. *J Hort. Edisi Khusus* 3(2007):276–286.
- Triwiratno A, Subandiyah S. 2003. Tanggapan Beberapa Spesies Jeruk (*Citrus spp*) terhadap Patogenisitas *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* [tesis]. Yogyakarta (ID): Universitas Gajah Mada.
- Wei C, Tian D, Changqing C, Chengpeng Y, Qiongguang L. 2019. Global regulator phop is necessary for motility, biofilm formation, exoenzyme production and virulence of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on citrus plants. *Genes.* 10(5):340. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10050340>.