

DETEKSI KOMUNITAS BAKTERI PADA *DIAPHORINA CITRI* JANTAN DAN BETINA, VEKTOR PENYAKIT HUANGLONGBING PADA JERUK MENGGUNAKAN PCR-RISA

BACTERIAL COMMUNITY DETECTION IN MALE AND FEMALE *DIAPHORINA CITRI*, HUANGLONGBING DISEASE VECTOR IN CITRUS USING PCR-RISA

Achmad Himawan^{1*)}, Siti Subandiyah²⁾

¹⁾Fakultas Pertanian, Institut Pertanian STIPER, Yogyakarta

²⁾Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan Pusat Studi Bioteknologi, UGM, Yogyakarta.

*E-mail korespondensi: wawanhimawan2014@gmail.com

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is a very destructive disease on citrus. *Diaphorina citri* is a HLB disease vector. The aim of this research is to detect bacterial community in the insect vector, especially *D. citri* males and females, using Polymerase Chain Reaction-Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (PCR-RISA) method. The results of research show that there are 3 – 4 bacteria species in *D. citri* males and 1 – 4 bacteria species in *D. citri* females.

Keywords: Huanglongbing (HLB), citrus, *Diaphorina citri*, bacterial community, PCR-RISA

PENDAHULUAN

Diaphorina citri merupakan serangga vektor penyakit Huanglongbing.

Huanglongbing (HLB) adalah penyakit jeruk yang sangat merugikan. HLB berasal dari bahasa Cina, yaitu huang (artinya kuning), long (artinya tunas) dan bing (artinya penyakit). HLB diartikan sebagai penyakit tunas kuning (van

Vuuren, 1996; Bove, 2006). Di Indonesia, HLB diberi nama *Citrus Vein Phloem Degeneration (CVPD)* (Tirtawidjaja, 1964; Tirtawidjaja *et al.*, 1965). Gejala luar meliputi daun menjadi kuning pada sebagian atau seluruh helaian daun. Daun kuning ini kelihatan lebih kaku dan sering berdiri tegak. Gejala dalam meliputi jaringan floem

Achmad Himawan dan Siti Subandiyah: Deteksi Komunitas Bakteri pada *Diaphorina*.....

daun dewasa memperlihatkan gejala yang khas, yaitu adanya degenerasi sel-sel floem (Tirtawidjaja, 1964).

D. citri termasuk familia Homoptera, superfamili Psylloidae. *D. citri* mengalami tiga fase dalam hidupnya yaitu telur, nimfa dan dewasa/imago. Nimfa terdiri atas 5 instar. Satu siklus hidupnya antara 15-20 hari di musim panas dan 40-50 hari pada musim dingin (Capoor *et al.*, 1967). Serangga dewasa dapat dibedakan berdasarkan bentuk ekornya. Bentuk ekor yang jantan adalah melengkung ke atas, sedangkan yang betina adalah lurus (Husain & Nath, 1927).

Penelitian tentang deteksi komunitas bakteri pada *D. citri* relatif sedikit. Subandiyah *et al.* (2000) melaporkan bahwa ada 5 spesies bakteri pada *D. citri*. Bakteri pertama adalah anggota Gammaproteobacteria dan bakteri kedua adalah anggota

Betaproteobacteria. *Arsenophonus* spp., *Liberibacter* spp. dan *Wolbachia* spp. merupakan bakteri ke-3, ke-4 dan ke-5.

Deteksi komunitas bakteri dapat dilakukan melalui kultur dependen dan independen. Kultur dependen adalah mengisolasi bakteri pada media buatan, namun kelemahannya tidak semua bakteri dapat dikulturkan pada media buatan. Kira-kira 99% bakteri belum dapat dikulturkan pada media buatan (Amann *et al.*, 1995). Kultur independen adalah mengisolasi atau mengekstraksi DNA bakteri dan menggandakan potongan DNA dengan metode PCR. Salah satu caranya adalah menggunakan primer universal *rDNA-Ribosomal Intergenic Spacer* (Yu & Mohn, 2001; Fakhruddin & Mannan, 2013).

Deteksi komunitas bakteri pada *D. citri* dewasa menggunakan *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)* belum pernah dilaporkan. Penelitian ini

Achmad Himawan dan Siti Subandiyah: Deteksi Komunitas Bakteri pada *Diaphorina*.....

bertujuan untuk deteksi komunitas bakteri yang ada pada *D. citri* jantan dan betina menggunakan *PCR-RISA*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan cara sampling dan dilakukan pada bulan Maret 2007. *D. citri* dewasa diambil dari perbanyakan massal di *Control Temperature Room* di Fakultas Pertanian, UGM, Yogyakarta. Serangga-serangga itu dibawa ke Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, UGM, Yogyakarta. *D. citri* diawetkan dalam etanol 95%. Dengan menggunakan mikroskop stereo (perbesaran 40X), *D. citri* jantan dan betina dipisah. Sayap dari tiap individu dihilangkan. Ekstraksi DNA tiap individu menggunakan kit microLYSIS (Microzone Ltd, UK). Tiap individu dimasukkan ke dalam tabung ependorf 0,2 µl dan diberi larutan microLYSIS sebanyak 10 µl. Tiap

individu digerus menggunakan tip kuning yang ujungnya telah ditumpulkan. Tabung tersebut dimasukkan ke dalam mesin *PCR* (MyCycler, BIO-RAD, catalog number 170-9703). Program pemanasan sebagai berikut: 65 °C 5 menit, 96 °C 2 menit, 65 °C 4 menit, 96 °C 1 menit, 65 °C 1 menit, 96 °C 30 detik, dan hold 20 °C. Tabung ependorf 0,2 ml yang berisi DNA *D. citri* disimpan dalam freezer – 20 °C.

Deteksi komunitas bakteri menggunakan metode *PCR*. *PCR* mix yang dipakai adalah MegaMix-Royal (MMR) (2x konsentrasi) dari Microzone Ltd. UK. dengan sepasang primer universal S926f (5'-CTY AAA KGA ATT GAC GG-3') dan L189r (5'-TAC TGA GAT GYT TMA RTT C-3') (Yu & Mohn , 2001). Program *PCR* yang digunakan : (i) 1 siklus 95°C 2 menit, (ii) 30 siklus (94°C 30 detik, 47°C 30 detik, 72°C 2 menit); (iii) 1 siklus 72°C 5

menit; (iv) hold 20 °C. Produk *PCR* sebanyak 15 µl dituang dalam sumuran gel agarosa 1,5 % yang telah ditambah dengan Etidium bromida. Elektroforesis dilakukan dengan MUPID set, menggunakan arus listrik 100 Volt selama 20 - 30 menit. Hasil elektroforesis dilihat di atas lampu UV dan didokumentasikan dengan difoto menggunakan kamera digital. Analisis data dilakukan dengan cara menghitung jumlah pita *DNA* yang terbentuk dan mengestimasi berat molekul tiap pitanya . Tiap pita *DNA* mewakili satu spesies bakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

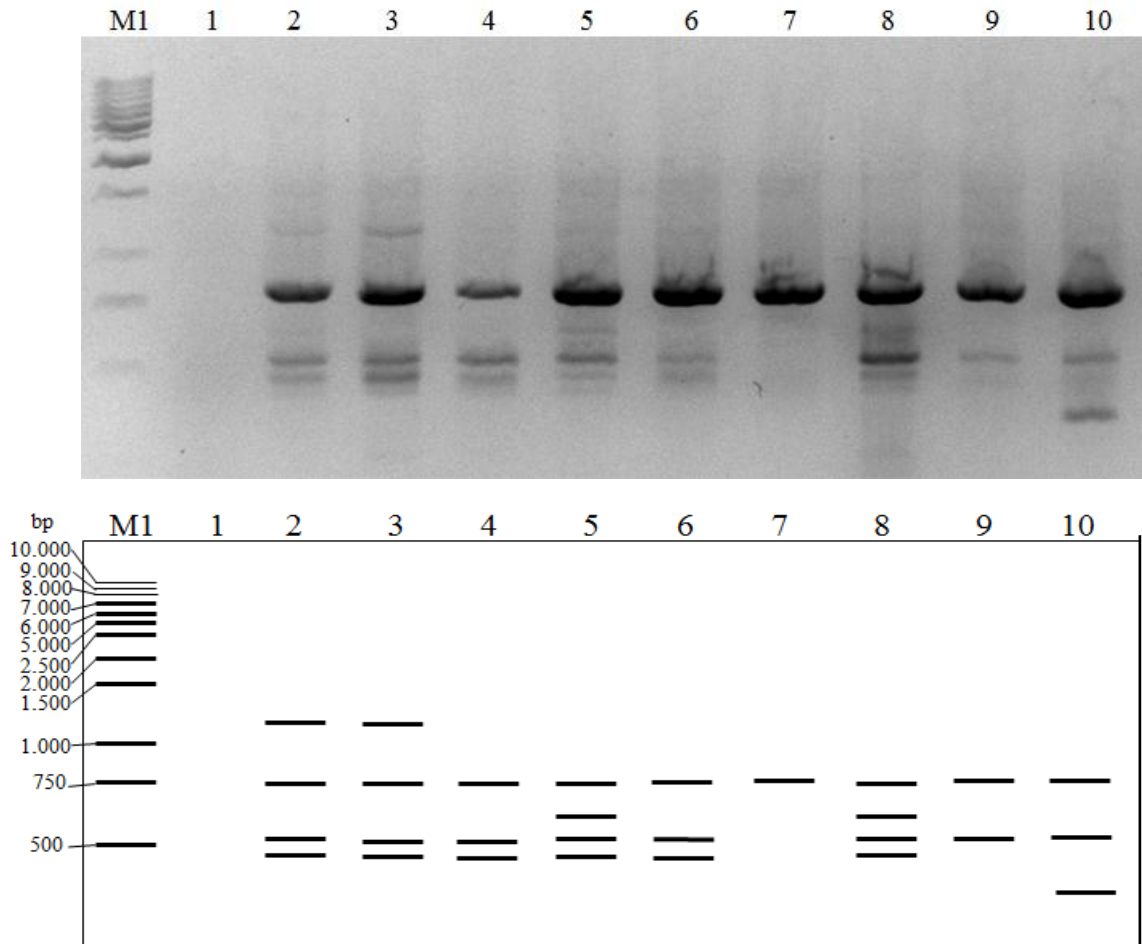
Salah satu cara deteksi komunitas bakteri adalah menggunakan metode *PCR-RISA*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada *D. citri* jantan terdapat 3 sampai 4 spesies bakteri, sedangkan pada *D. citri* betina terdapat 1 sampai 4 spesies bakteri. Ada persamaan dan perbedaan

jumlah bakteri pada *D. citri* jantan dan betina (gambar 1). Persamaannya adalah pada pita *DNA* dengan estimasi berat molekul 750, 600, 500 dan 480 bp. Perbedaannya adalah pada pita *DNA* dengan estimasi berat molekul 1.200 bp hanya terdapat pada *D. citri* jantan. Sebaliknya pita *DNA* dengan estimasi berat molekul 400 bp hanya terdapat pada *D. citri* betina (tabel 1). Semua bakteri tersebut belum diketahui dengan pasti nama spesiesnya karena dalam penelitian ini belum sampai sekuensing pita-pita *DNA* yang terbentuk.

Menurut Subandiyah *et al.* (2000), pada *D. citri* terdapat 5 spesies bakteri. Marutani-Hert *et al.* (2008) melaporkan ada 8 spesies bakteri pada *D. citri*, yaitu *Wolbachia*, *Janthinobacterium* sp., *Oxalobacteriaceae*, *Escherichia*, *Shigella*, *Alkanindiges illinoisensis*, *Acinebacter* sp., dan *Nitrosospora multiformis*.

Peneliti lain melaporkan ada 4 spesies bakteri pada *D. citri* yaitu *Candidatus Carsonella ruddii*, *Oxalobacter Herbaspirillum*, dan *Wolbachia* (Meyer & Hoy, 2008). Selanjutnya Nakabachi *et al.* (2013) melaporkan adanya 2 spesies bakteri pada *D. citri* yaitu *Carsonella*

rudii (Gammaproteobacteria) dan *Candidatus Proffrella armatura* (Betaproteobacteria). Sayangnya semua peneliti tersebut tidak menginformasikan lebih lanjut apakah bakteri-bakteri itu berasal dari *D. citri* jantan atau *D. citri* betina.



Gambar 1. Profil komunitas bakteri pada *Diaphorina citri* jantan dan betina menggunakan *PCR-RISA*. A. Profil asli; B. Profil skematik; M = marka DNA 1 Kb; 1 – 5 = *D. citri* jantan; 6 – 10 = *D. citri* betina

Tabel 1. Estimasi berat molekul pita DNA yang terbentuk pada *D. citri* jantan dan betina.

Estimasi berat molekul (bp)	<i>D. citri</i> jantan					<i>D. citri</i> betina				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.200	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
750	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
600	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
500	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
480	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Jumlah pita DNA	0	4	4	3	4	3	1	4	2	3

Himawan (2015) melaporkan ada 2 sampai 3 spesies bakteri pada *D. citri* jantan, yang produk pita DNA-nya sekitar 800, 550 dan 500 bp. Ada 2 sampai 3 populasi bakteri pada *D. citri* betina, yang produk pita DNA-nya sekitar 800, 550, 500 dan 400 bp. Semua bakteri itu belum diketahui dengan pasti nama spesiesnya karena belum dilakukan sekuensing DNA.

KESIMPULAN DAN SARAN

Metode *PCR-RISA* dapat untuk mendeteksi bakteri-bakteri yang ada pada *D. citri* jantan dan betina. Pada *D. citri* jantan terdapat 3 – 4 spesies bakteri sedangkan pada *D. citri* betina terdapat 1 – 4 spesies bakteri. Semua bakteri

tersebut belum diketahui dengan pasti nama spesiesnya.

Saran untuk penelitian lebih lanjut adalah melanjutkan sekuensing pita-pita DNA yang terbentuk dari *PCR-RISA*, sehingga diketahui dengan pasti nama spesies bakteri yang terdapat pada *D. citri* jantan dan betina.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. G.A.C. Beattie, Associate Prof. Paul Holford, Prof. Dr. Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc. selaku tim peneliti ACIAR (HORT 2000/043), yang telah memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Amann, R.I., W.Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* 59 (1) : 143–169
- Bove, J.M. 2006. Huanglongbing: A Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus, *J. Plant Pathol.* 88 (1): 7-37
- Capoor, S.P., D.G. Rao, and S.M. Viswanath. 1967. *Diaphorina citri* Kuway., A Vector of the Greening Disease of Citrus in India, *Indian J. Agric.Sci.* 37: 572-576
- Fakruddin, Md. and K.S.B. Mannan. 2013. Review paper. Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)* 42(1): 19-33
- Himawan, A. 2015. Disertasi. Asosiasi *Liberibacter asiaticus* Candidatus dengan Jeruk Siem Bergejala Huanglongbing dan Penularannya pada Anggota Rutaceae. Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Husain, M.A. and D. Nath. 1927. *The Citrus Psylla (Diaphorina citri, Kuw.) [Psyllidae: Homoptera]*, Memoirs of the Department of Agriculture in India, Entomological Series Vol. X, No. 2, Agricultural Research Institute, Pusa, India, 27 p
- Marutani-Hert, M., W.B. Hunter, and S. Dowd. 2008. *Endosymbiotic microbiota of Asian Citrus Psyllid (Diaphorina citri)*, IRCHLB Proceedings, p 224-227, www.plantmanagementnetwork.org
- Meyer, J.M. and M.A. Hoy. 2008. Molecular Survey of Endosymbionts in Florida Populations of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and Its Parasitoids *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Florida Entomologist* 91(2): 294-304.
- Nakabachi, A., R. Ueoka, K. Oshima, R. Tita, A. Mangoni, M. Gurgul, N.J. Oldham, G. van Echten-Deckert, K. Okamura, K. Yamamoto, H. Inoue, M. Ohkuma, Y. Hongoh, S. Miyagishima, M. Hattori, J. Piel and T. Fukatsu. 2013. Defensive Bacteriome Symbiont with a Drastically Reduced Genome, *Curr. Biology* 23: 1478-1484
- Subandiyah, S., N. Nikoh, S. Tsuyumu, S. Somowiyarjo and T. Fukatsu, 2000. Complex Endosymbiotic Microbiota of the Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea), *Zool. Sci.* 17: 983-989
- Tirtawidjaja, S. 1964. *Citrus Vein-Phloem Degeneration Virus Penjebab Dari Citrus Chlorosis Di Jawa*, Disertasi, Institut Pertanian Bogor, 84 hal.

Achmad Himawan dan Siti Subandiyah: Deteksi Komunitas Bakteri pada *Diaphorina*.....

Tirtawidjaja, S., T. Hadiwidjaja and A.M. Lasheen. 1965. Citrus Vein-phloem Degeneration Virus, a Possible Cause of Citrus Chlorosis in Java, *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 86: 235-243

van Vuuren, S.P. 1996. Huanglongbing, the official name for greening disease of citrus, *ITSC Info. Bull.*, p 5-6

Yu, Z. and W.W. Mohn. 2001. Bacterial Diversity and Community Structure in an Aerated Lagoon Revealed by Ribosomal Intergenic Spacer Analysis and 16S Ribosomal DNA Sequencing, *Appl. and Environ. Microbiol.* 67 (4): 1565-1574