

## Pengaruh Penyakit Huanglongbing terhadap Keragaman Bakteri Rizosfer Pada Tanaman Jeruk

Ika Afifah Nugraheni\*, Tri Joko

\*Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta  
Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada

[ikaafifah@unisayogya.ac.id](mailto:ikaafifah@unisayogya.ac.id)

---

### ABSTRAK

Latar belakang: Huanglongbing (HLB) merupakan penyakit yang paling berbahaya pada tanaman jeruk di seluruh dunia. Untuk wilayah Asia, penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Selain menurunkan pertumbuhan dan produktivitas tanaman jeruk, penyakit huanglongbing juga dapat mengubah keragaman mikrobial di lingkungan khususnya di daerah perakaran tanaman (rizosfer). Tujuan: Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui perubahan keragaman mikrobial di dalam rizosfer akibat infeksi huanglongbing pada tanaman jeruk. Metode: Dua macam pupuk hayati digunakan dalam penelitian ini, dengan masing-masing 3 sub perlakuan. Pengambilan sampel dilakukan sebelum dan 1 tahun setelah perlakuan. Teknik isolasi bakteri rizosfer yang digunakan adalah *dependent culture*. Analisis PCR-RISA dilakukan untuk mengetahui komunitas bakteri pada rizosfer secara molekuler. Data selanjutnya diolah berdasarkan indeks keragaman Shannon-Wiener. Hasil: Hasil elektroforesis memberikan panjang pita DNA ITS (*intergenic spacer region*) yang bervariasi, dengan ketebalan tertentu yang menunjukkan perbedaan jumlah populasi. Perlakuan non pupuk hayati-non inokulasi (NPH NI) memberikan jumlah pita DNA paling beragam di antara perlakuan lainnya. Sedangkan berdasarkan analisis indeks keragaman Shannon-Wiener, sampel rizosfer sebelum perlakuan memberikan nilai diversitas yang paling besar di antara sampel lainnya yaitu sebesar 3,33. Kesimpulan: Rizosfer tanaman jeruk tanpa aplikasi pupuk hayati memiliki keragaman bakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan rizosfer tanaman jeruk dengan aplikasi pupuk hayati maupun yang diinfeksi HLB.

**Kata kunci:** huanglongbing, keragaman bakteri rizosfer, tanaman jeruk, PCR-RISA

©2017 Proceeding Health Architecture. All rights reserved

### PENDAHULUAN

Jeruk termasuk buah unggulan di Indonesia. Salah satu varietas jeruk yang dibudidayakan oleh petani Indonesia yaitu jeruk siem. Jeruk siem tumbuh dan berkembang di berbagai wilayah di Indonesia, seperti Jawa Barat, Jawa Timur, Jawa Tengah, Bali, Kalimantan Barat, dan Sulawesi Selatan (Taufik *et al.*, 2010). Namun, terdapat beberapa kendala dalam pembudidayaannya. Salah satunya yaitu serangan organisme pengganggu tanaman (OPT), terutama *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*Ca. L. asiaticus*), penyebab penyakit huanglongbing (HLB) atau di Indonesia lebih dikenal dengan nama *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD).

*Ca. L. asiaticus* termasuk kelompok *α-proteobacteria*, bakteri gram negatif dan sulit untuk dikulturkan (Sechler *et al.*, 2009). Bakteri tersebut hampir menyerang seluruh varietas tanaman jeruk di Indonesia. Penyebaran HLB dapat melalui dua cara, yaitu ditularkan langsung

oleh vektornya, *Diaphorina citri* Kuwayama, maupun *grafting* dari tanaman jeruk yang telah terinfeksi.

Secara umum, gejala HLB pada tanaman jeruk terlihat di bagian daun, yaitu adanya belang-belang kuning yang kontras dengan daun yang masih sehat. Selanjutnya, gejala menyebar ke seluruh bagian tanaman hingga ke bagian perakaran. Apabila gejala sudah parah, percabangan tanaman akan mati dan diikuti oleh kematian tanaman (Nugraheni, 2014).

Hanya ada sedikit studi yang mengamati pengaruh patogen terhadap struktur komunitas bakteri yang berasosiasi dengan tanaman. Keberadaan penyakit huanglongbing pada tumbuhan akan berpengaruh pada struktur dan komposisi komunitas bakteri yang berasosiasi dengan tanaman jeruk (Trivedi *et al.*, 2011). Selain berpengaruh terhadap tanah dan produksi tanaman, keragaman bakteri pada rizosfer juga dapat mempengaruhi keberlanjutan agro ekosistem di sekitarnya (Nannipieri *et al.*, 2003).

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui perubahan keragaman bakteri di sekitar perakaran tanaman jeruk yang terinfeksi penyakit huanglongbing dengan berbagai perlakuan. Pada penelitian ini juga dilakukan introduksi bakteri eksogenus ke dalam lingkungan rizosfer tanaman jeruk.

## BAHAN DAN METODE

Deskripsi lahan dan pengambilan sampel rizosfer

Lahan percobaan memiliki luas 15 x 20 m. Bibit jeruk merupakan hasil okulasi Japanese citroen (batang bawah) dengan siem Pontianak (batang atas) yang diperoleh dari Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura, Jawa Timur. Penelitian dilakukan mulai dari bulan April 2012 hingga Oktober 2012. Lahan tanaman dibagi menjadi 6 perlakuan, masing-masing perlakuan terdiri dari 20 tanaman jeruk siem. Keseluruhan tanaman perlakuan berjumlah 120 tanaman. Jarak tanam antar tanaman jeruk siem yaitu 2 x 2 m. Metode penularan bakteri *Ca. L. asiaticus* ke tanaman perlakuan dilakukan dengan teknik penempelan mata tunas dari tanaman jeruk lain yang telah positif HLB berdasarkan deteksi molekuler. Pengambilan tanah rizosfer dilakukan di daerah perakaran masing-masing perlakuan dari tanaman sampel. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan ke 0 setelah penanaman, dan bulan ke enam pada daerah perakaran untuk masing-masing perlakuan. Setiap perlakuan diambil 4-6 titik pengambilan dengan kedalaman jeluk tanah  $\pm$  10-30 cm. Sampel tanah yang diperoleh selanjutnya dikompositkan dan digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Isolasi bakteri *culturable* dari rizosfer

Sampel tanah sebanyak 10 g diambil dan dihomogenkan dengan 90 ml aquades steril pH 7,5 menggunakan vortex. Suspensi bakteri yang diperoleh dilakukan pengenceran berseri sampai  $10^{-4}$  pada tabung reaksi. Pengenceran ini dilakukan dengan mencampur 1 ml suspensi bakteri pada 9 ml aquades steril. Suspensi bakteri pengenceran  $10^{-2}$  sampai dengan  $10^{-4}$ , masing-masing diambil 100  $\mu$ l, ditabur pada medium *Soil Extract Agar* dan diratakan dengan

L-glass. Hasil isolasi bakteri diinkubasikan pada suhu ruang selama 72 jam.

Isolasi DNA bakteri

DNA genomik bakteri diperoleh menggunakan metode Sambrook *et al.* (1989) yang telah dimodifikasi. Isolat bakteri yang telah ditumbuhkan pada medium pertumbuhan diambil secara keseluruhan menggunakan L-glass dan disuspensikan ke dalam tabung bervolume 1,5 ml yang berisi 540  $\mu$ l TE buffer. SDS 10 % sebanyak 30  $\mu$ l ditambahkan ke dalam tabung tersebut, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Langkah selanjutnya yaitu penambahan 100  $\mu$ l NaCl 5 M dan 80  $\mu$ l CTAB/NaCl, serta diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. CIAA sebanyak 750  $\mu$ l ditambahkan ke dalam tabung dan disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Sampel akan terbentuk 2 lapisan, bagian supernatan dan pelet. Bagian supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung baru bervolume 1,5 ml. Cairan PCIAA (*Phenol-chloroform-isoamyl alcohol*) ditambahkan ke dalam tabung, kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Bagian supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru bervolume 1,5 ml, dan ditambahkan dengan etanol 96 %, selanjutnya diinkubasi selama 1 jam pada suhu -20°C. Sampel disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Bagian supernatan dibuang dan dicuci dengan etanol 70 %, lalu disentrifus kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Pelet dikeringanginkan, ditambah dengan miliqwater atau aquabides sebanyak 30  $\mu$ l dan disimpan pada pendingin suhu -20°C untuk digunakan selanjutnya.

Penggandaan sekuen gen antara 16S dan 23S rDNA dengan teknik PCR

Primer yang digunakan untuk RISA adalah primer S926f/L189r (Yu and Mohn, 2001). Setiap sampel menggunakan volume akhir 20  $\mu$ l yang terdiri dari 10  $\mu$ l kit KAPA, 2  $\mu$ l primer L189r 10 pmol, 2  $\mu$ l primer S926f 10 pmol, 2  $\mu$ l DNA cetakan, dan 4  $\mu$ l aquabides ataupun *nuclease free water*. Penggandaan sekuen antara gen ribosomal 16S dan 23S digunakan mesin PCR dengan program sebagai berikut, 1 siklus pre denaturasi suhu 95°C selama 2 menit; 35 siklus

untuk: denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 47°C selama 45 detik, ekstensi 72°C selama 2 menit; dan 1 siklus ekstensi akhir 72°C selama 5 menit.

#### Elektroforesis

Elektroforesis hasil RISA dilakukan menggunakan gel poliakrilamida 8% yang tersusun atas 12,5 ml aquabides, 5,3 ml poliakrilamida 30%, 2 ml TBE (Tris-Borat-EDTA) 10x, 180 µl APS, dan 20 µl TEMED (Ausubel *et al.*, 1995). Hasil RISA sebanyak 5 µl dimasukkan ke dalam tiap sumuran pada gel. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 70 v selama 2,5 jam menggunakan larutan penyangga TBE 1x.

#### Pewarnaan perak nitrat

Setelah selesai elektroforesis, tahapan dilanjutkan dengan pewarnaan gel menggunakan perak nitrat, yaitu gel hasil elektroforesis dilepas dan direndam asam asetat glasial 10% selama 24 jam. Larutan asam asetat tersebut dibuang, dan gel dicuci dengan aquabides sebanyak 3 kali, masing-masing selama 3 menit. Setelah itu, gel dimasukkan dalam larutan 0,1% perak nitrat (0,1 g) dan 0,056% formaldehid yang dilarutkan dalam 100 ml aquades. Gel didiamkan selama 1 jam dengan cara dibungkus kertas warna hitam. Setelah itu, gel dicuci dengan aquabides kembali selama 10 detik. Selanjutnya, gel dimasukkan dalam larutan developing yang terdiri dari 3% natrium karbonat (3g), 0,056% formaldehid (151 µl), dan 0,2 mg natrium thiosulfat. Gel dalam larutan developing tersebut digoyang dengan tangan sampai pita DNA-nya terlihat (bila larutan developing sudah berwarna coklat harus diganti lagi, kemudian digoyang lagi sampai pita DNA terlihat dan jangan sampai gosong). Bila band sudah terlihat, penambahan developing dihentikan dan gel dimasukkan dalam larutan asam asetat glasial 10%.

#### Analisis Data

Pita-pita DNA yang diperoleh dari hasil elektroforesis dibuat menjadi suatu matriks. Kemunculan pita DNA pada setiap sampel diberi indeks 1, sedangkan yang tidak muncul diberi indeks 0. Matriks data yang diperoleh dianalisis keragamannya berdasarkan perhitungan

Shannon-Wiener (Nolan dan Callahan, 2005) dengan rumus sebagai berikut :

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

$H'$  = indeks keragaman Shannon-Wiener,  $s$  = jumlah spesies,  $p_i$  = individu tiap spesies dibagi jumlah total individu. Hasil indeks keragaman dapat dibagi menjadi beberapa kelompok;  $H' < 1$  keragaman rendah,  $1 < H' < 3$  keragaman sedang, dan  $H' > 3$  keragaman tinggi.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Kerapatan bakteri rizosfer

Perhitungan kerapatan bakteri rizosfer dilakukan untuk mengetahui pengaruh infeksi *Ca. Liberibacter asiaticus* dan aplikasi pupuk hayati terhadap komunitas bakteri di perakaran. Hasil kerapatan bakteri tertinggi diperoleh pada rizosfer perlakuan NPH NI dengan hasil  $1,81 \times 10^5$  CFU/ml, yang diikuti oleh sampel tanah pra perlakuan (gambar 1). Pada tanah rizosfer kelompok tanaman yang diinokulasi *Ca. L. asiaticus*, kerapatan bakteri paling banyak pada perlakuan NPH I, yaitu sebesar  $1,3 \times 10^5$  CFU/ml. Aplikasi pupuk hayati pada tanaman jeruk muda, baik tanpa maupun dengan inokulasi *Ca. L. asiaticus* cenderung memberikan kerapatan bakteri rizosfer yang rendah, baik pupuk hayati A maupun B. Trivedi *et al.* (2012) menjelaskan bahwa introduksi bakteri ekstrogenus ke ekosistem akan mempengaruhi kestabilan komunitas bakteri, bahkan mempengaruhi fungsinya dalam ekosistem. Selain itu, infeksi patogen pada tanaman akan mengubah eksudat akarnya sehingga mempengaruhi keberadaan komunitas bakteri dalam rizosfer tanah (Walker *et al.*, 2003).

Keragaman nutrisi dan metabolit sekunder pada eksudat akar yang dihasilkan tanaman mempengaruhi keragaman bakteri di rizosfer. Perubahan fisiologi tanaman karena infeksi patogen dapat mengubah komunitas rizosfer dan fungsinya (van der Putten *et al.*, 2007). Introduksi patogen akan mengubah jumlah komposisi asam organik, gula dan nutrisi esensial lainnya pada eksudat akar. Tanaman yang terinfeksi *Ca. L. asiaticus* mengakumulasi pati dalam daun. Transportasi hasil fotosintesis menuju akar terganggu karena kerusakan jaringan floem sehingga akar hanya mengkonsumsi sisa cadangan pati yang tersimpan untuk

keberlangsungan aktivitas metabolismenya. Hal tersebut akan mengarah pada kematian akar, bahkan tanaman secara keseluruhan. Perubahan fisiologi tanaman ini mengarah pada perubahan kualitas dan kuantitas hasil fotosintesis maupun eksudat akar yang akan mempengaruhi keragaman mikroorganisme rizosfer (Trivedi *et al.*, 2012).



Gambar 1. Kerapatan bakteri rizosfer pada berbagai perlakuan tanaman jeruk muda setelah 6 bulan pengamatan dengan standar error. Keterangan gambar :

NPH NI, tanpa inokulasi *Ca. L. asiaticus*, tanpa perlakuan pupuk hayati.

NPH I, inokulasi *Ca. L. asiaticus*, tanpa perlakuan pupuk hayati.

PHA NI, tanpa inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati A.

PHA I, inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati A.

PHB NI, tanpa inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati B.

PHB I, inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati B.

Berdasarkan penelitian Trivedi *et al.* (2012), infeksi *Ca. L. asiaticus* ke tanaman dapat menurunkan keberadaan kelompok bakteri rizosfer *Proteobacteria* seperti *Pseudomonas* spp. dan *Burkholderia* spp. *Proteobacteria* merupakan kelompok bakteri yang dominan di rizosfer berbagai spesies tanaman. Sedangkan pada rizosfer tanaman terinfeksi *Ca. L. asiaticus* didominasi oleh kelompok bakteri *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, dan *Firmicutes* (termasuk *Bacillus* spp.). Kelompok tersebut tidak terlalu terpengaruh oleh perubahan eksudat di sekitar perakaran tanaman.

### Analisis Keragaman Komunitas Bakteri Rizosfer Berdasarkan PCR-RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*)

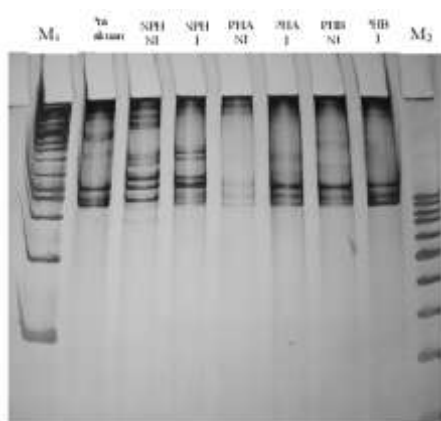
Analisis PCR-RISA dilakukan untuk mengetahui komunitas bakteri pada rizosfer secara molekuler. Metode ini mengamplifikasi gen antara 16S dan 23S yang dimiliki oleh bakteri. Teknik isolasi bakteri rizosfer yang digunakan adalah *dependent culture*, yaitu bakteri rizosfer diisolasi dan ditumbuhkan pada medium pertumbuhan, selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA genomnya.

Hasil elektroforesis memberikan panjang pita DNA ITS (*intergenic spacer region*) yang bervariasi sebagaimana disajikan pada gambar 2. Pada RISA, satu pita DNA dianggap mewakili satu komunitas bakteri dalam rizosfer. Oleh karena itu, perbedaan keberadaan pita DNA pada hasil elektroforesis menunjukkan adanya perbedaan populasi bakteri dalam rizosfer. Pita DNA dengan ketebalan tertentu menandakan keberadaan bakteri rizosfer yang melimpah dalam suatu sampel (Ranjard *et al.*, 2000). Visualisasi pita yang tebal menggambarkan tingginya komunitas suatu bakteri dalam rizosfer tanah, sebaliknya dengan pita tipis yang menunjukkan rendahnya komunitas suatu bakteri. Ketujuh sampel perlakuan menunjukkan visualisasi ketebalan pita yang beragam. Panjang pita DNA ITS yang diperoleh berkisar antara 400-10,000 bp.

Sampel NPH NI memberikan jumlah pita yang paling beragam di antara sampel lainnya. Hasil ini diperkuat dengan penelitian Trivedi *et al.*, (2012) yang menyatakan bahwa tanaman sehat akan memiliki keragaman komunitas bakteri yang lebih tinggi dibandingkan pada tanaman terinfeksi *Ca. L. asiaticus*. Hasil selanjutnya diikuti dengan sampel pra perlakuan, perlakuan pupuk hayati B yang diinokulasi *Ca. L. asiaticus* dan kontrol negatif. Perlakuan pupuk hayati A, baik tanpa inokulasi maupun inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dan pupuk B tanpa inokulasi *Ca. L. asiaticus* memberikan visualisasi pita DNA yang mirip meskipun memiliki ketebalan yang berbeda.

Analisis pita DNA hasil PCR-RISA pada semua sampel perlakuan setelah 6 bulan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pita DNA jika dibandingkan dengan sampel pra perlakuan. Kemunculan maupun hilangnya pita

DNA pada hasil elektroforesis sampel perlakuan mengindikasikan bahwa pemberian pupuk hayati maupun inokulasi *Ca. L. asiaticus* pada tanaman mempengaruhi eksudat akar yang dihasilkan tanaman sehingga berpengaruh pada komunitas bakteri di sekitar perakaran. Eksudat akar merupakan senyawa organik yang mudah didegradasi oleh bakteri dan digunakan untuk pertumbuhannya, sehingga keberadaan eksudat akar akan menarik bakteri untuk berkoloni di rizosfer (Walker *et al.*, 2003).



Gambar 2. Visualisasi hasil elektroforesis komunitas bakteri rizosfer berdasarkan PCR-RISA. Keterangan : M<sub>1</sub> adalah marker 1 kb, M<sub>2</sub> adalah marker 100 bp. Keterangan : NPH NI, tanpa inokulasi *Ca. L. asiaticus*, tanpa perlakuan pupuk hayati. NPH I, inokulasi *Ca. L. asiaticus*, tanpa perlakuan pupuk hayati. PHA NI, tanpa inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati A. PHA I, inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati A. PHB NI, tanpa inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati B. PHB I, inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati B.

Perhitungan indeks keragaman Shannon-Wiener dihitung dari profil pita DNA yang diperoleh. Hasil perhitungan ditampilkan pada gambar 3 di bawah ini. Berdasarkan indeks keragaman Shannon-Wiener, sampel rizosfer pra perlakuan mempunyai nilai diversitas paling besar di antara sampel lainnya yaitu 3,33 yang diikuti dengan sampel NPH NI sebesar 3,29. Indeks keragaman terkecil berada pada sampel PHA NI yaitu 2,48.



Gambar 3. Nilai indeks keragaman Shannon-Wiener sampel rizosfer tanaman jeruk muda. Keterangan tabel : NPH NI, tanpa inokulasi *Ca. L. asiaticus*, tanpa perlakuan pupuk hayati. NPH I, inokulasi *Ca. L. asiaticus*, tanpa perlakuan pupuk hayati. PHA NI, tanpa inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati A. PHA I, inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati A. PHB NI, tanpa inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati B. PHB I, inokulasi *Ca. L. asiaticus*, dengan perlakuan pupuk hayati B.

Semakin tinggi nilai indeks keragaman suatu sampel menandakan bahwa semakin tinggi keragaman spesiesnya. Sampel pra perlakuan maupun NPH NI memberikan keragaman bakteri rizosfer yang tinggi, sedangkan sampel lainnya berada pada tingkat keragaman sedang. Aplikasi pupuk hayati maupun inokulasi patogen *Ca. L. asiaticus* pada tanaman jeruk muda tidak berpengaruh terhadap nilai indeks keragaman bakteri dalam rizosfer.

## KESIMPULAN

Infeksi patogen tanaman (fitopatogen) dapat mengubah produktivitas dari komunitas tanaman, termasuk perubahan kualitas dan kuantitas bahan organik yang masuk ke dalam tanah dan eksudat akar. Perubahan ini sudah barang tentu mengubah komunitas bakteri rizosfer. Penelitian ini memberikan kesimpulan bahwa rizosfer tanaman jeruk tanpa aplikasi pupuk hayati memiliki keragaman bakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan rizosfer tanaman jeruk dengan aplikasi pupuk hayati maupun yang diinfeksi HLB. Pemberian bakteri eksogenus dapat mengubah komunitas bakteri rizosfer, selain keberadaan fitopatogen. Di sisi lain, bakteri

eksogenus tersebut dapat meningkatkan produktivitas tanaman jeruk yang terinfeksi fitopatogen, HLB.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel, F.M., R. Brent., R.E. Kingston., D.D. Moore., J.G. Seidman., J.A.Smith., and K. Struhl. 1995. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd Edition. John Wiley & Sons Inc. California, USA.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* 54: 655–670.
- Nolan, K.A. dan Callahan, J.E. 2005. Beachcomber Biology: The Shannon-Weiner Species Diversity Index. Proceedings of the 27th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). 27:334-338.
- Nugraheni, I.A. 2014. Tanggapan Tanaman Jeruk Terinfeksi *Candidatus Liberibacter asiaticus* Terhadap Aplikasi Pupuk Hayati. Tesis. Program Studi Bioteknologi, Jurusan Antar Bidang, Sekolah Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Gourbière, F., Thioulouse, J., and Nazaret, S. 2000. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb Ecol.* 39:263-272.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. English.
- Sechler, A., Schuenzel, E.L., Cooke, P., Donnua, S., Thaveechai, N., Postnikova, E., Stone, A.L., Schneider, W.L., Damsteegt, V.D., and Schaad, N.W. 2009. Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' Associated with Huanglongbing. *Bacteriol.* 99:480-486.
- Taufik, M., Khaeruni, A., Pakki dan Gianto. 2010. Deteksi keberadaan *citrus vein phloem degeneration* (CVPD) dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) di Sulawesi Tenggara. *J. HPT Tropika.* 10:73-79.
- Trivedi, P., Spann, T.M., Wang, N. 2011. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. *Microbial Ecol.* e-pub ahead of print 28 February 2011.
- Trivedi, P., He, Z., Van Nostrand, J.D., Albrigo, G., Zhou, J. and Wang, N. 2012. Huanglongbing alters the structure and functional diversity of microbial communities associated with citrus rhizosphere. *The ISME J.* 6:363-383.
- Van der Putten, W.H, Klironomos, J.N, Wardle, D.A. 2007. Microbial ecology of biological invasions. *ISME J.* 1:28–37.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., and Vivanco, J.M. 2003. Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol.* 132:44-51.
- Yu, Z and Mohn, W.W. 2001. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and 16S Ribosomal DNA Sequencing. *Appl. and Env. Microb.* 4:1565–1574.