

Perkembangan Penyakit Diplodia pada Tiga Isolat *Botryodiplodia theobromae* Path dan Peran Toksin Dalam Menekan Penyakit pada Jeruk (*Citrus* spp.) [*Diplodia Disease Development and Toxin of Three Isolates Botryodiplodia theobromae* Path. on Citrus (*Citrus* spp.)]

Mutia Erti Dwiastuti¹⁾, Gusti Ngurah Ketut Budiarta²⁾, dan Loekas Soesanto³⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jln. Raya Tlekung No. 1, Junrejo, Batu, Jawa Timur, Indonesia 65301

²⁾Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Jln. Raya Mayjen Haryono, Malang, Jawa Timur, Indonesia 65145

³⁾Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman, Jln. Dr. Soeparno No. 61, Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia 53123

E-mail: mutiaed@gmail.com

Diterima: 28 Desember 2016; direvisi: 31 Juli 2016; disetujui: 6 Desember 2017

ABSTRAK. Penyakit diplodia (*Botryodiplodia theobromae*) pada tanaman jeruk menyebar cukup luas di sentra jeruk Indonesia. Serangan parah penyakit dapat menyebabkan kematian apabila tidak dikendalikan. Tujuan penelitian adalah mengetahui patogenisitas dan peran toksin dari tiga isolat *B. theobromae* asal Pasuruan dan Magetan pada jeruk siam, pabello, dan manis. Penelitian dilakukan di Laboratorium dan Rumah Kasa Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika pada bulan November 2015 – Mei 2016. Penelitian terdiri atas dua percobaan, yaitu uji patogenisitas pada tanaman dan uji toksin kasar pada skala laboratorium. Uji patogenisitas menggunakan rancangan acak kelompok dengan sembilan kombinasi perlakuan terdiri atas tiga jenis isolat, yaitu Mg52A.1, dan Mg39.2 (asal Magetan), Ps8b (asal Pasuruan), serta tiga jenis tanaman jeruk (pabello, siam, manis). Parameter pengamatan terdiri atas masa inkubasi, jumlah sampel nekrosis, dan luas gejala. Perlakuan pengujian toksin terdiri atas kontrol tanpa toksin, toksin kasar isolat Mg52A.1, toksin kasar isolat Mg39.2, dan toksin kasar isolat Ps8b. Aplikasi toksin dilakukan pada daun tiga varietas jeruk dengan rancangan acak lengkap, tiap perlakuan diulang tiga kali dan masing-masing terdiri atas dua daun asal tanaman yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa masa inkubasi isolat Mg39.2 lebih cepat dibandingkan dengan isolat Mg52A.1 dan Ps8b. Ketiga isolat patogen *B. theobromae* asal Pasuruan dan Magetan memiliki patogenisitas yang sama dalam menimbulkan gejala penyakit pada jeruk pabello, siam, dan manis, sedangkan toksin hanya berperan dalam mempercepat masa inkubasi.

Kata kunci: Jeruk; Patogenisitas; *Botryodiplodia theobromae*; Toksin kasar

ABSTRACT. Diplodia disease (*Botryodiplodia theobromae*) spread quite widely in Indonesia citrus center. Severe attacks of disease can cause death if it not controlled. The purpose of this study was determine the pathogenicity and the effect of toxins from three isolates of *B. theobromae* origin Pasuruan and Magetan on tangerine, pummelo, and sweet orange varieties. The study was conducted at Indonesian Citrus and Subtropical Research Institute during November 2015 – May 2016. This observation consisted of two experiments that pathogenicity test in screenhouse and crude toxin of patogen test in laboratory. Pathogenicity test used randomized block design arranged as factorial. The first factor was three isolates: Mg52A.1, Mg39.2 (from Magetan), Ps8b (from Pasuruan) and the second factor were kind of citrus (pummelo, tangerine, and sweet orange). The observation parameter consist of the incubation period, the number of necrotic samples and visual symptom. Crude toxin test treatment consists of a control test toxin without toxins, crude toxin Mg52A.1, crude toxin Mg39.2 toxin, crude toxin Ps8b. Application toxin carried out on the three leaf varieties of oranges. Each treatment was repeated three times and each consists of two leaves of different varieties. The results showed that the incubation period Mg39.2 isolates faster than two other isolates. Infection with different isolates and treatment of different citrus varieties shows that it did not different significantly in causing disease symptom of diplodia. Similarly result on crude toxin treatment with three isolates on three varieties showed that it were not different necrotic symptom. Thus the three isolates of pathogens *B. theobromae* origin from Pasuruan and Magetan have the same pathogenicity in causing disease symptoms in citrus pummelo, tangerine, and sweet orange. Toxin only play a role in accelerating the incubation period.

Keywords : Citrus; Pathogenicity; *Botryodiplodia theobromae*; Crude toxin

Penyakit diplodia atau dikenal sebagai penyakit *blendok* mengancam kerusakan dan kematian 63.431 ha lahan jeruk di tanah air. Dulu penyakit ini dianggap tidak berbahaya, tidak seperti penyakit *Citrus vein phloem degeneration* (CVPD). Namun, sekarang faktanya serangan penyakit CVPD hanya 2 – 3% saja, sedang penyakit ini telah menyerang 35–40% populasi di sentra jeruk. Perubahan iklim sejak tahun 2009 – 2010 yang cenderung basah diduga menjadi penyebab menganasnya penyakit yang disebabkan oleh

cendawan *Botryodiplodia theobromae* Path. (Wiyono 2011) sinonim dengan *Lasioidiplodia theobromae* (Pat) Griff & Maubl (Punithalingan 1980 dalam Pedraza et al. 2013). Sebaran geografis penyakit ini sangat luas, lebih dari 22 provinsi, kabupaten, kota sentra jeruk (mulai dari Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, Bali, NTT, Sumatera, Kalimantan, dan Sulawesi (Pascapanen 2010). Faktor yang memengaruhi perkembangan penyakit adalah aliran irigasi, percikan air, dan jenis inang (Semangun 2000, Dwiastuti et

al. 2016, Khanzada *et al.* 2004, Khalil 2010). Upaya pengendalian yang tepat dan terpadu sangat perlu dilakukan, agar jangan sampai mengalami masa suram seperti epidemi CVPD pada tahun 70-an. Pengendalian terpadu harus dilakukan mulai dari pemeliharaan optimal, sanitasi, pengendalian hayati, pemberian fungisida yang tepat, penggunaan belerang atau bubuk Bordox serta penggunaan tanaman sela dan tanaman penutup. Menanam jauh dari tanaman inang patogen *B. theobromae* seperti anggur (Úrbez-Torres *et al.* 2008), mangga (Saeed *et al.* 2011, Khanzada *et al.* 2004), cacao, pisang, yam (Twumasi *et al.* 2014), sapote memey (Pedraza *et al.* 2013), dan mawar (Chen *et al.* 2016) sangat disarankan dalam upaya menghindarkan terjadinya infeksi.

Pengetahuan tentang patogenisitas dan peran toksin dalam meningkatkan keparahan penyakit diperlukan agar dapat mempermudah tindakan pengendalian lebih awal (Gusnawaty & Mariadi 2013). Hasil penelitian terdahulu membuktikan keterlibatan toksin dalam patogenisitas penyakit dan virulensi patogen selama infeksi *B. theobromae* pada mangga. Parthasarathy *et al.* (2016) juga melakukan uji hayati pada cairan delapan strain *L. theobromae* pada mangga, hasilnya menunjukkan bahwa semua strain dapat menghasilkan toksin pada kultur cair menyebabkan layu dengan keparahan yang berbeda pada benih mangga. Toksin yang dihasilkan diproduksi pada kondisi optimal, pH 6,0 dan suhu antara 25°–35°C dalam media PDB yang digoyang dengan *shaker* selama 13 hari. Pada jeruk crude, toksin patogen diplodia bersifat toksik terhadap jeruk siam Banjar, jeruk irisan, jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk sambal (Salamiah 2009).

Tujuan penelitian untuk mengetahui perkembangan penyakit dan peran toksin tiga isolat *B. theobromae* asal Pasuruan dan Magetan pada jeruk siam, pamel, dan manis. Hipotesis penelitian adalah perkembangan penyakit dan peran toksin berbeda pada varietas yang berbeda. Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi informasi mengenai kemampuan patogen pada tiga varietas jeruk dalam menimbulkan penyakit diplodia.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan November 2015 – Mei 2016 di Laboratorium Fitopatologi dan Rumah Kasa Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro), Kota Batu. Penelitian terdiri atas dua bagian, yaitu studi perkembangan penyakit tiga isolat *B. theobromae* pada tiga jenis jeruk dan

uji toksin kasar yang dihasilkan oleh tiga isolat *B. theobromae*.

Studi Perkembangan Penyakit Tiga Isolat *B. theobromae* pada Tiga Jenis Jeruk

Uji patogenisitas isolat *B. theobromae* pada tiga jenis jeruk menggunakan rancangan acak kelompok dengan perlakuan kombinasi tiga jenis isolat Mg52A.1, Mg39.2 (asal Magetan), Ps8b (asal Pasuruan), dan jenis tanaman jeruk (pamel, siam, manis), masing-masing diulang tiga kali dan tiap perlakuan menggunakan dua unit tanaman jeruk.

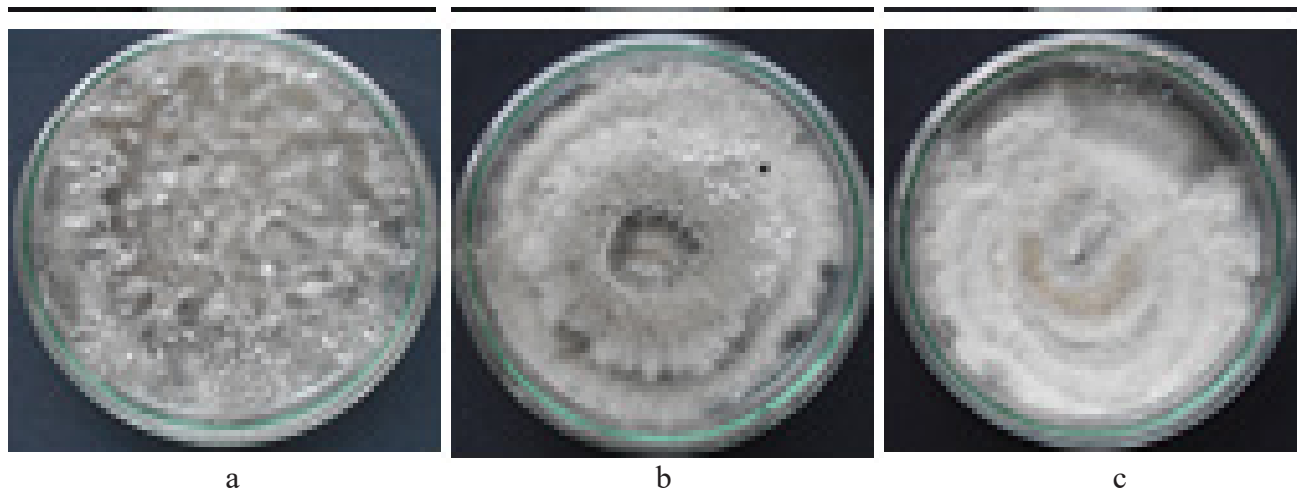
Penyiapan isolat murni *B. theobromae* dan Sumber Inokulum Pengujian

Dua isolat *B. theobromae* koleksi Balitjestro asal Kabupaten Magetan dan satu isolat asal Kabupaten Pasuruan yang telah diuji potensinya di laboratorium pada tahun sebelumnya digunakan untuk penelitian ini. Isolat diremajakan dalam cawan petri dengan cara mengambil miselium tunggal (Aboul-Nasr & Abdul 2014), (Zhang *et al.* 2013), dipindahkan ke media PDA yang baru sampai didapatkan biakan murni (Gambar 1). Dan ditumbuhkan pada pH 7 untuk menginduksi pertumbuhan miselium dan produksi picnidial (Latha *et al.* 2013).

Sumber inokulum untuk pengujian yang digunakan berupa batang yang telah terinfeksi patogen dalam biakan murni (Gambar 2). Pembuatan sumber inokulum menggunakan metode (Putra *et al.* 2013) yang dimodifikasi, yaitu batang jeruk sehat berukuran 1 cm disterilisasi dua kali masing masing dengan alkohol 70% selama 1 menit, kloroks selama 1 menit dan akuades steril selama satu menit. Kemudian potongan batang tersebut dimasukkan dalam biakan patogen *B. theobromae* murni dalam media PDA (*potato dextrose agar*) dan diinkubasi selama 1 minggu sampai batang terinfeksi patogen yang ditandai dengan gejala kecokelat-cokelatan dan diselimuti miselium patogen serta mengeluarkan eksudat cair berwarna kuning, seperti yang diteliti oleh (Agbeniyi & Ayodele 2013) pada daun yang sudah diinfeksi *L. theobromae*. Batang terinfeksi sebagai sumber inokulum tersebut diinokulasikan pada tanaman sesuai dengan perlakuan.

Penyiapan Tanaman Uji dan Pemeliharaan

Tiga varietas tanaman jeruk umur 12 bulan (siam, pamel, dan manis) dengan batang bawah JC ditanam dalam *polibag* ukuran 3 kg dengan media tanah dan sekam. Pemeliharaan tanaman meliputi pemupukan, penyiangan gulma, dan penyiraman tanaman serta pengendalian hama penyakit lain. Pemupukan dengan NPK (15:15:15) sebanyak 2 g per tanaman dan dilakukan sebulan sekali. Penyiangan gulma dilakukan



Gambar 1. (a) Isolat Mg52A.1 (b) isolat Mg39.2, dan (c) isolat Ps8b umur 28 hari pada media PDA [(a) *Mg52A.1* isolate, (b) *Mg39.2* isolates, and (c) *Ps8b* isolate, 28 days old on PDA]



Gambar 2. Sumber inokulum potongan batang jeruk pamele dalam biakan murni isolat (a) Mg52A.1, (b) Mg39.2, dan (c) Ps8b, 7 hari setelah ditanam dalam isolat murni umur 1 bulan. Lingkaran merah, eksudat berwarna kuning (gum). Lingkaran kuning, potongan batang untuk sumber inokulum patogen (*Inoculum source of pummelo stem on pure culture of isolates* (a) *Mg52A.1*, (b) *Mg39.2*, and (c) *Ps8b*, 7 days after planting in isolates pure age of 1 month. The red circles, yellow exudates (gum). Yellow circle, piece rod for pathogen inoculum source)

setiap 1 minggu sekali dan pada saat pemupukan. Penyiraman dilakukan dengan menggunakan gembor setiap hari pada musim kemarau atau disesuaikan pada musim hujan. Pengendalian hama penyakit dilakukan berdasarkan pemantauan terhadap adanya hama dan penyakit. Pengendalian diupayakan tidak mengganggu proses infeksi *B. theobromae*.

Perlakuan Uji Patogenisitas

Bagian batang tanaman yang diuji ialah batang di atas sambungan. Perlakuan menggunakan potongan batang ukuran 1 cm yang telah terinfeksi *B. theobromae* (sumber inokulum) dengan cara menyisipkan ke batang yang sehat dan diikat menggunakan plastik. Bagian luar disemprot dengan akuades steril setiap tiga hari untuk menjaga kelembapan. Suhu dijaga hangat antara 30 -35°C (Khanzada et al. 2006).

Pengamatan

Pengamatan meliputi gejala serangan patogen, masa inkubasi, dan luas gejala penyakit. Pengamatan gejala berdasarkan metode yang dilakukan (Putra et al. 2013) dan (Salamiah 2009), yaitu adanya kulit batang mengelupas, berubah warna menjadi kecokelat-cokelatan, bidang pelukaan menjadi basah hingga keluarnya cairan kental kecokelatan dari sumber infeksi (*gum*). Data rerata inkubasi menunjukkan rentang waktu antara proses inokulasi sampai timbulnya gejala. Pengamatan perkembangan gejala penyakit dilakukan pada batang terinfeksi dengan interval dilakukan setiap 7 hari sekali dengan mengukur gejala penyakit secara vertikal (v) sejajar batang dan horizontal (h) ke arah melintang pada bidang batang yang menunjukkan gejala. Perkembangan gejala menggunakan penghitungan sebagai berikut:

$$P \text{ (cm}^2\text{)} = (v) \times (h)$$

P = Luas perkembangan penyakit,

v = Vertikal,

h = Panjang gejala secara horisontal

Pengamatan dilakukan sampai 49 hari setelah inokulasi (HSI).

Pengujian Toksin Kasar Tiga Isolat *B. theobromae*

Pengujian menggunakan rancangan acak lengkap dengan sembilan kombinasi perlakuan antara kontrol tanpa toksin, toksin kasar isolat Mg52A.1, toksin kasar isolat Mg39.2, dan toksin kasar isolat Ps8b pada daun asal tiga varietas jeruk. Tiap perlakuan diulang tiga kali dan masing-masing terdiri dari dua daun asal tanaman beda.

Isolasi toksin kasar dilakukan dengan mengadopsi metode yang dilakukan oleh Salamiah (2009), yaitu membiakkan patogen *B. theobromae* pada media PDB (*potato dextrose broth*). Miselium dari biakan murni diambil menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi media PDB sebanyak 50 ml kemudian diinkubasikan pada suhu kamar di atas *shaker* (kecepatan 50 rpm) selama 2 bulan. Pembuatan suspensi untuk ekstraksi toksin kasar dilakukan dengan cara mengambil konidia dari biakan murni dan menumbuhkannya pada media PDB. Biakan diinkubasi di atas *shaker* pada suhu ruang dengan kecepatan 50 rpm selama 2 bulan. Biakan *B. theobromae* hasil inkubasi kemudian difiltrasi dengan memodifikasi metode yang dilakukan Salamiah (2009) dan Yoshida *et al.* (2000) menggunakan empat lapis kain saring (*muslin cloth*) dan dua lapis *mira cloth*.

Pengujian toksin mengadopsi metode yang dilakukan oleh Salamiah (2009), dengan cara meneteskan suspensi toksin kasar pada daun tanaman yang sebelumnya telah dilukai dengan goresan vertikal dan horizontal membentuk persegi berukuran 0,5 cm sepanjang daun sebagai media pelukaan. Sampel diinkubasi dalam suhu 25°C selama 5 hari dalam cawan petri steril. Daun diberi alas kapas basah untuk menjaga kelembapan. Keberadaan kandungan toksin ditandai dengan munculnya gejala nekrosis daun.

Variabel pengamatan meliputi (1) persentase jumlah sampel daun yang mengalami nekrosis berdasarkan perlakuan isolat patogen dan (2) luas bidang nekrosis yang diukur dengan cara melakukan penandaan bagian daun yang mengalami nekrosis menggunakan plastik mika dan menempelkannya pada kertas *milimeter block*. Luas bidang nekrosis diperoleh dalam satuan cm². Pengamatan dilakukan setelah diinkubasi selama 12 hari.

Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) taraf 5% dan 1%. Apabila dari analisis menunjukkan hasil berbeda nyata, maka diuji lanjut menggunakan Uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) taraf 5%. Apabila tidak ada interaksi antara kombinasi perlakuan maka analisis dilakukan pada masing-masing faktor perlakuan secara terpisah. Analisis data menggunakan perangkat lunak DSAASTAT versi 1,01 yang dijalankan pada aplikasi *Microsoft Excel* 2010.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Studi Perkembangan Penyakit Tiga isolat *B. theobromae* pada Tiga Jenis Jeruk

Gejala penyakit berupa munculnya *blendok* dan atau eksudat berwarna kuning (*gum*) dari bidang inokulasi sehingga bidang pelukaan menjadi basah dan lengket. Gejala lain adalah munculnya celah-celah luka di sekitar bidang pelukaan dan luka menjadi membusuk serta berubah warna menjadi kecokelat-cokelatan. Semua jenis jeruk yang digunakan sebagai bahan uji menunjukkan gejala yang sama (Gambar 3). Gejala ini sama atau mirip dengan gejala awal hasil inokulasi yang dilakukan lebih dulu oleh (Retnosari *et al.* 2014) dan (Salamiah *et al.* 2008).

Hasil analisis sidik ragam hasil pengujian menunjukkan tidak ada interaksi antara isolat patogen dan varietas jeruk yang berpengaruh terhadap perkembangan penyakit diplodia. Rerata masa inkubasi isolat Mg52A.1 adalah 4 hari pada jeruk jenis pameló, 14 hari pada jeruk jenis siam, dan 3,33 hari pada jeruk jenis manis. Rerata masa inkubasi isolat Mg39.2 adalah 4 hari pada jeruk pameló, 13 hari pada jeruk siam, dan 2,67 hari pada jeruk manis. Rerata masa inkubasi isolat Ps8b adalah 5,83 hari pada jeruk pameló, 23 hari pada jeruk siam, dan 4,83 hari pada jeruk manis (Tabel 1).

Dari hasil analisis statistik menunjukkan bahwa masa inkubasi tercepat dan berbeda sangat nyata dibandingkan perlakuan lainnya. Pada kombinasi perlakuan isolat Mg39.2 dan isolat Mg 52 A.1 pada varietas jeruk manis (2,67 dan 3,33 hari) disusul dengan perlakuan isolat Mg39.2 dan Mg 52 A.1 pada jeruk pameló (4 hari) serta perlakuan Isolat Ps8b pada jeruk manis. Masa inkubasi paling lama pada kombinasi perlakuan isolat Ps8b batang jeruk jenis siam (23 hari) (Tabel 1). Penelitian menunjukkan hasil masa inkubasi patogen *B. theobromae* pada tanaman jeruk lebih cepat dibanding yang diteliti sebelumnya. Laporan Salamiah *et al.* (2008) menyebutkan bahwa masa inkubasi



Gambar 3. Gejala penyakit diplodia pada batang jeruk (a) pamelo, (b) siam, dan (c) manis, 14 HSI. Lingkaran merah eksudat berwarna kuning (*gum*) dan tanda panah kuning gejala penyakit pada batang hasil inokulasi (*Symptoms of diplodia disease on citrus stems (a) pummelo, (b) tangerine, and (c) sweet orange, 14 DAI. Red circle is yellow exudates (gum) and the yellow arrow is the disease symptoms on stem after inoculation*)

paling cepat adalah 39 hari dan paling lama 64 hari pada jeruk siam Banjar. Kemungkinan pengontrolan kelembapan pada bidang pelukaan lebih intensif diduga dapat mempercepat masa inkubasi patogen. Pada percobaan yang dilakukan Salamiah *et al.* (2008), bidang pelukaan tidak diatur kelembapannya dengan cara pembungkusan hanya dilakukan penyemprotan, sedangkan pada penelitian ini bidang pelukaan ditutup dengan plastik sehingga tetap terjaga kelembapannya sampai gejala muncul. Faktor lingkungan lain diduga juga berperan terhadap cepatnya masa inkubasi. Kondisi saat penelitian dalam masa peralihan antara musim hujan dan kemarau sehingga kondisi tersebut menguntungkan bagi patogen. Pada kondisi lembap patogen akan berkembang dan menunjukkan gejala busuk batang terbukti dalam perlakuan ini, sehari setelah hujan ditemukan banyak *blendok (gum)* pada bidang pelukaan.

Varietas jeruk manis yang diinokulasi dengan isolat Mg39.2 dan Mg52A.1 cenderung menunjukkan persentase serangan lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya. Perkembangan gejala penyakit pada bidang pelukaan menunjukkan kemampuan patogen dalam menginfeksi kulit batang tanaman jeruk. Semakin luas bidang gejala penyakit maka patogenitas isolat patogen *B. theobromae* dalam menimbulkan penyakit diplodia pada tiga jenis jeruk semakin tinggi.

Perkembangan penyakit diplodia pada batang jeruk diawali dengan proses perkembangan cendawan

dalam bidang pelukaan yang ditandai dengan adanya miselium berwarna putih kemudian berubah menjadi hitam-hitaman. Cendawan masuk ke dalam jaringan tanaman yang menyebabkan tanaman bereaksi dengan mengeluarkan *blendok* atau eksudat kental berwarna kuning kecokelat-cokelatan (*gum*). Pada beberapa tanaman yang memiliki masa inkubasi lebih cepat, miselium tidak tampak jelas dan bidang pelukaan berwarna kecokelat-cokelatan.

Masa inkubasi yang cukup cepat dan persentase penyakit tinggi dilaporkan juga pada penelitian (Verma *et al.* 2010) dan (Abdullah *et al.* 2012) bahwa gejala penyakit kanker pada pear dan anggur yang disebabkan *B. theobromae* mulai terlihat pada 3–7 hari setelah inokulasi (HSI) dengan kisaran persentase tanaman terserang antara 49,4–90,9% dengan rerata 77,5%, sedang pada penelitian ini, menunjukkan bahwa persentase serangan antara 50 – 83,3%, tidak berbeda antarperlakuan pada 49 HSI, kecuali dengan kontrol (Tabel 1).

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa infeksi jenis patogen yang berbeda pada tiga jenis varietas jeruk, tidak menyebabkan adanya perbedaan perkembangan gejala penyakit, namun berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (akuades steril) dengan luas bidang gejala 0,707 cm² (Tabel 2).

Penyakit diplodia umumnya menjadi parah pada tanaman berumur 10 tahun dengan kondisi sanitasi lahan yang rendah. Bidang pelukaan mengeluarkan

Tabel 1. Rerata masa inkubasi dan persentase serangan (49 HSI) tiga isolat *B. theobromae* pada tiga varietas jeruk di rumah kaca, Tlekung 2016 (Average of incubation period and disease percentage (49 DAI) of three isolates of *B. theobromae* on three citrus varieties, Tlekung 2016)

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Rerata masa inkubasi/hari (<i>Average of incubation period/ day</i>)	Persentase serangan penyakit pada 49 HSI (<i>Disease percentage at 49 DAI</i>), %	
Isolat Mg52A.1 pada jeruk pamele	4,00 a	4/6	66,7 b
Isolat Mg52A.1 pada jeruk siam	14,00 b	3/6	50,0 b
Isolat Mg52A.1 pada jeruk manis	3,33 a	5/6	83,3 b
Isolat Mg39.2 pada jeruk pamele	4,00 a	4/6	66,7 b
Isolat Mg39.2 pada jeruk siam	13,00 b	4/6	66,7 b
Isolat Mg39.2 pada jeruk manis	2,67 a	5/6	83,3 b
Isolat Ps8b pada jeruk pamele	5,83 a	2/6	50,0 b
Isolat Ps8b pada jeruk siam	23,00 c	3/6	50,0 b
Isolat Ps8b pada jeruk manis	4,83 a	4/6	66,7 b
Kontrol sehat pamele	0,00 a	0/6	0,0 a
Kontrol sehat siam	0,00 a	0/6	0,0 a
Kontrol sehat manis	0,00 a	0/6	0,0 a

Bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama, tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5% (*Mean follows by the same letters on the same coloums is not significantly according Duncan test 5%*)

gum terutama sehari setelah hujan ketika kelembapan tinggi. Gumosis atau aktivitas mengeluarkan eksudat kuning merupakan bentuk reaksi inang terhadap serangan patogen atau benda asing yang masuk ke dalam jaringan tanaman. (El-Morsi & Ibrahim 2012) yang mempelajari histopatologi *L. theobromae* pada kurma menyebutkan bahwa patogen merusak jaringan *xylem* dan *phloem* dan menyebabkan kerusakan total pada kondisi tanaman lemah dan lingkungan menguntungkan. Akibat serangan patogen, jaringan terinfeksi menjadi busuk berwarna coklat, menurut Ammar (2003) dalam (El-Morsi & Ibrahim 2012) yang mempelajari histopatologi kurma yang terinfeksi patogen, warna coklat kemungkinan terjadi karena enzim dan atau toksin yang diproduksi oleh cendawan.

Gambar 4 menunjukkan interpretasi data pertambahan luas gejala penyakit diplodia pada tanaman jeruk yang diinokulasi dengan tiga jenis inokulum. Jika dikaitkan dengan Tabel 2 maka terlihat bahwa pada 14 HSI, inokulum Mg39.2 menimbulkan gejala penyakit diplodia paling luas dibandingkan dengan inokulum patogen dari isolat lainnya.

Gambar 5 menunjukkan pertambahan luas gejala penyakit diplodia pada tiga jenis varietas jeruk pamele dan manis mengekspresikan luas gejala penyakit yang berbeda nyata dengan jenis siam. Gejala penyakit diplodia pada jenis pamele dan manis lebih parah dibandingkan pada jenis siam sejak 7 hingga 35 HSI.

Uji Toksin Kasar (*Crude Toxin*) *B. theobromae*

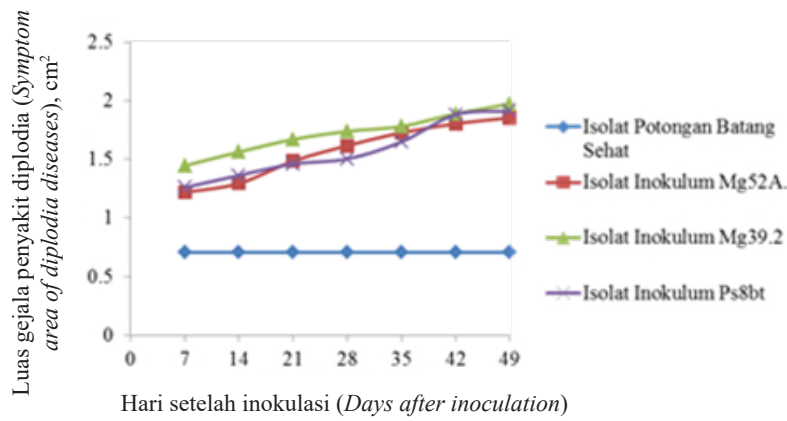
Nekrosis daun jeruk menunjukkan kondisi perubahan pigmen warna dari daun jeruk yang diakibatkan reaksi metabolit yang dikeluarkan oleh patogen *B. theobromae*. Metabolit sekunder dari patogen yang dikeluarkan sebagian berupa toksin kasar, tetapi mungkin juga berupa enzim, dan senyawa lainnya. Toksin berperan dalam melemahkan pertahanan tanaman dan memudahkan patogen untuk masuk ke dalam jaringan tanaman serta menimbulkan reaksi hipersensitif pada bagian tanaman. Nekrosis daun diukur secara kuantitatif dengan cara menghitung luas bidangnya. Nekrosis pada daun jeruk yang diakibatkan oleh patogen *B. theobromae* bersifat representatif terhadap kemampuan patogen tersebut dalam menimbulkan penyakit.

Hasil analisis ragam rerata luas bidang nekrosis daun setelah 12 hari masa inkubasi dalam cawan petri tidak menunjukkan adanya interaksi yang nyata antara jenis toksin kasar dari isolat patogen *B. theobromae* dan jenis daun dari tiga jenis jeruk (Tabel 3). Pada 12 hari setelah aplikasi toksin pada daun segar, toksin dari isolat Mg39,2 menimbulkan bidang nekrosis paling luas, yaitu 2,495 cm², tidak berbeda nyata dengan toksin dari isolat Ps8b, yaitu 2,074 cm². Keduanya berbeda nyata dengan perlakuan jenis toksin dari isolat Mg52A.1, yaitu 1,601 cm². Seluruh jenis isolat patogen berbeda nyata dengan

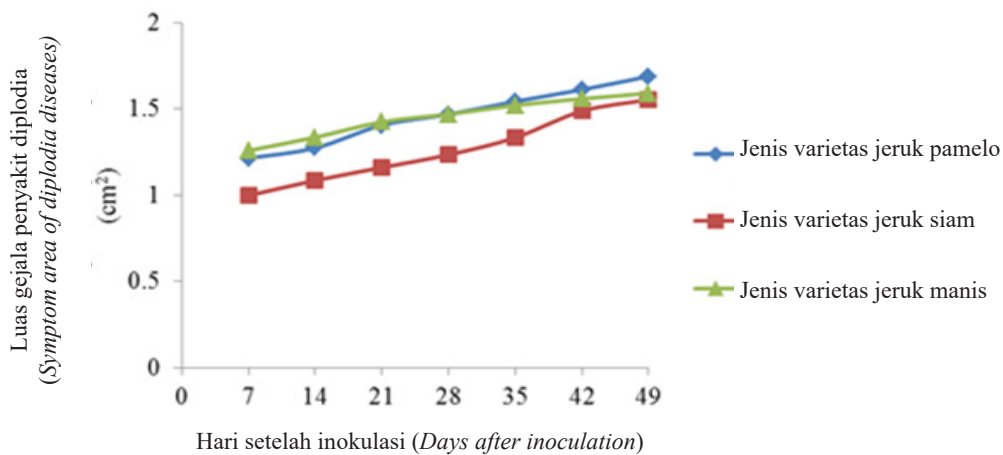
Tabel 2. Perkembangan gejala penyakit *diplodia* pada 7 – 49 HSI pada isolat yang berbeda (*Symptoms development of diplodia on 7 – 49 DAI at different isolates*)

Kombinasi perlakuan (Treatments)	Perkembangan gejala penyakit pada batang jeruk ± standar deviasi (<i>Symptoms development on citrus stem ± Standard Deviation</i>), cm ²								
	7 HSI (DAI)	14 HSI (DAI)	21 HSI (DAI)	28 HSI (DAI)	35 HSI (DAI)	42 HSI (DAI)	49 HSI (DAI)		
Mg52A.1 pada jeruk pamelo	1,216 ± 0,299 b	1,295 ± 0,265 b	1,445 ± 0,370 b	1,543 ± 0,390 b	1,635 ± 0, 408 b	1,708 ± 0, 394 b	1,771 ± 0, 424 b		
Mg52A.1 pada jeruk siam	1,108 ± 0,292 b	1,563 ± 0,232 b	1,323 ± 0,367 b	1,426 ± 0,375 b	1,525 ± 0,361 b	1,646 ± 0, 356 b	1,704 ± 0,390 b		
Mg52A.1 pada jeruk manis	1,238 ± 0,319 b	1,364 ± 0,330 b	1,455 ± 0,381 b	1,543 ± 0,401b	1,624 ± 0, 409 b	1,681 ± 0,387 b	1, 722 ± 0,414 b		
Mg39.2 pada jeruk pamelo	1,330 ± 0,309 b	1,333 ± 0,318 b	1,538 ± 0,370 b	1,604 ± 0,390 b	1,662 ± 0, 370 b	1,750 ± 0,368 b	1,830 ± 0, 362 b		
Mg39.2 pada jeruk siam	1,222 ± 0,331 b	1,324 ± 0,295 b	1,415 ± 0,367 b	1,486 ± 0,375 b	1,557 ± 0,324 b	1,688 ± 0,330 b	1,763 ± 0,327 b		
Mg39.2 pada jeruk manis	1,352 ± 0,333 b	1,349 ± 0,326 b	1,547 ± 0,381 b	1,604 ± 0,401 b	1,695 ± 0,372 b	1, 724 ± 0,361 b	1,782 ± 0351, b		
Pb8b pada jeruk pamelo	1,108 ± 0,292 b	1,317 ± 0,350 b	1,433 ± 0,417 b	1,486 ± 0,488 b	1,596 ± 0,373 b	1,711 ± 0, 353 b	1,801 ± 0,368 b		
Pb8b pada jeruk siam	1,108 ± 0,292 b	1,225 ± 0,343 b	1,311 ± 0,377 b	1,369 ± 0,402 b	1,491 ± 0,327 b	1,649 ± 0,315 b	1,733 ± 0,333 b		
Pb8b pada jeruk manis	1,259 ± 0,333 b	1,350 ± 0, 375 b	1,443 ± 0,391 b	1,487 ± 0,428 b	1,585 ± 0,375 b	1,685 ± 0, 346 b	1,752 ± 0,357 b		
Kontrol sehat jeruk pamelo	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a		
Kontrol sehat jeruk siam	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a		
Kontrol sehat jeruk manis	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a	0,707 ± 0,000 a		

Data merupakan hasil transformasi akar kuadrat; bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama serta bilangan yang tidak diikuti oleh notasi, tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%, HSI = hari setelah inokulasi (*The data is the result of a square root transformation, mean follows by the same letters on the same column is not significantly according Duncan test 5%, DAI = days after inoculation*)



Gambar 4. Pertambahan luas gejala penyakit diplodia pada batang jeruk setelah diinokulasi dengan tiga jenis isolat berbeda (*Disease symptoms increase of diplodia on citrus stem after inoculated with three different types of isolates*)



Gambar 5. Pertambahan luas gejala penyakit diplodia pada tiga jenis jeruk (*Disease symptoms increase of diplodia on three citrus varieties*)

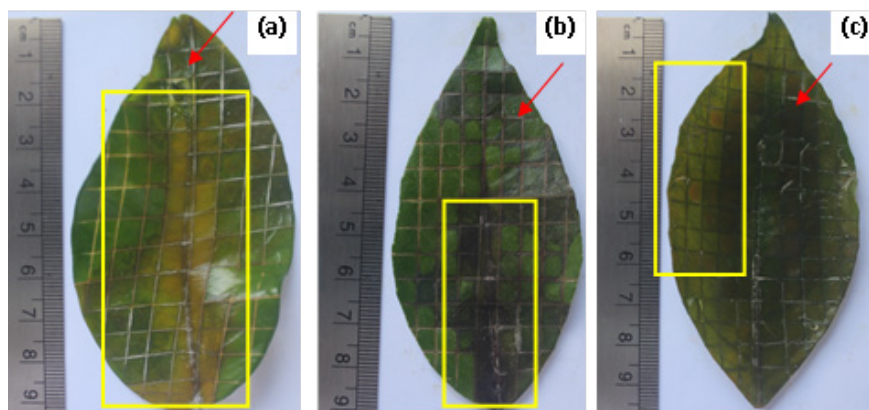
Tabel 3. Luas bidang nekrosis oleh toksin kasar isolat patogen pada 12 HSI (*Size of necrosis caused by crude toxin isolates of pathogen at 12 DAI*)

Jenis toksin kasar (Crude toxin type)	Luas bidang nekrosis (Necrosis size), cm ²
T0 (Kontrol)	0,819 a
T1 (Mg52A.1)	1,601 ab
T2 (Mg39.2)	2,495 b
T3 (Ps8b)	2,074 b
Jenis daun jeruk (Kind of citrus leaf)	Luas bidang nekrosis (Necrosis size), cm ²
P (Pamelo)	1,677
S (Siam)	1,979
M (Manis)	1,586
DMRT 5%	tn (ns)

Keterangan : Data merupakan hasil transformasi akar kuadrat; bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama, tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%; tn = tidak nyata (*The data is the result of a square root transformation, Mean follows by the same letters on the same columns is not significantly according Duncan test 5%, ns = not significant*)

kontrol yang memiliki luas bidang nekrosis 0,819 cm². Keberadaan toksin menyebabkan jaringan pada daun menjadi rusak dan mati sehingga berubah warna menjadi kekuning-kuningan, maupun berubah warna menjadi coklat kehitam-hitaman (Gambar 6). Jaringan tersebut terus meluas merusak jaringan di sekitarnya dan menghambat metabolisme daun tanaman. Hasil penelitian (Parthasarathy *et al.* 2016) juga menghasilkan nekrotik pada daun dan buah mangga yang diaplikasi dengan suspensi toksin dari *L. theobromae* sinonim *B. theobromae*.

Pengaruh pemberian toksin kasar pada tiga varietas jeruk berbeda menunjukkan reaksi yang berbeda juga. Toksin kasar isolat Mg52A.1,3 tidak menimbulkan nekrosis pada pamelo, namun menimbulkan nekrosis pada siam dan manis, masing masing sebesar 66,67% dan 100%. Toksin kasar isolat Mg39.2 menimbulkan nekrosis 100% pada ke tiga varietas yang diuji, sedangkan toksin kasar isolat Ps8b, menyebabkan nekrosis pada pamelo, dan siam, masing-masing sebesar 33,33% serta pada manis sebesar 66,67%.



Gambar 6. Nekrosis pada daun jeruk (a) pamelu, (b) manis, dan (c) siam. Panah merah : pelukaan pada daun, kotak kuning : bagian daun nekrosis (*Necrosis on leaves of citrus (a) pummelo (b) sweet orange, (c) tangerine. Red arrows: wounding the leaves, the yellow box: leaf necrosis*)

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa perlakuan dengan tiga isolat *Botryodiplodia theobromae* asal Magetan (Mg52.1 dan Mg39.2) serta Pasuruan (Ps8b) memiliki patogensitas yang sama dalam perkembangan penyakit diplodia pada varietas jeruk siam manis dan pamelu. Peran toksin isolat diplodia Mg39.2 dan Ps8b meningkatkan timbulnya nekrosis pada daun tanaman jeruk di laboratorium. Pembungkusan bidang pelukaan menggunakan plastik dan menjaga kelembapan pada bagian yang terinfeksi dengan penyiraman 3 hari sekali dapat dijadikan sebagai metode baru dalam mempersingkat masa inkubasi dari patogen *B. theobromae*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian kerjasama yang didanai Hibah KKP3N 2015, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, untuk itu diucapkan terima kasih. Terima kasih juga disampaikan kepada Unun Triasih, S.P. dan Dina Agustina, Si. yang telah membantu secara teknis dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abdullah H. Al-Saadoon, MKMA & EMAA-R 2012, 'Histopathology of grapevine inoculated with *Lasioidiplodia theobromae*', *Basrah J. Agric. Sci.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–12, accessed from <https://www.researchgate.net/profile/Mohanad_Khalaf/publication/235942310_Histopathology_of_grapevine_inoculated_with_Lasioidiplodia_theobromae/links/00b7d5148e01bbcd02000000.pdf>.
2. Aboul-Nasr, MB & Abdul, A 2014, 'A simple technique for single spore isolation of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium subglutinans*', *World J. Biol. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 021–025, accessed from <<http://wsrjournals.org/Journal/Wjbsbs>>.
3. Agbeniyi, SO & Ayodele, MS 2013, 'Efficacy of plant leaf extracts on the mycelial growth of kolanuts storage pathogens, *Lasioidiplodia theobromae* and *Fusarium pallidoroseum*', *Afri. J. of Agric. Res.*, vol. 8, no. 22, pp. 2730–2732, accessed from <<http://www.academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/040E03135286>>.
4. Chen, S, Li, G, Liu, Q, Li, J & Liu, F 2016, 'Characteristics of *Lasioidiplodia theobromae* from *Rosa rugosa* in South China', *Crop Protection*, vol. 79, pp. 51–55.
5. Dwiastuti, ME, Agustina, D & Triasih, U 2016, 'Keanekaragaman hayati penyakit busuk batang jeruk (*Botryodiplodia theobromae* Pat.) Di Jawa Timur', *Prosiding Seminar Nasional II Tahun 2016, Kerjasama Prodi Pendidikan Biologi FKIP dengan Pusat Studi Lingkungan dan Kependudukan (PSLK)*, Universitas Muhammadiyah Malang, Jawa Timur, pp. 94–109.
6. El-Morsi, MEA & Ibrahim, IA 2012, 'Morphological, molecular and histopathological variation in different isolates of *Botryodiplodia theobromae*, the causative of leaf base rot disease of date palms in New Valley Governorate, Egypt', *Woodpecker J. of Agric. Res.*, vol. 1, no. 6, pp. 215–222, accessed from <<http://www.wudpeckerresearchjournals.org>>.
7. Gusnawaty & Mariadi 2013, 'Pengendalian penyakit Diplodia (*Botryodiplodia theobromae* Pat.) pada tanaman jeruk dengan pestisida nabati (Phymar C) di Sulawesi Tenggara', *Agriplus*, vol. 23, no. 2, pp. 98–102, accessed from <<http://docplayer.info/42668215-Pengendalian-penyakit-diplodia-botryodiplodia-theobromae-pat-pada-tanaman-jeruk-dengan-pestisida-nabati-phymar-c-di-sulawesi-tenggara.html>>.
8. Khalil, O 2010, '*Lasioidiplodia theobromae* associated with Gummosis in *Eucalyptus* spp. in the Sudan',.
9. Khanzada, MA, Lodhi, AM & Shahzad, S 2004, 'Pathogenicity of *Lasioidiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango', *Paki. J. of Bot.*, vol. 36, no. 1, pp. 181–190.

10. Khanzada, MA, Qayoom, A, And, R & Shahzad, S 2006, 'Effect of medium, teemperature, light and inorganic fertilizers on in vitro growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* isolated from mango', *Pak. J. Bot.*, vol. 38, no. 3, pp. 885–889, accessed from <[http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/38\(3\)/PJB38\(3\)885.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/38(3)/PJB38(3)885.pdf)>.
11. Latha, P, Prakasam, V, Jonathan, EI, Samiyappan, R & Natarajan, C 2013, 'Effect of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Lasiodiplodia theobromae* in physic nut (*Jatropha curcas*).', http://www.jeb.co.in/journal_issues/201307_jul13/paper_04.pdf, no. July, accessed from <<http://imsear.li.mahidol.ac.th/handle/123456789/148582>>.
12. Parthasarathy, S, Thiribhuvanamala, G, Faisal, PM & Prabakar, K 2016, 'Partial characterization of toxins associated with stem end rot of mango caused by *Lasiodiplodia theobromae*', *J. of App. and Nat. Sci.*, vol. 8, no. 2, pp. 559–564.
13. Pascapanen, DB 2010, *Profil Komoditas Jeruk, Direktorat Budidaya dan Pasca Panen Buah*, Direktorat Budidaya dan Pascapanen Buah, Direktorat Jenderal Hortikultura, Kementerian Pertanian.
14. Pedraza, JMT, Aguilera, JAM, Diaz, CN, Ortiz, DT, Monter, AV & Mir, SGL 2013, 'Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore and Steam] grafts in Mexico', *Mexico: Rev. Fitotec. Mex.*, vol. 36, no. 1, pp. 233-8.
15. Putra, D, Sulistyowati, L, Cholil, A & Martasari, C 2013, 'Evaluasi ketahanan tanaman jeruk (*Citrus* sp.) Hasil fusi protoplas jeruk satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) dan Jeruk siam madu (*Citrus nobilis*) terhadap infeksi penyakit kulit diplodia (*Botryodiplodia theobromae* Pat.)', *J. Hama dan Penyakit Tumbuhan*, vol. 1, no. 1, pp.16-26.
16. Retnosari, E, Henuk, J, Sinaga, M & Sinaga, MS 2014, 'Identifikasi penyebab penyakit busuk pangkal batang pada jeruk', *J. Fitopat. Indonesia*, vol. 10, no. 3, pp. 93–97, accessed from <<http://journal.ipb.ac.id/index.php/jfiti/article/view/8581>>.
17. Saeed, S, Khan, MI & Masood, A 2011, 'Symptom development after artificial inoculation of *Botryodiplodia theobromae*, a possible causal organism to quick decline in mango trees', *Pak. J. Agri. Sci.*, vol. 48, no. 4, pp. 289–294.
18. Salamiah 2009, 'Jurnal hama dan penyakit tumbuhan tropika.', *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, vol. 9, no. 2, pp. 158–167, accessed from <<https://www.neliti.com/publications/80342/peranan-toksin-yang-dihasilkan-oleh-botryodiplodia-theobromae-dalam-menimbulkan>>.
19. Salamiah, Badruzsaufari, dan MA 2008, 'Jurnal hama dan penyakit tumbuhan tropika.', *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, vol. 8, no. 2, pp. 123–131, accessed from <<https://www.neliti.com/publications/80197/jenistanaman-inang-dan-masa-inkubasi-patogen-botryodiplodia-theobromae-pat-peny>>.
20. Semangun, H 2000, *Penyakit-penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*, Gadjah Mada University Press.
21. Twumasi, P, Ohene-Mensa, G & Moses, E 2014, 'The rot fungus *Botryodiplodia theobromae* strains cross infect cocoa, mango, banana and yam with significant tissue damage and economic losses', *Afri. J. of Agric. Res.*, vol. 9, no. 6, pp. 613–619.
22. Úrbez-Torres, JR, Leavitt, GM, Guerrero, JC, Guevara, J & Gubler, WD 2008, 'Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot cancer disease of grapevines in Mexico', *Plant Disease*, vol. 92, no. 4, pp. 519–529.
23. Verma, K, Singh, K & Kaur, R 2010, 'Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae) isolates associated with dieback and bark cancer of pear trees in Punjab, India', *funpeccr.com.br Genetics and Molecular Research Mol. Res.*, vol. 9, no. 92, pp. 1217–1228, accessed from <<https://pdfs.semanticscholar.org/9e14/c4772c5d5ea0458dbbf53d9127317b75a150.pdf>>.
24. Wiyono, S 2011, *Pembunuh Jeruk Bernama Blendok*. Trubus Filed in B., Trubus.
25. Yoshida, S, Hiradate, S, Fujii, Y & Shirata, A 2000, '*Colletotrichum dematium* produces phytotoxins in anthracnose lesions of mulberry leaves', *Phytopath.*, vol. 90, no. 3, pp. 285–291, accessed from <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944621>>.
26. Zhang, K, Yuan-Ying, S & Cai, L 2013, 'An optimized protocol of single spore isolation for fungi', *Cryptogamie, Mycologie*, vol. 34, no. 4, pp. 349–356, accessed from <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.7872/crym.v34.iss4.2013.349>>.