

Cara Preservasi Fitoplasma dari Jaringan Kacang Tanah Bergejala Sapu untuk Deteksi DNA dengan Teknik PCR

Phytoplasma Preservation Methods of Symptomatic Peanut Witches' broom for DNA Detection Using PCR Technique

Siska Irhamnawati Pulogu, Kikin Hamzah Mutaqin*, Giyanto
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Penyakit sapu (*witches' broom*) oleh fitoplasma pada kacang tanah adalah penyakit umum di Indonesia. Fitoplasma dapat dideteksi dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Salah satu faktor penentu keberhasilan deteksi fitoplasma ialah penyediaan DNA dari contoh segar. Penelitian bertujuan mengevaluasi beberapa cara preservasi sampel tanaman terinfeksi fitoplasma. Aspek yang dievaluasi meliputi waktu (1, 2, 3, dan 4 minggu), suhu (-20 °C, 4 °C, dan 25 °C), dan medium preservasi (bufer PGB 1X, NaCl 3 M, bufer CTAB, Alkohol 70%, tanpa medium, dan kertas FTA) untuk mempertahankan jaringan tanaman terinfeksi supaya tetap segar. Cara preservasi yang baik akan mengoptimalkan deteksi DNA fitoplasma dengan teknik PCR standar yang dilanjutkan dengan teknik *nested-PCR*. Penyimpanan pada suhu -20 °C, 4 °C dan 25 °C dalam medium CTAB dapat mempertahankan jaringan tetap segar selama 4 minggu dengan kualitas dan kuantitas DNA yang cukup untuk deteksi dengan teknik PCR. Teknik PCR standar dengan pasangan primer P1/P7 menunjukkan bahwa tidak semua DNA fitoplasma dari hasil preservasi contoh terdeteksi positif. Namun, PCR standar yang dilanjutkan dengan *nested-PCR* menggunakan primer fU5/rU5 mampu meningkatkan pendeteksian fitoplasma yang berasal dari preservasi contoh pada berbagai medium selama 4 minggu dengan memberikan hasil positif dari contoh yang terdeteksi negatif pada teknik PCR standar.

Kata kunci: *nested-PCR*, PCR standar, penyimpanan, sapu kacang tanah

ABSTRACT

Witches' broom of peanut caused by phytoplasma is a common disease found in Indonesia. Phytoplasma is able to be detected using polymerase chain reaction (PCR) technique. One of important factor which determine the successful of phytoplasma amplification is the DNA availability from fresh tissues. The research was aimed to evaluate some preservation methods of phytoplasma from infected plant samples. The aspects to be evaluated consisted of time (1, 2, 3, and 4 weeks), temperature (-20 °C, 4 °C, and 25 °C), and preservation medium (1X PGB buffer, 3 M NaCl, CTAB buffer, 70% ethanol, non medium, and FTA-card) for storing the fresh phytoplasma infected samples. Good preservation method will optimize the phytoplasma DNA amplification using PCR standard technique followed by nested-PCR. The results showed that preservation of samples at -20 °C, 4 °C, and 25 °C in CTAB buffer was able to maintain the tissue freshness for 4 weeks and was able to provide the DNA of either quality or quantity sufficiently for PCR detection. PCR standard using a primer pair P1/P7 showed that not all of the preserved DNA of phytoplasma were amplified positively. However, standard PCR followed by nested-PCR using primer pair fU5/rU3 was able to increase the DNA detectability. Preserved samples

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jalan Kamper, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680
Tel: 0251-7533525, Faks : 0251-8629364, Surel: kmutaqin@gmail.com

derived from various medium and stored for 4 weeks gave positive results. This results were in contrary with previous same samples which were detected negatively by standard PCR technique.

Keywords: nested-PCR, preservation, peanut witches' broom, standard PCR

PENDAHULUAN

Di Indonesia fitoplasma telah menginfeksi beberapa tanaman penting seperti kacang tanah yang dapat menurunkan bobot polong sebesar 41-100% (Nugroho *et al.* 2000). Selain itu, fitoplasma terdeteksi menyebabkan penyakit daun putih rumput bermuda, penyakit kuning bambu, penyakit daun kecil ubi jalar, dan penyakit sapu/proliferasi mosaik kaktus (Mutaqin *et al.* 2003).

Polymerase Chain Reaction (PCR) ialah teknik molekuler yang umum digunakan dalam deteksi dan identifikasi fitoplasma. Penyediaan contoh tanaman yang tetap segar sangat penting untuk isolasi DNA total. Faktor jarak jauh atau waktu yang lama dalam pengiriman contoh segar menjadi kendala dalam isolasi DNA karena deteriorasi jaringan dapat terjadi secara cepat dan munculnya senyawa inhibitor yang dapat memengaruhi kualitas dan kuantitas DNA dalam syarat teknik PCR (Nejat dan Vadamalai 2013). Titer fitoplasma dalam jaringan sangat rendah sehingga DNA yang diisolasi seringkali belum cukup dalam PCR standar untuk menghasilkan ampikon yang terlihat jelas. Oleh karena itu, modifikasi PCR untuk meningkatkan kemampuan deteksinya dengan PCR bersarang (*nested-PCR*) menggunakan pasangan primer untuk reamplifikasi DNA sasaran secara internal dalam wilayah sasaran PCR standar diperlukan (Gundersen dan Lee 1996). Penelitian bertujuan mengevaluasi cara preservasi jaringan tanaman bergejala sapu sehingga tetap diperoleh DNA yang layak dalam deteksi fitoplasma dengan PCR standar yang dilanjutkan dengan *nested-PCR*.

BAHAN DAN METODE

Penyediaan dan Preservasi Tanaman Sakit

Tanaman kacang tanah bergejala penyakit sapu diperoleh di Desa Cikarawang, Kecamatan Dramaga, Kabupaten Bogor. Tanaman tersebut

diuji dengan PCR untuk memastikan terinfeksi oleh fitoplasma. Sebanyak 1 g contoh tanaman sakit berupa potongan batang muda, tangkai, dan tulang daun tanpa nekrosis disimpan dalam botol. Preservasi dilakukan dalam tiga aspek, yaitu lama penyimpanan (1, 2, 3, 4 minggu), suhu penyimpanan (-20, 4, dan 25 °C), dan medium penyimpanan (bufer PGB1X [47.4 mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 15 mM KH_2PO_4 ; Sukrosa 5%; *Polyvinylpyrrolidone*-10 1%], NaCl 3 M, bufer CTAB [CTAB 2%; 1.4 M NaCl; 100 mM Tris; 20 mM EDTA; *Polyvinylpyrrolidone*-40 1%], Alkohol 70%, tanpa medium, dan kertas *Flinders Technology Associates* (FTA) sebagai pembanding. Preservasi dengan FTA-card (Whatman) dilakukan melalui *blotting* jaringan contoh sebanyak 0.1 g pada permukaan FTA-card, diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang dan selanjutnya disimpan pada suhu -20 °C, 4 °C, dan 25 °C.

Isolasi DNA dari Jaringan Tanaman Sakit dan Pengukuran DNA

Isolasi DNA secara total dari jaringan tanaman sakit dilakukan dengan metode Dellaporta *et al.* (1983). DNA total hasil ekstraksi maupun preservasi pada FTA-card diukur pada absorbansi 260/280 menggunakan spektrofotometer Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) di IPB Culture Collection, Departemen Biologi.

Amplifikasi DNA dengan PCR dan *Nested-PCR*

Deteksi fitoplasma dengan PCR standar menggunakan pasangan primer P1/P7. Ampikon DNA hasil PCR standar (pengenceran 1:29) selanjutnya digunakan sebagai DNA templat dalam *nested-PCR* menggunakan pasangan primer fU5 (5'-CGG CAA TGG AGG AAA CT-3')/rU3 (5'-TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA-3') (Lorenz *et al.* 1995). Reaksi PCR pada volume total

25 μL terdiri atas *DreamTaq Green PCR master mix* 2X (Thermo Scientific) 12.5 μL , primer *forward* dan *reverse* 1 μL (5 pmol), ddH₂O 9.5 μL , dan DNA templat 1 μL (1–2000 ng μL^{-1}). Aplikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan mesin *GeneAmp PCR System 9700* dengan kondisi denaturasi awal 92 °C, 1 menit; denaturasi 94 °C, 1 menit; aneling 55 °C, 1 menit; ekstensi 72 °C, 1.5 menit; ekstensi akhir 72 °C, 10 menit. PCR dilakukan sebanyak 35 siklus. *Nested-PCR* menggunakan primer fU5/rU5 dan kondisinya hanya berbeda pada suhu aneling primer, yakni 57 °C (Duduk *et al.* 2013). DNA hasil amplifikasi PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% yang mengandung EtBr pada tegangan 75 Volt DC selama 30 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi pada transilluminator UV untuk mengamati dan mendokumentasi pita DNA.

HASIL

Deteksi Awal Penyakit Sapu pada Tanaman Kacang Tanah

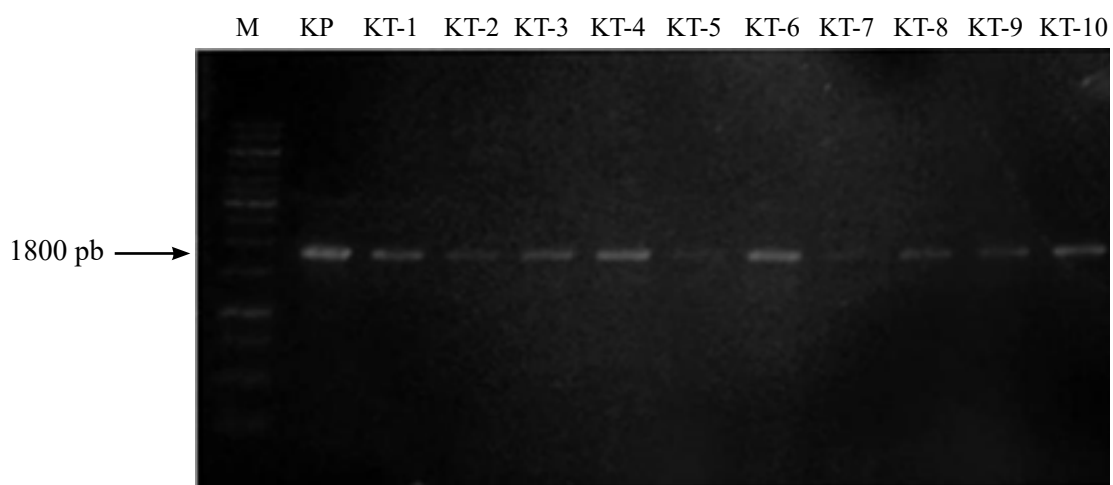
Tanaman kacang tanah yang terinfeksi fitoplasma umumnya akan menunjukkan gejala setelah berumur di atas 45 hari berupa daun kecil pada batang utama dan cabang. Pada batang utama terjadi pembentukan tunas samping yang terdiri atas daun kecil yang sangat banyak. Tanaman yang menunjukkan gejala tersebut selanjutnya dideteksi dengan

teknik PCR standar. Hasil amplifikasi DNA dengan teknik PCR standar menunjukkan tanaman positif terinfeksi fitoplasma dengan terbentuknya pita DNA berukuran ± 1800 pb (Gambar 1).

Tanaman Kacang Tanah Terinfeksi Fitoplasma pada Berbagai Kondisi Preservasi

Preservasi contoh tanaman terinfeksi pada suhu -20 °C dalam berbagai medium selama 4 minggu secara keseluruhan tidak mengalami perubahan warna. Pada suhu 4 °C tanaman mengalami perubahan warna untuk beberapa contoh seperti perubahan warna dari warna hijau muda menjadi hijau kecokelatan, coklat muda, dan coklat tua pada medium NaCl, alkohol, dan tanpa medium. Preservasi tanaman contoh pada suhu ruang (25 °C) dalam berbagai medium menunjukkan sebagian besar contoh mengalami perubahan warna hingga mengalami kerusakan/deteriorasi, kecuali pada medium CTAB. Contoh yang disimpan dalam medium CTAB selama 4 minggu tidak mengalami perubahan bentuk dan warna. Adapun preservasi DNA tanaman contoh dalam kertas FTA pada semua suhu mengalami kerusakan sejak minggu ke-1 (Tabel 1).

Konsentrasi dan kemurnian DNA total dari hasil preservasi contoh tanaman pada berbagai kondisi menunjukkan nilai yang beragam. Konsentrasi DNA berkisar 3–1303 ng μL^{-1}



Gambar 2 Visualisasi fragmen DNA fitoplasma menggunakan primer P1/P7 hasil deteksi awal penyakit sapu tanaman kacang tanah. M, Penanda 1 Kb; KP, kontrol positif; KT–1 s/d KT–10, tanaman kacang tanah terinfeksi fitoplasma.

Tabel 1 Tingkat deteriorasi contoh terinfeksi fitoplasma pada berbagai perlakuan preservasi

Perlakuan		Perubahan contoh pada berbagai kondisi							
		1 minggu		2 minggu		3 minggu		4 minggu	
Suhu	Medium	Bentuk	Warna	Bentuk	Warna	Bentuk	Warna	Bentuk	Warna
-20 °C	PGB	N	H	N	H	N	H	N	H
	NaCl	N	H	N	H	N	H	N	H
	CTAB	N	H	N	H	N	H	N	H
	Alkohol	N	HC	N	HC	N	HC	N	HC
	N.medium	N	H	N	H	N	H	N	H
	FTA	R	HC	R	HC	R	HC	R	HC
4 °C	PGB	N	H	N	H	N	H	N	H
	NaCl	N	H	N	HC	N	HC	N	HC
	CTAB	N	H	N	H	N	H	N	H
	Alkohol	N	CM	N	CM	N	CM	N	CM
	N.medium	N	H	N	HC	N	HC	N	CT
	FTA	R	HC	R	HC	R	HC	R	HC
25 °C	PGB	R	CM	R	CM	R	CM	R	CM
	NaCl	N	HC	N	C	N	C	N	C
	CTAB	N	H	N	H	N	H	N	H
	Alkohol	N	CM	N	CM	N	CM	N	CM
	N.medium	N	CM	N	CT	N	CT	N	CT
	FTA	R	HC	R	HC	R	HC	R	HC

N, normal; R, rusak; H, hijau; HC, hijau kecokelatan; CM, Cokelat muda; C, Cokelat ; CT, Cokelat tua.

dari berbagai kondisi preservasi contoh. Nilai kemurnian DNA yang diperoleh berkisar antara 0.5 dan 2.4 (Tabel 2).

Pendeteksian Fitoplasma dari Preservasi Jaringan

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR standar menggunakan sepasang primer P1/P7 menunjukkan ampikon yang positif fitoplasma bervariasi pada masing-masing contoh tanaman (Tabel 3). Contoh tanaman yang dipreservasi dalam bufer PGB dan CTAB konsisten menghasilkan ampikon DNA positif fitoplasma pada suhu 4 °C selama 3 minggu dan suhu -20 °C hingga minggu ke-4. Pada suhu 25 °C, DNA positif fitoplasma teramplifikasi dari contoh yang dipreservasi hanya terdapat pada medium CTAB selama 4 minggu.

Amplifikasi DNA dengan teknik *nested*-PCR menggunakan sepasang primer fU5/rU3 mengamplifikasi fragmen DNA fitoplasma berukuran ± 890 pb. Semua DNA fitoplasma yang awalnya terdeteksi negatif dari contoh tanaman yang dipreservasi pada berbagai

kondisi berbeda-beda selama minggu 1 dan 4 menunjukkan semuanya berhasil teramplifikasi dengan teknik *nested*-PCR tersebut (Gambar 2).

PEMBAHASAN

Infeksi fitoplasma pada tanaman dapat menyebabkan gangguan keseimbangan hormon seperti peningkatan sepuluh kali lipat *indole-3acetic acid* (IAA). Selanjutnya fitoplasma mempengaruhi fungsi jaringan floem dalam mengangkut hasil fotosintesis. Hasil fotosintesis menumpuk pada kloroplas dan terjadi peningkatan konsentrasi gula pada daun sehingga menyebabkan gangguan fisiologi pada tanaman yang ditandai dengan gejala-gejala khas. Gejala khas pada tanaman yang terinfeksi fitoplasma meliputi proliferasi tunas kecil pada ketiak cabang, *phylloidy* (pembentukan daun dari struktur bunga), kerdil, dan pemanjangan ruas batang yang abnormal (Bertaccini *et al.* 2014).

Preservasi jaringan tanaman kacang tanah bergejala penyakit sapu pada berbagai kondisi

Tabel 2 Konsentrasi (ng μL^{-1}) dan kemurnian DNA total dari berbagai kondisi preservasi contoh

Perlakuan		Konsentrasi DNA total				Kemurnian DNA*			
Suhu	Medium	1	2	3	4	1	2	3	4
-20 °C	PGB	81.0	36.0	120.0	147.0	2.1	2.1	1.7	1.7
	NaCl	57.0	44.0	127.0	162.0	2.1	2.0	1.8	1.8
	CTAB	40.0	73.0	171.0	108.0	2.1	2.1	1.8	1.6
	Alkohol	65.0	56.0	198.0	185.0	2.1	2.1	1.7	1.8
	Nonmedium	130.0	83.0	147.0	196.0	2.1	2.0	1.8	1.8
	FTA	786.0	1143.0	1303.0	1033.0	1.0	0.7	0.8	0.8
4 °C	PGB	10.0	31.0	67.0	101.0	2.1	2.0	2.0	1.9
	NaCl	34.0	23.0	122.0	121.0	2.1	1.9	1.6	1.6
	CTAB	47.0	61.0	201.0	235.0	2.1	2.1	1.9	1.9
	Alkohol	45.0	23.0	146.0	123.0	2.1	2.0	1.8	1.7
	Nonmedium	53.0	76.0	223.0	195.0	2.1	2.1	1.8	1.8
	FTA	383.0	776.0	756.0	1105.0	0.7	0.6	0.5	0.7
25 °C	PGB	48.0	33.0	147.0	146.0	2.1	2.1	1.7	1.7
	NaCl	8.8	7.0	3.9	102.0	2.0	2.1	2.4	1.6
	CTAB	43.0	111.0	3.0	16.0	2.1	2.1	2.3	2.1
	Alkohol	47.0	22.0	30.	130.0	2.0	2.1	2.0	1.7
	Nonmedium	4.7	82.0	218.0	202.0	2.2	1.8	1.8	1.8
	FTA	780.0	615.0	1270.0	1285.0	0.7	0.6	0.6	0.6

1, 2, 3, dan 4 ialah minggu penyimpanan

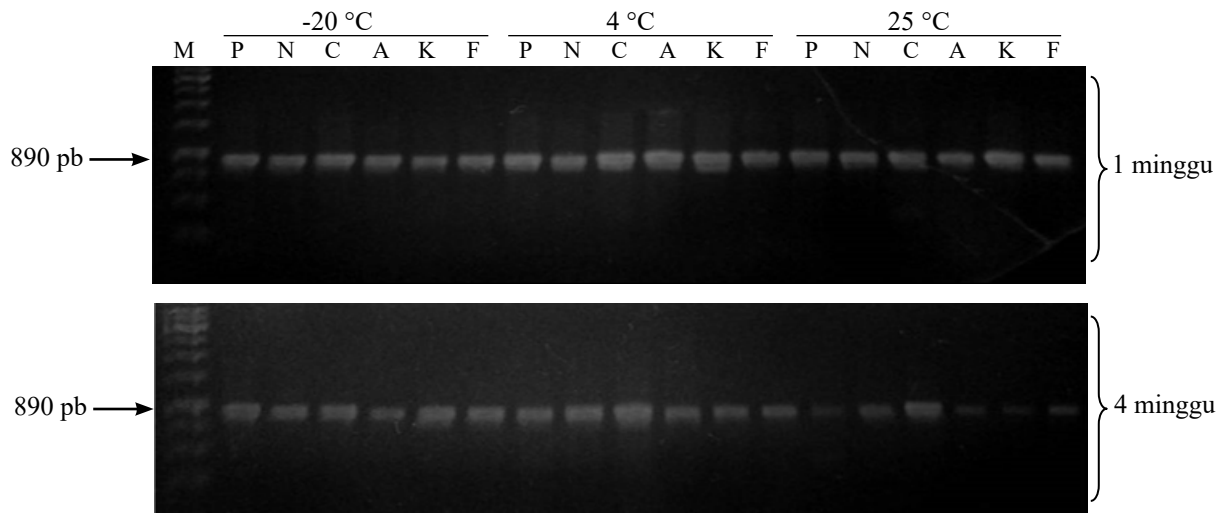
* < 1.8, kontaminasi protein; 1.8–2.0, DNA Murni; >2.0, kontaminasi RNA

Tabel 3 Hasil PCR standar dengan primer P1/P7 menggunakan DNA fitoplasma dari berbagai kondisi preservasi contoh pada beberapa waktu penyimpanan

Perlakuan		1 Minggu			2 Minggu			3 Minggu			4 Minggu		
Suhu	Medium	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
-20 °C	PGB	+	+	++	++	+	+	+	-	±	-	-	+
	NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CTAB	+	+	++	++	+	-	++	+	-	-	-	+
	Alkohol	+	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-
	Nonmedium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 °C	PGB	++	±	++	++	±	++	-	-	+	-	-	-
	NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CTAB	+	+	++	++	+	++	+	-	+	-	-	-
	Alkohol	±	±	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-
	Nonmedium	++	++	++	++	±	-	-	-	-	-	-	-
	FTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25 °C	PGB	++	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NaCl	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CTAB	+	-	+	±	±	-	-	-	+	±	-	-
	Alkohol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Nonmedium	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-, pita DNA fitoplasma negatif; ±, pita DNA samar (sangat tipis); +, pita DNA fitoplasma positif; ++, pita DNA fitoplasma positif dan tebal.

1, 2, dan 3 ialah ulangan perlakuan.



Gambar 2 Visualisasi fragmen DNA fitoplasma hasil *nested*-PCR menggunakan primer P1/P7 dilanjutkan dengan primer fU5/rU3 dari penyimpanan tanaman kacang tanah bergejala sapu. M, Penanda DNA 1 Kb; P, PGB; N, NaCl; C, CTAB; A, Alkohol; K, Non Media; F, FTA.

waktu dipengaruhi oleh suhu dan medium. Namun tidak semua kombinasi suhu dan medium mampu mempertahankan keawetan jaringan tanaman. Hanya beberapa medium tertentu seperti medium PGB pada suhu rendah dan medium CTAB pada suhu yang tinggi dapat menjaga keawetan jaringan tanaman. Suhu diduga merupakan faktor utama yang dapat memengaruhi perubahan jaringan tanaman. Hal ini dibuktikan dengan semakin tinggi suhu maka semakin cepat proses kerusakan jaringan tanaman yang disimpan. Begitupun sebaliknya, semakin rendah suhu maka semakin lama proses terjadinya kerusakan sehingga contoh masih terlihat segar selama waktu tertentu. Suhu yang sangat rendah dapat secara efektif menghentikan pertumbuhan dan perkembangan biologi dalam sel sehingga keutuhan sel-sel terjaga dalam jangka panjang (Zeliang dan Pattanayak 2012). Suhu yang rendah menimbulkan sel-sel dalam jaringan membeku sehingga proses metabolisme semua sel hidup terhenti. Jaringan daun terinfeksi fitoplasma yang disimpan selama 32 hari pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ masih dalam keadaan segar. Adapun penyimpanan contoh pada suhu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dalam waktu lama dapat mengakibatkan perubahan jaringan tanaman dan meningkatkan infeksi berbagai patogen sehingga sulit digunakan untuk deteksi DNA fitoplasma (Wongwarat *et al.* 2011).

Medium penyimpanan bufer PGB pada suhu rendah ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) dan bufer CTAB pada suhu standar ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) cukup efektif mempertahankan keawetan contoh selama proses penyimpanan. Bufer PGB yang mengandung senyawa *polyvinylpyrrolidone* (PVP), asam askorbat (AA), dan *bovine serum albumin* (BSA) serta sukrosa diduga dapat mencegah munculnya senyawa-senyawa kontaminan perusak sel dalam jaringan tanaman dan menstabilkan DNA. Adapun bufer CTAB mengandung senyawa-senyawa yang dapat mencegah munculnya senyawa kontaminan perusak DNA. Menurut Hodkinson *et al* (2007) penyimpanan contoh menggunakan bufer CTAB dapat mencegah terjadinya antioksidan dengan merusak enzim yang menghasilkan senyawa kontaminan dalam jaringan sehingga kehomogenan jaringan tanaman terjaga dan tidak mengalami kerusakan.

Perbedaan konsentrasi DNA dipengaruhi adanya sisa larutan-larutan hasil penyimpanan contoh yang ikut terbawa DNA dalam proses ekstraksi. Kemurnian yang sesuai nisbah menandakan bahwa hasil DNA cukup murni dengan kontaminan protein maupun RNA yang minimum. Nilai kemurnian DNA >2.0 diduga terkontaminasi RNA yang tidak terpecah dalam proses ekstraksi sehingga mengganggu tingkat kemurnian DNA. DNA yang murni

dengan jumlah yang relatif cukup banyak dapat digunakan untuk proses amplifikasi DNA hingga beberapa kali.

Contoh yang dipreservasi dalam bufer PGB pada suhu rendah (-20 °C dan 4 °C) dan bufer CTAB pada suhu standar (25 °C) lebih baik untuk menjaga keutuhan DNA fitoplasma dalam jaringan tanaman. PGB mengandung senyawa PVP yang dapat mengurangi kandungan fenol pada jaringan tanaman. Bufer CTAB yang mengandung senyawa PVP, *mercaptoethanol*, dan NaCl yang dapat menghambat senyawa kontaminan seperti fenolik, enzim DNase, dan polisakarida. Oleh karena itu, ketika proses preservasi dan ekstraksi, DNA fitoplasma terlindungi oleh senyawa-senyawa dalam bufer PGB dan CTAB hingga proses amplifikasi menghasilkan pita DNA positif dan tebal pada gel agarosa.

Adanya pita DNA fitoplasma yang tidak terlihat bukan berarti selalu negatif, tetapi dapat diduga karena konsentrasi DNA rendah ataupun konsentrasi yang terlalu tinggi dan adanya inhibitor yang terbawa bersama DNA templat sehingga mengganggu reaksi amplifikasi dengan PCR standar. Inhibitor berupa polisakarida, polifenol maupun konsentrasi garam yang tinggi pada proses amplifikasi PCR mampu menghambat laju aktivitas Taq *polymerase* dalam mensintesis DNA (Mullis dan Faloona 1987).

Penelitian ini menunjukkan bahwa preservasi contoh hingga minggu ke-4 jaringan tanaman kacang tanah bergejala penyakit sapu pada berbagai suhu dan medium tetap efektif untuk mendeteksi fitoplasma melalui pengujian nested-PCR. Pengujian nested-PCR dirancang untuk meningkatkan sensitivitas dan kespesifikan, khususnya amplifikasi fitoplasma dari contoh dengan konsentrasi DNA yang rendah sehingga dapat mengganggu keberhasilan PCR. Selain itu, ampikon DNA hasil PCR pertama yang telah terencerkan dan selanjutnya menjadi templat pada PCR kedua (*nested-PCR*) mampu mengurangi konsentrasi inhibitor pada reaksi PCR kedua sehingga hasil amplifikasi DNA fitoplasma lebih optimal (Prasetyo 2012).

DAFTAR PUSTAKA

- Bertaccini A, Duduk B, Paltrinieri S, Contaldo N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *Amer J Sci Res.* 5:1763–1788. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.512191>.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep.* 1:19–21. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02712670>.
- Duduk B, Paltrinieri S, Lee IM, Bertaccini A. 2013. Nested PCR and RFLP Analysis Based on the 16S rRNA Gene. Di dalam Dickinson M, Hodgetts J, editor. *Phytoplasma methods and protocols*. New York (US): Humana Press. hlm 159–171.
- Gundersen DE, Lee IM. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr.* 35:144–151.
- Hodkinson TR, Waldren S, Parnell JAN, Kelleher CT, Salamin K, Salamin N. 2007. DNA banking for plant breeding, biotechnology and biodiversity evaluation. *J Plant Res.* 120:17–29. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10265-006-0059-7>.
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U, Seemuller E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non-ribosomal DNA. *Phytopathology.* 85:771–776. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-771>.
- Mullis KB, Fallona FA. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Di dalam: *Methods in Enzymology* 155. Academic Press, Inc. hlm 335–350.
- Mutaqin KH, Suseno R, Tjahjono B, Hidayat P. 2003. Deteksi molekuler dan uji penularan fitoplasma asal rumput bermuda. *Hayati.* 10(2):66–70.
- Nejat N, Vadamalai G. 2013. Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: past and present. *J Plant Dis Prot.* 120(1):16–25. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03356449>.

- Nugroho S, Suseno R, Hidayat SH, Hidayat P. 2000. Evaluasi ketahanan beberapa varietas kacang tanah terhadap fitoplasma. *Bul HPT*. 12(2):48–52.
- Prasetyo AE. 2012. Deteksi dan identifikasi fitoplasma yang berasosiasi dengan penyakit layu kelapa di Pulau Derawan Kalimantan Timur [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Wongwarat T, Sakuanrungsirikul S, Theerakulpisut P. 2011. Effective methods of preserving SCWL-diseased sugarcane leaves for genomic DNA extraction and molecular detection of phytoplasma. *Afr J Biotech*. 10(53):10871–10876. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB11.1570>.
- Zeliang PK, Pattanayak A. 2012. Fundamental cryobiology and basic physical, thermodynamical and chemical aspects of plant tissue cryopreservation. Di dalam Abdurakhmonov I, editor. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: Plant Breeding*. <https://www.intechopen.com/books/plant-breeding/fundamental-cryobiology-and-basic-physical-thermodynamical-and-chemical-aspects-of-plant-tissue-cryoInTech>.