

Identifikasi Molekuler Fitoplasma yang Berasosiasi dengan Tanaman Kaktus Hias *Opuntia* sp.

Molecular Identification of Phytoplasma Associated with Ornamental *Opuntia* sp.

Ariny Prasetya, Kikin Hamzah Mutaqin*, Meity Suradji Sinaga, Giyanto
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Kaktus (*Opuntia* sp.) merupakan tanaman sukulen yang populer dijadikan tanaman hias. Jenis kaktus hias tertentu di Indonesia yang menunjukkan gejala proliferasi dan pola mosaik hijau telah dilaporkan terinfeksi fitoplasma. Namun, fitoplasma yang berasosiasi dengan gejala pada kaktus tersebut belum teridentifikasi secara molekuler. Penelitian ini bertujuan mendiagnosis fitoplasma yang berasosiasi dengan *Opuntia* sp. secara molekuler, yaitu menggunakan PCR standar dikombinasikan dengan *nested*-PCR, kloning, dan perunutan DNA. PCR standar dilakukan menggunakan pasangan primer P1/P7, dilanjutkan dengan *nested*-PCR dengan pasangan primer R16F2n/R16R2 dan fU5/rU3 secara terpisah yang dapat mengamplifikasi target gen 16S rRNA berturut-turut pada ukuran 1.2 kpb dan 880 pb. Amplikon DNA hasil *nested*-PCR dengan pasangan primer R16F2n/R16R2 selanjutnya dipilih untuk dikloning, dan perunutan nukleotida. Analisis BLASTn menunjukkan bahwa fitoplasma pada *Opuntia* sp. memiliki kedekatan dengan fitoplasma grup 16SrII. Analisis filogenetika dan RFLP *in silico* menunjukkan bahwa galur fitoplasma yang menginfeksi *Opuntia* sp. termasuk anggota subgrup 16SrII-C (*cactus witches' broom phytoplasma*). Identifikasi dan klasifikasi molekuler *cactus witches' broom phytoplasma* pada tanaman *Opuntia* sp. baru pertama kali dilaporkan di Indonesia.

Kata kunci: analisis BLASTn, grup 16SrII-C, *nested*-PCR, RFLP *in silico*

ABSTRACT

Cactus species (*Opuntia* sp.) is a popular ornamental succulent plant. Some ornamental cactus species in Indonesia showing proliferation and green mosaic pattern symptoms have been reported to be associated with phytoplasma infection. However, further molecular identification for accurate classification of the causal phytoplasma has not been done. This study aimed to diagnose phytoplasma associated with *Opuntia* sp. based on molecular methods involving PCR standard combined with nested-PCR, cloning and DNA sequencing. Standard PCR was carried out using P1/P7 primers followed by nested-PCR using R16F2n/R16R2 or fU5/rU3 primer pairs which amplify the 16S rRNA gene targets of 1.2 kb and 880 bp, respectively. Amplified fragment of nested-PCR using R16F2n/R16R2 primers was chosen to be cloned and sequenced for further identification and classification of phytoplasma. BLASTn analysis showed that the phytoplasma from *Opuntia* sp. was closely related to 16SrII group. Phylogenetic analysis and *in silico* RFLP indicated that phytoplasma strain infecting *Opuntia* sp. was a member of subgroup 16SrII-C (*cactus witches' broom phytoplasma*). This is a newly report of cactus witches' broom phytoplasma on *Opuntia* sp. in Indonesia.

Key words: BLASTn analysis, group of 16SrII-C, *nested*-PCR, RFLP *in silico*

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

PENDAHULUAN

Kaktus (*Opuntia* sp.) termasuk tanaman yang rentan terhadap infeksi fitoplasma. Penyakit yang disebabkan fitoplasma pada *Opuntia* spp. bergejala khas seperti sapu dan pola mosaik hijau pada epidermis (Cai *et al.* 2008) dan telah dilaporkan di berbagai negara antara lain Cina, Libanon, Meksiko, dan Italia (Dewir 2016).

Klasifikasi dan penamaan fitoplasma berdasarkan pada gen 16S rRNA mengacu pada sistem taksonomi untuk bakteri yang tidak dapat dikulturkan (Murray dan Schleifer 1994). Total dari 19 grup yang telah diketahui (grup16S rRNA atau subgrup 16Sr) dapat dibedakan dengan analisis *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dari amplifikasi sikuen 16S rRNA atau 28 grup berdasarkan analisis RFLP *in silico* (Wei *et al.* 2007). Keberadaan fitoplasma pada *Opuntia* sp. berhasil dideteksi oleh Mutaqin (2000) melalui teknik PCR standar menggunakan pasangan primer P1/P7, namun belum diidentifikasi galur fitoplasmanya. Titer fitoplasma dalam jaringan tanaman yang sangat rendah sering menghasilkan *false negative* dalam PCR standar. Oleh karena itu pengamatan fitoplasma dilakukan melalui *nested*-PCR menggunakan pasangan primer untuk re-amplifikasi DNA sasaran secara internal dalam wilayah sasaran PCR standar (Gundersen dan Lee 1996). Penelitian ini bertujuan mendiagnosis fitoplasma yang berasosiasi dengan *Opuntia* sp. dengan PCR standar yang dikombinasikan dengan *nested* PCR, kloning dan perunutan DNA.

BAHAN DAN METODE

Isolasi DNA Total Fitoplasma

Tanaman kaktus yang diduga terinfeksi fitoplasma diperoleh dari Tangerang-Banten, Indonesia (S: 06°15.651'; E: 106°36.098'). Isolasi DNA total kaktus ini dilakukan sesuai prosedur kerja kit ekstraksi *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Germany).

Sebanyak 0.1 g tanaman kaktus sakit digerus dan ditambahi 400 µL bufer AP1 dan

4 µL RNase A. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro ukuran 2 mL dan divortex perlahan, diinkubasikan selama 10 menit pada suhu 65 °C sambil dibolak-balik setiap 5 menit, selanjutnya ditambah 130 µL bufer P3, dihomogenkan, dan diinkubasikan dalam es selama 5 menit. Selanjutnya suspensi disentrifugasi pada kecepatan 14 000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke kolom ungu, dan disentrifugasi pada kecepatan 14 000 rpm selama 2 menit. Larutan yang ada pada tabung penampung diambil dan dipindahkan ke tabung mikro ukuran 2 mL. Selanjutnya, larutan ditambahi bufer AW1 sebanyak 1.5 kali volume. Campuran suspensi dipindahkan ke kolom putih dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Setelah itu, kolom bagian atas dipindahkan ke tabung penampung baru dan ditambahi 500 µL bufer AW2 dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Larutan yang berada di kolom bagian bawah dibuang. Kemudian larutan pada kolom atas ditambahkan lagi 500 µL bufer AW2, dan disentrifugasi pada kecepatan 14 000 rpm selama 2 menit. Kolom bagian atas dipindahkan ke tabung mikro ukuran 2 mL dan ditambahkan bufer AE sebanyak 50 µL, diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit untuk menampung DNA total hasil ekstraksi yang akan digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi DNA fitoplasma.

Amplifikasi DNA Fitoplasma

Deteksi fitoplasma dengan PCR standar menggunakan pasangan primer P1/P7 (Deng dan Hiruki 1991; Schneider *et al.* 1995). Reaksi PCR standar pada volume total 25 µL terdiri atas 12.5 µL 2X *DreamTaq Green PCR Master Mix* (Thermo Scientific, USA), 1 µL (5 pmol) primer *forward* dan *reverse*, 1 µL (20 ng µL⁻¹) DNA templat, dan 9.5 µL air bebas nuklease. PCR standar dilakukan dengan program denaturasi awal pada suhu 92 °C selama 1 menit; sebanyak 35 siklus denaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, penempelan primer pada suhu 55 °C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama

1.5 menit, ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit. Amplikon DNA hasil PCR standar (pengenceran 1:30) selanjutnya digunakan sebagai DNA templat dalam *nested*-PCR menggunakan pasangan primer R16F2n/R16R2 (Gundersen dan Lee 1996) dan fU5/rU3 (Lorenz *et al.* 1993). *Nested*-PCR dilakukan dengan kondisi reaksi dan siklus yang sama dengan PCR standar. PCR standar/*nested*-PCR menggunakan mesin PCR *Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, USA).

DNA hasil amplifikasi PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% yang mengandung *peqgreen* (PeqLab) pada tegangan 70 Volt DC selama 45 menit. Fragmen DNA diamati pada *Molecular Imager (BioRad Gel Doc™XR+)* yang dilengkapi dengan *Image Lab™ Software*.

Kloning dan Perunutan DNA Fitoplasma

Amplikon DNA hasil *nested*-PCR menggunakan primer R16F2n/R16R2 dipurifikasi menggunakan *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific, USA). Elusi DNA diligasikan pada vektor TA-kloning pTZ57R/T (InsTAClone kit) dan ditransformasi pada sel bakteri *Escherichia coli* DH5 α sesuai dengan petunjuk pembuat kit (Thermo Scientific, USA). Klon rekombinan diseleksi dengan koloni PCR menggunakan pasangan primer M13/pUC (-20) *forward* dan M13/pUC (-26) *reverse*.

Transforman yang positif mengandung DNA sisipan diperbanyak dalam media *Luria Bertani* cair 2 mL yang mengandung 50 mg mL⁻¹ antibiotik ampicilin. Plasmid DNA fitoplasma dipurifikasi menggunakan *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific, USA). Perunutan nukleotida DNA fitoplasma dilakukan di Laboratorium *First Base* Malaysia. Hasil perunutan nukleotida diolah menggunakan perangkat lunak *Sequence Scanner v1.0* dan *CLC sequence viewer 6.7.1*.

Analisis Urutan Nukleotida 16S rRNA

Sikuen nukleotida dikonfirmasi ke pangkalan data sikuen nukleotida di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

melalui program *basic local alignment search tool* (BLAST) untuk melihat kemiripannya dengan sikuen DNA fitoplasma yang telah tersimpan di GenBank. Hubungan kekerabatan genetika dianalisis dengan piranti lunak MEGA 7.0.18 menggunakan metode *neighbor-joining* dalam *bootstrap* 1000 ulangan. *Acholeplasma laidlawii* (M23932) digunakan sebagai pembandingan di luar grup. Pohon filogenetika dikonstruksi berdasarkan wilayah gen 16S rRNA CaWB-Tng dan strain referensi subgrup fitoplasma 16SrII-A (*peanut witches broom phytoplasma*, L33765), 16SrII-B (*Ca. Phytoplasma aurantifolia*), 16SrII-C (*cactus witches' broom phytoplasma*, AJ293216), dan anggota subgrup 16SrII yang menginfeksi tanaman kaktus berdasarkan Cai *et al.* (2008).

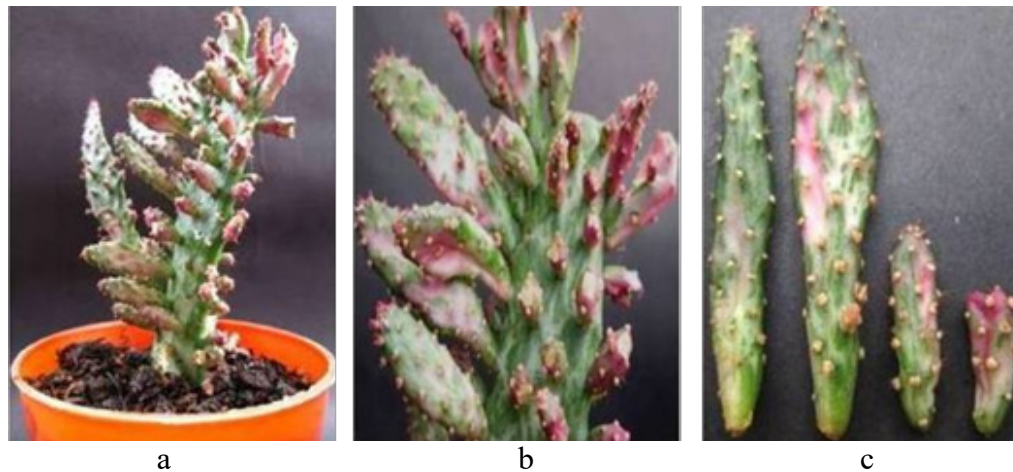
Analisis *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) secara *in silico* terhadap sikuen DNA yang ada dilakukan dengan program pDRAW32 (*AcaClone Software*, <http://www.acaclone.com>). Pemotongan sikuen DNA secara *in silico* pada komputer menggunakan 17 macam enzim restriksi, yakni *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, dan *TaqI*. Identifikasi pola RFLP *in silico* dan penghitungan koefisien kesamaan dilakukan menurut Wei *et al.* (2007).

HASIL

Deteksi Fitoplasma

Tanaman *Opuntia* sp. yang terinfeksi fitoplasma di daerah Tangerang-Banten menunjukkan gejala pertumbuhan tunas-tunas batang berukuran kecil dalam jumlah banyak (proliferasi) dan adanya pola mosaik warna hijau kemerah-merahan atau putih pucat (Gambar 1).

Deteksi fitoplasma dengan PCR standar menggunakan pasangan primer P1/P7 hanya mengamplifikasi secara universal kelompok fitoplasma pada daerah sepanjang gen 16S rRNA-*spacer region*-pangkal gen 23S rRNA. Hasil PCR standar tidak memperlihatkan adanya pita DNA berukuran \pm 1800 pb (Gambar tidak ditampilkan).



Gambar 1 Gejala infeksi fitoplasma subgrup 16SrII-C pada *Opuntia* sp.: a, *Opuntia* sp terinfeksi fitoplasma; b, Gejala proliferasi; dan c, Pola mosaik hijau kemerahan atau hijau pucat.

Deteksi fitoplasma juga dilakukan melalui amplifikasi DNA dengan metode *nested*-PCR. Amplifikasi menggunakan amplicon DNA PCR standar yang diencerkan dan pasangan primer R16F2n/R16R2 dan fU5/rU3 berhasil mengamplifikasi fragmen DNA fitoplasma pada wilayah gen internal 16S rRNA dari situs primer P1/P7. Hasil deteksi dengan *nested*-PCR berhasil mengamplifikasi pita DNA berukuran ± 1250 pb dan ± 880 pb (Gambar 2).

Analisis Urutan Nukleotida 16S rRNA

Fitoplasma yang menyebabkan proliferasi dan mosaik pada *Opuntia* sp. (CaWB-Tng) menunjukkan tingkat kemiripan 99% dengan semua isolat fitoplasma yang terdapat pada pangkalan data GenBank serta jumlah basa yang sama dan sejajar (*query cover*) 99–100%. Tingkat kemiripan (99%) dan *query cover* (99%) tertinggi, yaitu dengan *Ca. Phytoplasma aurantifolia* isolat TP01 pada *Tephrosia purpurea* (Fabaceae) yang ditemukan di India (HG792252). *Ca. Phytoplasma aurantifolia* isolat TP01 merupakan fitoplasma anggota grup 16SrII (*peanut witches' broom* (PnWB) group). Analisis filogenetika menunjukkan CaWB-Tng memiliki hubungan kekerabatan cukup dekat dengan fitoplasma subgrup 16SrII-C (AJ293216) (Gambar 3).

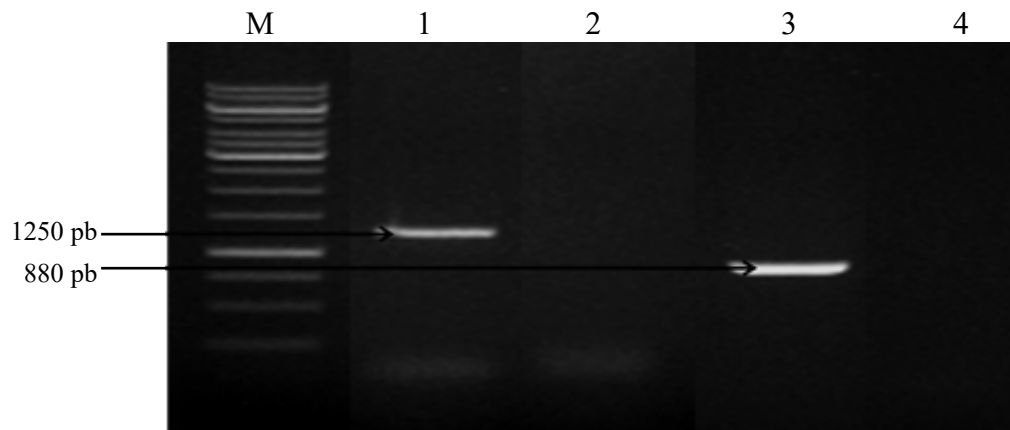
Perbandingan pola RFLP 16S rRNA CaWB-Tng dan CaWB-Cina (AJ293216) dilakukan secara *in silico* menggunakan 17 enzim restriksi untuk melihat pola

pemotongan pita DNA antara keduanya (Gambar 4). Penggunaan enzim *MseI* pada RFLP *in silico* memperlihatkan adanya satu pita DNA yang berbeda ukuran. Pola pita DNA CaWB-Tng terdiri atas enam pita berukuran 544, 259, 131, 109, 60, dan 50 pb. Sedangkan, CaWB (AJ293216) menghasilkan enam pita DNA berukuran 544, 259, 131, 92, 60, dan 50 pb. Nilai koefisien kesamaan antara CaWB-Tng dengan galur referensi subgrup 16SrII ialah di atas 0.92. CaWB-Tng memiliki nilai koefisien kesamaan tertinggi, yaitu 0.98 dengan CaWB *phytoplasma* isolat YN01 (AJ293216) asal Cina, anggota subgrup fitoplasma 16SrII-C (Tabel 1).

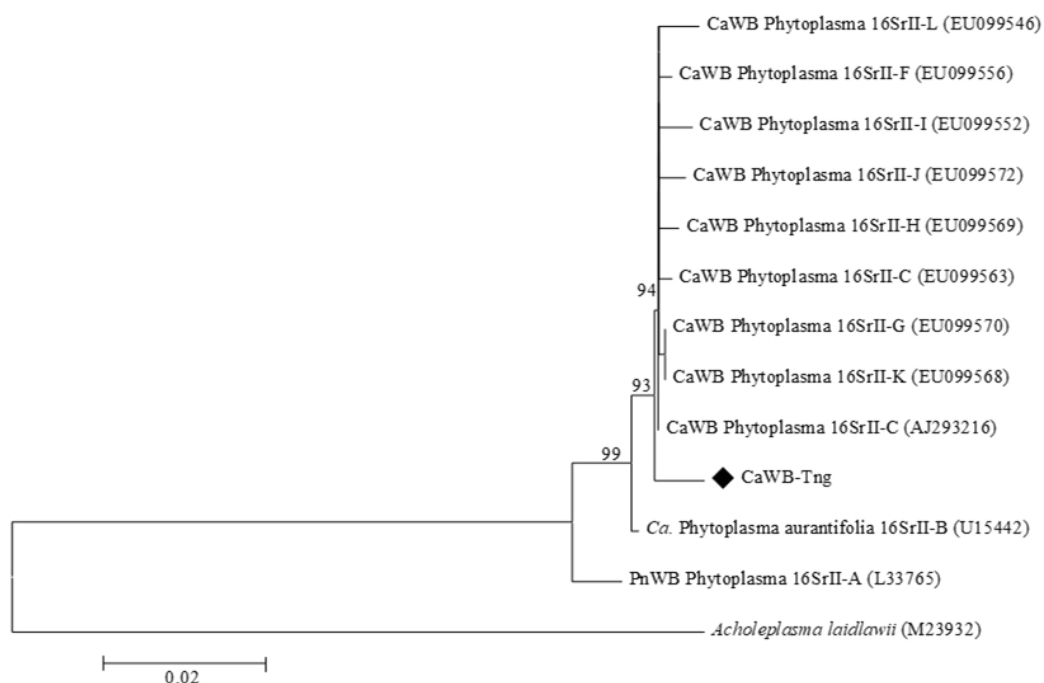
PEMBAHASAN

Fitoplasma merupakan bakteri patogen obligat yang tidak memiliki dinding sel dari kelas Mollicute. Sistem penamaannya masih sebatas *Ca. Phytoplasma* spp. (Dickinson *et al.* 2013) sehingga sulit untuk menentukan karakter fenotipe yang berguna untuk identifikasi dan klasifikasi fitoplasma (Lee *et al.* 2000). Pada awal tahun 1990an, teknik PCR dikembangkan untuk mendeteksi keberadaan fitoplasma di dalam jaringan tanaman dan serangga vektor (Namba *et al.* 1993).

Infeksi fitoplasma pada tanaman poinsettia menyebabkan pertumbuhan tunas aksilari lebih banyak sehingga tanaman menghasilkan banyak bunga dan berukuran kecil yang menarik



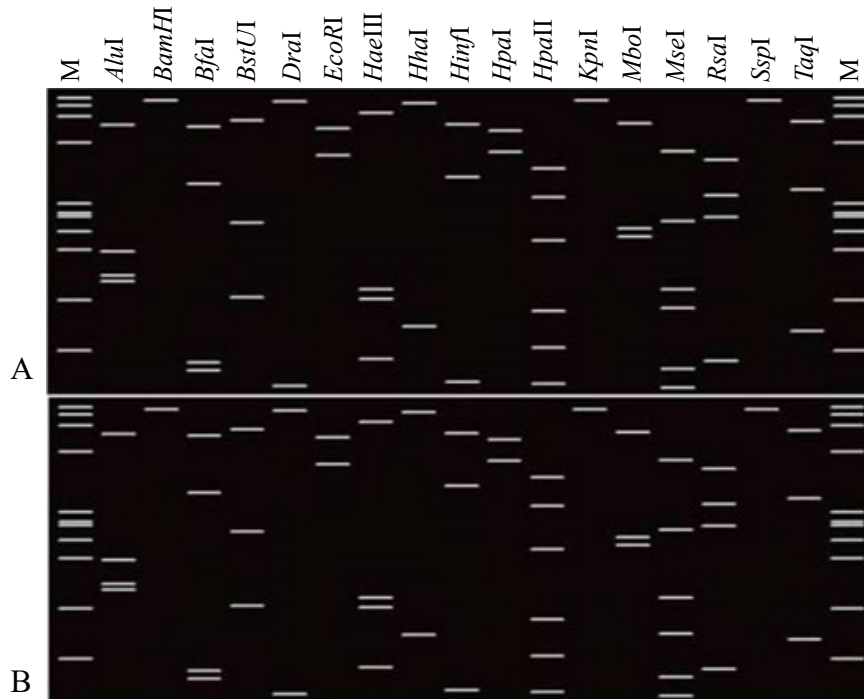
Gambar 2 Fragmen DNA fitoplasma hasil *nested*-PCR menggunakan primer R16F2n/R16R2 untuk lajur 1 dan 2, dan primer fU3/rU5 untuk lajur 3 dan 4. M, Penanda 1 kb (Thermo Scientific); 1 dan 3, *Opuntia* sp. sakit; 2 dan 4, kontrol negatif (air bebas nuklease).



Gambar 3 Pohon filogenetika yang menggambarkan hubungan kekerabatan CaWB-Tng dengan strain fitoplasma grup 16SrII yang tersimpan di *GenBank* menggunakan program MEGA 7.0.18.

untuk ditumbuhkan dalam pot (Bertaccini dan Duduk 2009). Gejala proliferasi dan mosaik pada *Opuntia* sp. memberikan penampilan yang lebih menarik pada tanaman sehingga terus dibudidayakan dan diperjualbelikan yang menyebabkan fitoplasma tersebar luas. Hal ini dapat berisiko terhadap keanekaragaman hayati tanaman famili *Cactaceae*. Penularan fitoplasma ke tanaman lainnya dapat terjadi melalui vektor serangga. Oleh karena itu, lalu lintas tanaman kaktus perlu diwaspadai untuk menghindari penyebaran penyakit.

Fragmen DNA fitoplasma yang tidak terlihat pada PCR standar dapat terjadi karena konsentrasi DNA fitoplasma yang rendah sehingga belum cukup untuk memperlihatkan adanya fragmen DNA saat divisualisasikan pada gel agarosa. Menurut Bertaccini *et al.* (2007), konsentrasi DNA fitoplasma kurang dari 1% dari DNA total yang diekstraksi dari jaringan tanaman. Konsentrasi sel fitoplasma di dalam jaringan floem bergantung pada lingkungan, bagian tanaman, dan spesies tanaman. Selain itu, adanya inhibitor di dalam tanaman seperti



Gambar 4 Analisis RFLP *in silico* menggunakan 17 enzim restriksi pada gel agarosa 3%. a, pola RFLP *in silico* CaWB-Tng; b, pola RFLP *in silico* CaWB (AJ293216, 16SrII-C); M, *molecular weight* ϕ X174DNA-*HaeIII* digestion.

Tabel 1 Koefisien kesamaan hasil analisis pola RFLP *in silico* CaWB-Tng terhadap galur pembanding dari GenBank

No. Akses	Galur pembanding	Subgrup	Koefisien kesamaan terhadap galur pembanding
L33765	PnWB Phytoplasma	16SrII-A	0.92
U15442	<i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i>	16SrII-B	0.92
AJ293216	CaWB Phytoplasma	16SrII-C	0.98
EU099563	CaWB Phytoplasma	16SrII-C	0.98
EU099556	CaWB Phytoplasma	16SrII-F	0.95
EU099558	CaWB Phytoplasma	16SrII-G	0.95
EU099569	CaWB Phytoplasma	16SrII-H	0.94
EU099552	CaWB Phytoplasma	16SrII-I	0.92
EU099572	CaWB Phytoplasma	16SrII-J	0.92
EU099568	CaWB Phytoplasma	16SrII-K	0.95
EU099546	CaWB Phytoplasma	16SrII-L	0.92

tanin dan polisakarida dapat memengaruhi keberhasilan amplifikasi DNA saat proses PCR (Adhikari *et al.* 2012).

Oleh karena itu, optimasi amplifikasi DNA perlu dilakukan menggunakan teknik *nested-PCR*. Pada penelitian ini, amplicon PCR standar yang diencerkan dijadikan cetakan pada teknik *nested-PCR* dimaksudkan untuk mengurangi konsentrasi inhibitor sehingga amplifikasi DNA fitoplasma lebih optimal.

Terbentuknya pita DNA berukuran \pm 1250 pb dan \pm 880 pb pada tahap *nested-PCR* membuktikan keberadaan fitoplasma di dalam jaringan tanaman.

Analisis filogenetika menggambarkan hubungan kekerabatan urutan nukleotida DNA fitoplasma yang diperoleh dan urutan nukleotida gen 16S rRNA fitoplasma lainnya yang telah tersimpan di GenBank. Fitoplasma yang menginfeksi *Opuntia* sp. memiliki

kekerabatan dengan fitoplasma anggota subgrup 16SrII-C, (*cactus witches' broom phytoplasma*). Nilai koefisien kesamaan berdasarkan RFLP *in silico* juga menunjukkan CaWB-Tng memiliki tingkat kesamaan yang tinggi dengan subgrup 16SrII-C. Fitoplasma subgrup 16SrII-C sebelumnya telah dilaporkan menginfeksi *Opuntia ficus-indica* di Italia (AY995133) dan Cina (JN582265; EU099563) (Dewir 2016). Hasil penelitian ini merupakan identifikasi molekuler fitoplasma *cactus witches' broom group* (16SrII-C) pada *Opuntia* sp. yang menunjukkan gejala proliferasi dan pola mosaik hijau.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada BPPSDMP Kementerian Pertanian dan BBKP Soekarno Hatta atas beasiswa dan dana penelitian serta fasilitas laboratorium yang diberikan kepada AP.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhikari S, Chattopadhyay SK, Ghosh PD. 2012. A simplified high yielding genomic DNA extraction protocol for three chemotypically different plant species. *Ind J Biotech*. 11:337–340.
- Bertaccini A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Front Biosci*. 12(2):673–689. DOI: <https://doi.org/10.2741/2092>.
- Bertaccini A, Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol Mediterr*. 48:355–378. DOI: http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-3300.
- Cai H, Wei W, Davis RE, Chen H, Zhao Y. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches'-broom phytoplasma group. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58:1448–1467. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65615-0>.
- Deng S, Hiruki C. 1991. Amplification of 16SrRNA genes from culturable and non culturable mollicutes. *J Microbiol Method*. 14:53–61. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D).
- Dewir YH. 2016. Cacti and succulent plant species as phytoplasma hosts: a review. *Phytopathogenic Mollicutes*. 6(1):1–9. DOI: <https://doi.org/10.5958/2249-4677.2016.00001.3>.
- Dickinson M, Tuffen M, Hodgetts J. 2013. The phytoplasma: an introduction. Di dalam: Dickinson M, Tuffen M, Hodgetts J, editor. *Phytoplasma Methods and Protocols*. New York (US): Humana Press. hlm 1–14. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_1.
- Gundersen DE, Lee IM. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr*. 35:144–151.
- Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol*. 54:221–255. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.221>.
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U, Seemüller E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*. 85:771–776. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-771>.
- Murray RGE, Schleifer KH. 1994. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int J Syst Bacteriol*. 44(1):174–176. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-174>.
- Mutaqin KH. 2000. Deteksi dan perbandingan fitoplasma asal rumput bermuda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) dan inang lainnya menggunakan teknik PCR-RFLP serta penularannya dengan wereng daun [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Namba S, Kato S, Iwanami S, Oyaizu H, Shiozawa H, Tsuchizaki T. 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 83:786–91. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-786>.

- Schneider B, Seemuller E, Smart CD, Kirkpatrick BC. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. Di dalam: Razin S, Tully JG, editor. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. London (UK): Academic Pr. hlm 369–380. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-012583805-4/50040-6>.
- Wei W, Davis RE, Lee IM, Zhao Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57:1855–1867. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65000-0>.