

OPTIMASI METODE PCR UNTUK DETEKSI *Pectobacterium carotovorum*, PENYEBAB PENYAKIT BUSUK LUNAK ANGGREK

OPTIMIZATION OF PCR METHOD FOR THE DETECTION OF *Pectobacterium carotovorum*, A CAUSAL AGENT OF SOFT-ROT DISEASE ON ORCHID

Tri Joko*, Nanda Kusumandari, dan Sedyo Hartono

Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Jln. Flora 1 Bulaksumur Yogyakarta 55281

*Penulis untuk korespondensi. E-mail: tjoko@ugm.ac.id

ABSTRACT

Soft rot is one of the most important diseases of orchids caused by Pectobacterium carotovorum. The conventional methods for the detection of pathogen is tedious and time consuming. In recent years, numerous molecular diagnostic approaches for the detection of P. carotovorum have been developed, including various PCR-based assays. Optimization of PCR technique to DNA amplification is essential for time and material efficiency, which will make detection to be rapid and more appropriate. The purposes of this study were to decide concentration of DNA and primer, and also the concentration of bacterial pure cultures and primer to amplify 16S rRNA gene fragment. Optimization of PCR was done by using various concentration of DNA, pure cultures of bacteria, and primer to amplify the 16S rRNA gene sequence. The results showed that the most optimum concentration to amplify 16S rRNA gene sequence at DNA and primer concentration were 63,4 ng/μl and 10 pmol, while pure cultures and primer concentrations were at 8×10⁹ CFU/ml and 10 pmol respectively.

Key words: detection, PCR optimization, Pectobacterium carotovorum, soft rot disease

INTISARI

Penyakit busuk lunak yang disebabkan oleh *Pectobacterium carotovorum* merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman anggrek. Deteksi patogen secara cepat dan akurat dapat dilakukan secara molekular menggunakan teknik *Polymerase chain reaction* (PCR). Optimasi metode PCR perlu dilakukan untuk mengefisienkan waktu dan penggunaan bahan sehingga proses deteksi dapat dilakukan dengan cepat dan tepat. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi DNA dengan primer maupun konsentrasi kultur murni bakteri dengan primer yang paling tepat untuk mendapatkan fragmen gen 16S rRNA. Optimasi PCR dilakukan menggunakan beberapa variasi pengenceran pada DNA, kultur murni bakteri, dan primer untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi yang paling optimal untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA yaitu DNA dan primer masing-masing sebesar 63,4 ng/μl dan 10 pmol, sedangkan konsentrasi kultur murni dan primer sebesar 8×10⁹ CFU/ml dan 10 pmol.

Kata kunci: deteksi, optimasi PCR, *Pectobacterium carotovorum*, penyakit busuk lunak

PENGANTAR

Penyakit busuk lunak merupakan salah satu penyakit penting dalam budidaya tanaman anggrek yang disebabkan oleh bakteri patogen, salah satunya *Pectobacterium carotovorum* (Agrios, 2005). Bakteri tersebut dapat menyerang seluruh bagian tanaman dan meluas dengan cepat bahkan menyebabkan kematian pada tanaman anggrek. Penyakit ini juga dapat menyebabkan kerusakan terutama pada saat di pembibitan hingga 80–100%. *P. carotovorum* bersifat anaerob fakultatif dan mempunyai aktivitas pektolitik yang kuat sehingga menyebabkan busuk lunak pada tanaman. Bakteri ini menyerang jaringan tanaman pada umumnya melalui pelukaan dan juga dapat melalui lubang alami (Joko *et al.*, 2011).

Banyak cara yang digunakan untuk mendeteksi bakteri patogen tumbuhan baik secara konvensional seperti penumbuhan bakteri di media agar hingga

cara modern seperti *polymerase chain reaction* (PCR) (Schaad *et al.*, 2001). PCR merupakan metode molekular untuk menggandakan potongan DNA hingga berjuta kali lipat dalam waktu yang relatif singkat. Pengandaan tersebut tidak terlepas dari penggunaan enzim dan sepasang primer bersifat spesifik terhadap DNA target yang akan dilipatgandakan. Sehingga nantinya dapat digunakan untuk keperluan lain yang berkaitan dengan DNA. Komponen-komponen yang harus ada dalam proses PCR antara lain DNA cetakan yaitu potongan DNA yang akan dilipatgandakan, primer yaitu suatu potongan atau *sequence* dari oligonukleotida pendek yang digunakan untuk mengawali sintesis DNA, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan enzim DNA polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA, dan senyawa bufer (Erllich, 1989). Secara singkat menurut Sambrook

et al. (1989) metode PCR menginkubasi sampel dalam tiga suhu berbeda yakni untuk memisahkan potongan DNA pada suhu 90–95°C, suhu 40–60°C terjadi penempelan primer pada DNA cetakan, dilanjutkan dengan sintesis DNA pada suhu 70–75°C.

Proses pemecahan untai DNA ganda menjadi untai tunggal disebut denaturasi DNA *template*, biasanya terjadi pada suhu 95°C selama 1–2 menit sehingga DNA yang berupa untai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi untai tunggal. Kemudian dilanjutkan dengan proses penempelan (*annealing*) primer pada DNA cetakan pada suhu 56°C selama 1 menit. Primer akan membentuk ikatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer. Tahap selanjutnya yakni sintesis DNA dimana akan terbentuk DNA baru berdasarkan informasi yang ada pada DNA cetakan dengan bantuan enzim DNA polimerase. Tahap sintesis ini biasanya terjadi pada suhu 72°C selama 1–2 menit. Tahapan-tahapan tersebut diulangi 25–35 siklus. Di akhir proses PCR maka hasilnya disimpan pada suhu 4°C (Yuwono, 2006). Salah satu faktor penting yang mempengaruhi kualitas deteksi molekular berbasis PCR yakni pemilihan primer yang tepat (Rychlik *et al.*, 1990; Greisen *et al.*, 1993). Primer PCR merupakan oligonukleotida yang berperan untuk mengawali proses amplifikasi molekul DNA. Keberadaan primer PCR tersebut menyebabkan gen target akan teramplifikasi sepanjang reaksi PCR berlangsung (Marchesi *et al.*, 1998).

Pemanfaatan gen 16S rRNA telah digunakan sebagai parameter sistematik molekular yang universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat jenis atau spesies. Hal ini disebabkan karena keberadaan gen tersebut tidak tergantung pada kondisi pertumbuhan dan media yang digunakan (Case *et al.*, 2007; Clarridge, 2004). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi DNA dengan primer maupun konsentrasi kultur murni bakteri dengan primer yang paling tepat untuk mendapatkan fragmen gen 16S rRNA pada *P. carotovorum*.

BAHAN DAN METODE

Isolat Bakteri

Isolat *P. carotovorum* secara rutin dibiakkan pada media agar YPA (0,5% ekstrak yeast; 1% polipepton; 1,5% agar) pada pH 6,8. Bakteri ditumbuhkan pada suhu ruang dan secara periodik koloni tunggalnya ditumbuhkan pada medium YPA yang baru untuk menjaga viabilitas dan kemurnian isolat. Isolat bakteri selanjutnya di-simpan di dalam

ddH₂O steril pada 4°C untuk penyimpanan jangka pendek (\pm 1 bulan). Untuk tujuan penyimpanan jangka panjang, isolat bakteri disimpan di dalam freezer (-20°C) pada medium yang mengandung 30% glycerol dan 70% YPB (Joko *et al.*, 2007a).

Isolasi DNA

Total genom bakteri diisolasi dengan teknik *minipreparation DNA isolation* (Ausubel *et al.*, 1990) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 1,5 ml kultur sel disentrifus dengan kecepatan 5.000g selama 2 menit. Pelet yang diperoleh kemudian dire-suspensi dalam 540 μ l TE buffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA pH 8), lalu ditambahkan 30 μ l 10% SDS dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 60 menit, ditambahkan 100 μ l 5 M NaCl, dan 80 μ l CTAB/NaCl, kemudian dihomogenkan dan diinkubasikan pada suhu 65°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 750 μ l *chloroform isoamyl alcohol* (24:1) dan disentrifus pada 12.000g selama 5 menit. Lapisan atas yang terbentuk dipindahkan ke tabung 1,5 ml *eppendorf* yang baru kemudian ditambahkan 600 μ l *phenol/chloroform/isoamylalcohol* (25:24:1) dan disentrifus 12.000g selama 5 menit. Lapisan atas dipindahkan ke tabung 1,5 ml *eppendorf* yang baru. Selanjutnya ditambahkan 0,6 \times volume isopropanol dan disentrifus kembali pada 12.000g selama 5 menit. Pelet yang terbentuk dicuci dengan etanol 70% dan dikeringanginkan, kemudian diresuspensi dalam 20 μ l bufer TE.

Perhitungan Konsentrasi DNA, Kultur Murni Bakteri, dan Primer

Pada penelitian ini dilakukan dua macam optimasi PCR yakni berdasarkan konsentrasi DNA dengan primer dan kultur murni bakteri umur \pm 48 jam dengan primer. Konsentrasi DNA *P. carotovorum* hasil ekstraksi dihitung terlebih dahulu menggunakan spektrofotometer (*GeneQuant DNA calculator*, Amersham Biosciences). Variasi pengenceran DNA ada lima yakni DNA tanpa pengenceran, pengenceran 5 \times , 10 \times , 50 \times , dan 100 \times serta variasi pengenceran primer yakni 10 \times , 50 \times , dan 100 \times .

Konsentrasi kultur murni bakteri diketahui dengan menghitung jumlah koloni per unit (CFU/ *Colony Forming Unit*). Hasil biakan *P. carotovorum* berumur \pm 48 jam dipanen di dalam 5 ml ddH₂O steril dan dihitung OD (*Optical Density*) dengan spektrofotometer. Nilai OD = 2 atau yang mendekati dibuat pengenceran hingga 10⁻¹⁰. Selanjutnya dilakukan *cover plate method* masing-masing sebanyak 100 μ l pada media solid YPA dan akan diketahui jumlah koloni tunggal berdasarkan pengamatan langsung. Variasi pengenceran kultur murni antara lain OD = 2, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶,

10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} dan 10^{-10} . Sedangkan variasi pengenceran primer yaitu $10\times$, $50\times$, dan $100\times$.

Amplifikasi Gen 16S rRNA

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan teknik PCR mengikuti prosedur Heuer *et al.* (1999) menggunakan primer 984f; 5'-AACGCGAA-GAACCTTAC-3' dan 1378r; 5'-CGGTGTGTA-CAAGGCCCGGGAACG-3'. Reaksi PCR (total volume 25 μ l) menggunakan Kit *Go Taq Green* (DNA template 2,5 μ l, primer forward dan reverse masing-masing sebanyak 1,5 μ l, *master mix Go Taq green* sebanyak 12,5 μ l dan *nuclease free water* sebanyak 7 μ l). Tabung-tabung tersebut ditempatkan pada mesin PCR (*thermal cycler*) pada suhu 94°C selama 2 menit untuk denaturasi awal. Amplifikasi dengan PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan tahapan sebagai berikut: Proses denaturasi pada suhu 94°C selama 15 detik, proses penempelan pada suhu 55°C selama 30 detik, dan proses pemanjangan pada suhu 68°C selama 30 detik. Kemudian dilanjutkan dengan *final extention* pada 72°C selama 5 menit.

Visualisasi DNA

DNA bakteri hasil amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 1% (dalam TBE 0,5 \times) yang mengandung *ethidium bromide* (Joko *et al.*, 2007b). Untuk peng-ukuran DNA digunakan *marker* 100 bp *DNA ladder*. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 75 V DC selama 90 menit. Hasil elektroforesis kemudian dilihat dengan *trans-illuminator ultra violet* dan hasilnya difoto dengan kamera digital.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Konsentrasi DNA dengan Primer

Hasil optimasi PCR 16S rRNA pada keempat variasi pengenceran DNA ($5\times$, $10\times$, $50\times$, dan $100\times$) dengan ketiga variasi pengenceran primer ($10\times$, $50\times$, dan $100\times$) dapat teramplifikasi dengan baik sehingga pita DNA terlihat jelas, sedangkan DNA murni (tanpa pengenceran) tidak dapat teramplifikasi atau tidak terbentuk pita DNA (Gambar 1).

Target pita DNA akan berada pada ukuran yang sama tetapi yang membedakan satu sama lain yakni ketebalan dan kejelasan pita tersebut. Konsentrasi DNA dan primer berpengaruh terhadap produk pita DNA yang dihasilkan. Konsentrasi DNA yang terlalu tinggi kemungkinan masih mengandung kontaminan seperti fenol dan metabolit sekunder lainnya sehingga dapat mengganggu proses penempelan primer pada DNA dan proses amplifikasi selanjutnya. Proses *annealing* atau penempelan primer pada

DNA yang komplementer menjadi tidak sempurna sehingga tidak terbentuk penggandaan pita DNA. Menurut Padmalatha dan Prasad (2006) dan Harini *et al.* (2008) konsentrasi primer yang terlalu rendah atau yang terlalu tinggi dapat menyebabkan tidak terjadinya amplifikasi. Rasio rendah antara primer dan DNA menyebabkan produk yang dihasilkan tidak konsisten (Ali *et al.*, 2006). Hal tersebut merupakan salah satu faktor yang menyebabkan hasil ekstraksi DNA yang tidak diencerkan pada penelitian ini tidak dapat teramplifikasi.

Konsentrasi pengenceran DNA $5\times$, $10\times$, $50\times$, dan $100\times$ berturut-turut yakni 317,1 ng/ μ l, 63,42 ng/ μ l, 31,72 ng/ μ l, 6,34 ng/ μ l, dan 3,17 ng/ μ l. Sedangkan konsentrasi pengenceran primer $10\times$, $50\times$, dan $100\times$ masing-masing 10 pmol, 2 pmol, dan 1 pmol. Amplifikasi PCR 16S rRNA biasanya menggunakan konsentrasi DNA dan primer universal masing-masing sekitar 65,3 ng/ μ l dan 5–20 pmol. Pita DNA yang paling baik dari optimasi PCR 16S rRNA ini pada konsentrasi DNA dan primer universal masing-masing 63,42 ng/ μ l dan 10 pmol. Hasil optimasi PCR 16S rRNA tersebut dapat dikatakan optimal karena konsentrasi DNA ataupun primernya rendah tetapi masih dapat menghasilkan pita DNA yang terlihat tebal dan jelas (Gambar 1). Konsentrasi keduanya lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi yang biasa digunakan untuk amplifikasi tetapi hasilnya sama baik. Penggunaan konsentrasi yang rendah bertujuan untuk mengefisienkan penggunaan bahan (DNA dan primer) maupun waktu.

Konsentrasi DNA 3,17 ng/ μ l dan konsentrasi primer 1 pmol masih dapat teramplifikasi dengan baik sehingga pita DNA masih terlihat jelas. Pada proses identifikasi bakteri menggunakan PCR 16S rRNA hingga analisis filogenetik tidak memerhatikan ketebalan dan kejelasan pita DNA. Hasil amplifikasi yang kurang jelas masih dapat digunakan untuk proses sekuensing, akan tetapi optimasi ini sangat berguna dalam meminimalkan penggunaan DNA dan primer. Jika hasil amplifikasi DNA terlihat baik dan jelas maka akan berpengaruh baik juga pada proses sekuensingnya.

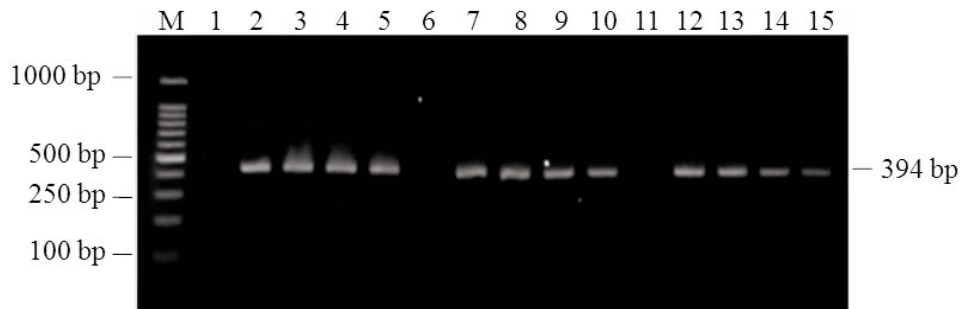
Optimasi Konsentrasi Kultur Murni Bakteri dengan Primer

Selain penggunaan DNA hasil ekstraksi juga digunakan kultur murni bakteri secara langsung untuk amplifikasi gen 16S rRNA. Proses isolasi DNA bakteri membutuhkan banyak waktu dan penggunaan bahan-bahan ekstraksi yang cukup banyak sehingga pada penelitian ini dilakukan optimasi konsentrasi kultur murni dan primer untuk mengefisienkan

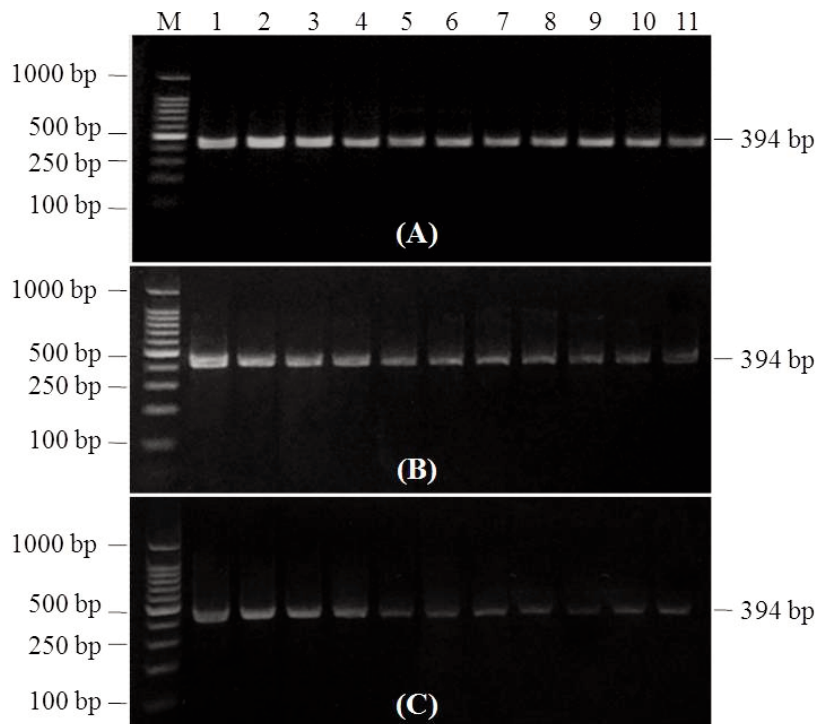
penggunaan bahan tersebut serta menghemat waktu.

Isolat murni bakteri diamplifikasi dengan beberapa macam pengenceran primer (10×, 50×, dan 100×). Seluruh kultur murni bakteri dengan pengenceran bertingkat dapat teramplifikasi dengan baik oleh gen 16S rRNA (Gambar 2A, 2B, dan 2C). Meskipun konsentrasi kultur murni bakteri beragam akan tetapi hasilnya tidak terlalu berbeda. Konsentrasi atau jumlah koloni bakteri pada OD = 2 sebe-

sar 8×10^{10} CFU/ml artinya pada pengenceran kultur murni bakteri 10^{-10} mengandung jumlah koloni 8 CFU/ml. Hasil PCR pada kultur murni bakteri ini berbeda dengan PCR pada DNA hasil ekstraksi yang mana DNA tanpa pengenceran tidak dapat teramplifikasi (Gambar 1). Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena pada kultur murni bakteri tidak dilakukan ekstraksi DNA sehingga proses PCR dilakukan langsung terhadap biakan murni bakteri se-



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA *P. carotovorum* menggunakan primer universal pada reaksi PCR yang dielektroforesis pada 1,5% gel agarosa (Lane 1–5: DNA murni tanpa pengenceran, pengenceran DNA 5×, 10×, 50×, dan 100× dengan pengenceran primer 10×; Lane 6–10: DNA murni tanpa pengenceran, pengenceran DNA 5×, 10×, 50×, dan 100× dengan pengenceran primer 50×; Lane 11–15: DNA murni tanpa pengenceran, pengenceran DNA 5×, 10×, 50×, dan 100× dengan pengenceran primer 100×; M: DNA ladder 100 bp)



Gambar 2. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA *P. carotovorum* menggunakan primer universal pada reaksi PCR yang dielektroforesis pada 1,5% gel agarosa (Lane 1: Kultur murni bakteri dengan konsentrasi 8×10^{10} CFU/ml; Lane 2–11: pengenceran kultur murni bakteri 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} dan 10^{-10} dengan pengenceran primer 10× (A), 50× (B), dan 100× (C); M: DNA ladder 100 bp)

hingga total jumlah DNA pada konsentrasi bakteri yang ada (8×10^{10} CFU/ml) kemungkinan jauh lebih sedikit dari pada DNA hasil ekstraksi. Selain itu DNA hasil ekstraksi memiliki tingkat kemurnian yang lebih tinggi dari pada kultur murni bakteri.

Perbedaan kenampakan pita DNA pada setiap pengenceran kultur murni hanya sedikit akan tetapi terlihat bahwa semakin sedikit jumlah koloni bakteri maka hasil pita DNANYA semakin tipis. Tingkat pengenceran kultur murni dengan pengenceran primer $10\times$ tidak terlalu menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Hasil amplifikasi kultur murni bakteri pada pengenceran $50\times$ dan $100\times$ terlihat lebih tipis dibandingkan pada pengenceran primer $10\times$. Dari hasil amplifikasi dapat dilihat bahwa konsentrasi primer sangat berpengaruh terhadap kenampakan pita DNA. Jumlah koloni yang digunakan untuk proses identifikasi bakteri patogen tumbuhan menggunakan gen 16S rRNA yakni sekitar 10^6 – 10^8 CFU/ml. Hasil amplifikasi kultur murni bakteri paling optimal pada konsentrasi kultur murni dan primer masing-masing 8×10^9 CFU/ml dan 10 pmol. Meskipun jumlah koloni cukup banyak akan tetapi konsentrasi primernya cukup kecil dan masih bagus dalam mengamplifikasi DNA bakteri tersebut. Konsentrasi DNA dan primer paling rendah yakni berturut-turut sebesar 8 CFU/ml dan 1 pmol ternyata masih dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA.

KESIMPULAN

1. Konsentrasi DNA dengan primer yang paling optimal untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA berturut-turut yakni 63,4 ng/ μ l dan 10 pmol, sedangkan konsentrasi kultur murni isolat *P. carotovorum* dan primer universal masing-masing sebesar 8×10^9 CFU/ml dan 10 pmol.
2. Konsentrasi DNA dengan primer yang paling minimal untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA berturut-turut yakni 6,34 ng/ μ l dan 1 pmol, sedangkan konsentrasi kultur murni isolat *P. carotovorum* dan primer universal masing-masing sebesar 8 CFU/ml dan 1 pmol.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*, 5th Edition. Academic Press. New York. 922 p.
- Ali, B.A., T.H. Huang, H.H. Salem, & Q.D. Xie. 2006. Influence of Thermal Cycler Day-to-day Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprints. *Biotechnology* 5: 324–329.
- Ausubel F.M, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, & K. Struhl (eds.). 1990. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Inter-Science.
- Case, R.J., Y. Boucher, I. Dahllöf, C. Holmström, W.F. Doolittle, & S. Kjelleberg. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 278–288.
- Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacterial on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Review* 17: 840–862.
- Erlich, H.A. 1989. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology* 9: 437–447.
- Greisen, K., A. Loeffelholz, Purohit, & D. Leong. 1993. PCR Primers and Probes for the 16s rRNA Gene of Most Species of Pathogenic Bacteria, Including Bacteria Found in Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 335–51.
- Harini, S.S., M. Leelombik, M.N.S. Kameshwari, & N. Sathyanarayana. 2008. Optimization of DNA Isolation and PCR-RAPD Methods for Molecular Analysis of *Urginea indica* Kunth. *International Journal of Integrative Biology* 2: 138–144.
- Heuer, H., K. Hartung, G. Wieland, I. Kramer, & K. Samalla. 1999. Polynucleotide Probes That Target a Hypervariable Region of 16S rRNA Genes to Identify Bacterial Isolate Corresponding to Bands of Community Fingerprint. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1045–1049.
- Joko, T., D. Kiswanti, S. Subandiyah, & Hanudin. 2011. Occurrence of Bacterial Soft Rot of *Phalaenopsis* Orchids in Yogyakarta and West Java, Indonesia, p. 255–265. In Y. Koentjoro (ed.), *Proceeding of Internasional Seminar on "Natural Resources, Climate Change, and Food Security in Developing Countries"*. 27–28 June 2011. Surabaya, Indonesia.
- Joko, T., H. Hirata, & S. Tsuyumu. 2007a. Sugar Transporter (MfsX) of Major Facilitator Superfamily is Required for Flagella-mediated Pathogenesis in *Dickeya dadantii* 3937. 2007. *Journal of General Plant Pathology* 73: 266–273.
- Joko, T., H. Hirata, & S. Tsuyumu. 2007b. The Sugar Transporter (MfsX) is Required Also for Fitness to Plant Environments in *Dickeya dadantii* 3937. *Journal of General Plant Pathology* 73: 274–280.
- Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, & W.G. Wade. 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium Specific PCR Primer that Amplify Genes Coding for Bacterial 16S-rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 795–799.

- Padmalatha, K. & M.N.V. Prasad. 2006. Optimization of DNA Isolation and PCR Protocol for RAPD Analysis of Selected Medicinal and Aromatic Plants of Conservation Concern from Peninsular India. *African Journal Biotechnology* 5: 230–234.
- Rychlik, W., W.J. Spencer, & R.E. Rhoads. 1990. Optimization of the Annealing Temperature for DNA Amplification *In vitro*. *Nucleic Acids Research* 18: 6409–6412.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schaad N.W., J.B. Jones, & W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press USA. 373 p.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Andi Offset. Yogyakarta. 237 p.