

**Isolasi dan Identifikasi Secara Molekuler *Ganoderma* spp.
yang Berasosiasi dengan
Penyakit Busuk Pangkal Batang di Kelapa Sawit**

**Isolation and Molecular Identification of *Ganoderma* spp.
Associated with Basal Stem Rot Disease in Oil Palm**

Maria Indah Purnamasari¹, Cahya Prihatna¹, Agustin Wydia Gunawan², Antonius Suwanto^{2*}

¹PT Wilmar Benih Indonesia, Bekasi 17530

²Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Sejumlah isolat *Ganoderma* spp. berhasil diisolasi dari tanaman kelapa sawit yang terserang penyakit busuk pangkal batang (BPB) di perkebunan kelapa sawit Padang dan Pontianak. Keragaman genetik isolat tersebut dianalisis berdasarkan pada sekuen *internal transcribed spacer* (ITS) di daerah DNA ribosom. Selain itu, analisis *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) juga dilakukan untuk menentukan keterkaitan isolat tersebut dengan penyakit BPB. *Ganoderma* spp. yang diisolasi memiliki keragaman yang tinggi dan tidak terdapat pengelompokan yang jelas antara isolat yang berasal dari Padang dan Pontianak. Ini menunjukkan bahwa pertukaran DNA di antara *Ganoderma* spp. yang menyerang kelapa sawit cukup sering terjadi. Hal ini mungkin disebabkan karena *Ganoderma* spp. bersifat heterotalik, ketika rekombinasi DNA terjadi pada reproduksi seksual antara talus yang berbeda. Analisis RFLP menunjukkan bahwa semua fragmen ITS dari isolat *Ganoderma* spp. terpotong oleh enzim restriksi *MluI* dan *SacI*. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat-isolat *Ganoderma* spp. ini spesifik untuk kelapa sawit dan berasosiasi dengan penyakit BPB.

Kata kunci: busuk pangkal batang, *Ganoderma* spp., *internal transcribed spacer*, kelapa sawit

ABSTRACT

A number of *Ganoderma* spp. isolates was isolated from oil palms attacked by basal stem rot (BSR) disease in Padang and Pontianak plantations. Genetic polymorphism of these isolates was analyzed based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence of ribosomal DNA region. In addition, a restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was also performed to determine the association of the isolates with BSR disease. The isolated *Ganoderma* spp. showed high DNA polymorphism and there was no obvious genetic clustering of isolates that may correspond to their geographical position in Padang and Pontianak. This indicated that exchange of DNA between *Ganoderma* spp. infecting oil palm is not uncommon. This can be explained by the heterothallic nature of *Ganoderma* spp. in which DNA recombination occurs during sexual reproduction between different thalli. RFLP analysis showed that ITS fragments from all *Ganoderma* spp. isolates were digested with restriction enzymes *MluI* and *SacI*. This indicated that the *Ganoderma* spp. isolates were specific for oil palm and thus associated with the BSR.

Key words: basal stem rot, *Ganoderma* spp., *internal transcribed spacer*, oil palm

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis, Kampus Darmaga, Bogor 16680
Tel: 0251-8622833, Faks: 0251-8315107, Surel: antoniussuwanto@gmail.com

PENDAHULUAN

Busuk pangkal batang (BPB) atau *basal stem rot* (BSR) merupakan penyakit serius yang menyerang kelapa sawit (*Elaeis guineensis*). Penyakit ini disebabkan oleh cendawan pelapuk putih *Ganoderma* spp.. Sampai saat ini ada 15 spesies yang dilaporkan berasosiasi dengan BPB, di antaranya *G. boninense*, *G. chalconum*, *G. miniactocinctum*, *G. tornatum*, dan *G. zonatum*. *Ganoderma boninense* lebih virulen daripada spesies lainnya sebagai penyebab BPB pada beberapa kasus (Ho dan Nawawi 1985; Flood *et al.* 2000; Elliott dan Broschat 2001; Utomo *et al.* 2005; Zakaria *et al.* 2005; Cooper *et al.* 2011).

Pada awalnya, penyakit ini dilaporkan hanya menyerang kelapa sawit yang telah cukup tua, namun dalam sepuluh tahun terakhir ini penyakit BPB dilaporkan terjadi pada kelapa sawit muda yang berumur setahun. Penyakit BPB semakin berbahaya bagi kelapa sawit muda di area yang sebelumnya ditanam dengan kelapa atau perkebunan sekunder (Turner 1965). Secara nasional, tingkat serangan *Ganoderma* spp. mencapai 20%, yang diperkirakan menyebabkan kerugian lebih dari Rp40 triliun setiap tahun.

Untuk mengontrol BPB, pengetahuan tentang ciri, sifat, dan perilaku dari *Ganoderma* spp. sangat diperlukan. Salah satu tahap awal untuk karakterisasi ialah identifikasi secara molekuler. Metode klasifikasi secara konvensional mempunyai batasan dalam membedakan karena karakteristik morfologi *Ganoderma* spp. dapat berubah bergantung pada kondisi lingkungannya. Hal ini dalam beberapa aspek menyebabkan kerancuan terhadap identitas spesies *Ganoderma* yang menyerang kelapa sawit di Malaysia (Ho dan Nawawi 1985; Latiffah *et al.* 2002). Karakterisasi secara molekuler pada cendawan sudah banyak digunakan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Daerah *internal transcribed spacers* (ITS) merupakan daerah sekuen DNA yang tidak menyandikan protein fungsional dan berada di daerah RNA ribosom (rRNA). Daerah ini dapat digunakan sebagai penanda genetika karena memiliki

variasi sekuen yang cukup tinggi bahkan dalam spesies yang sama. Oleh karena itu, ITS banyak digunakan untuk analisis filogeni, proses evolusi, dan penentuan identitas taksonomi (Powers *et al.* 1997). Kombinasi perbandingan sekuen daerah ITS dengan penggunaan metode *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) sangat berguna untuk mempelajari variasi genetika pada *Ganoderma* spp. (Moncalvo *et al.* 1995; Latiffah 2001; Nusaibah *et al.* 2011).

Penelitian ini bertujuan mengisolasi *Ganoderma* spp. dari tubuh buah dan jaringan batang kelapa sawit yang terinfeksi dari perkebunan kelapa sawit Padang dan Pontianak serta mengidentifikasinya secara molekuler menggunakan metode ITS-PCR-RFLP.

BAHAN DAN METODE

Isolasi Tubuh Buah *Ganoderma* dan Batang Sawit yang Diserang PBB

Biakan murni jamur ini didapatkan melalui sterilisasi permukaan tubuh buah jamur dan batang kelapa sawit yang terinfeksi menggunakan alkohol 70%. Selanjutnya tubuh buah dipotong dengan ukuran sekitar 1 cm × 1 cm, kemudian dicuci dalam air steril. Potongan tubuh buah ini dipindahkan ke dalam larutan NaOCl 0.5% selama 1 menit kemudian ke dalam alkohol 96% selama kira-kira 15–30 detik. Potongan tubuh buah dipotong kembali menjadi ukuran yang lebih kecil (0.5 cm × 0.5 cm), diinokulasikan ke medium *potato dextrose agar* (PDA, Oxoid) kemudian diinkubasi pada suhu ruangan (28 °C). Setelah miselium tumbuh di sekeliling potongan tubuh buah, hifa diisolasi dengan cara mengambil hifa yang paling jauh dari potongan tubuh buah dan diinokulasikan ke medium PDA yang baru. Isolasi *Ganoderma* dari potongan batang kelapa sawit dilakukan dari batang terinfeksi, bagian batang yang sehat tapi berdekatan dengan daerah infeksi disterilkan permukaannya menggunakan metode seperti untuk isolasi tubuh buah jamur.

Ekstraksi DNA *Ganoderma* spp.

Miselium *Ganoderma* spp. yang tumbuh pada medium PDA digunakan untuk ekstraksi DNA. Agar-agar yang ditumbuhi miselium dipotong dengan ukuran sekitar 2 cm × 2 cm, kemudian digerus di dalam mortar dengan nitrogen cair secukupnya sampai menjadi bubuk halus. Sekitar 20-25 mg dari bubuk tersebut dipindahkan ke tabung Eppendorf untuk ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan DNA Easy Plant Kit (Qiagen). DNA disimpan pada suhu -20 °C sampai digunakan. Konsentrasi dan kemurnian DNA genom diperiksa menggunakan Nanodrop.

Amplifikasi PCR pada Daerah ITS

Primer ITS-1 (5' TCCGTAGGTGAAC-CTGCGG 3') dan ITS-4 (5' TCCTC-CGCTTATTGATATGC 3') digunakan untuk mengamplifikasi daerah ITS1 dan ITS2 (White *et al.* 1990). Reaksi PCR untuk 10 µL total reaksi terdiri atas 5 µL Go-Taq (Promega), 0.5 µL primer ITS-1 dan ITS-4 (100 pM), dan 0.5 µL DNA. C-1000 *thermal cycler* (BioRad) digunakan untuk amplifikasi PCR sebanyak 30 siklus dengan kondisi denaturasi pada suhu 96 °C selama 30 detik, penempelan primer pada 50 °C selama 30 detik, dan proses pemanjangan pada 72 °C selama 90 detik. Selanjutnya sebanyak 5 µL dari hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1.5% dan divisualisasi menggunakan GelDoc (BioRad).

Sekuensing, Pemotongan Enzim, dan Analisis Data

Sebanyak 5 µL dari hasil amplifikasi dimurnikan dengan 2 µL Exo Sap, kemudian disekuensi dengan ABI Prism 3130 Genetic Analyzer. Hasil sekuensing dibandingkan dengan data sekuen di GenBank NCBI melalui program BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Berdasarkan pada hasil analisis sekuen ITS, pohon filogeni dibuat menggunakan *software* Geneious Pro 5.4.3 melalui metode UPGMA. Untuk membedakan *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan penyakit pada kelapa sawit dari *Ganoderma* spp. jenis lain, sekuen ITS hasil amplifikasi

dipotong dengan 2 enzim restriksi, *Mlu*I dan *Sac*I, secara *in silico* dengan *software* Geneious Pro 5.4.3 (Utomo *et al.* 2005).

HASIL

Secara keseluruhan sebanyak 39 sampel berupa tubuh buah dan batang terinfeksi berhasil dikoleksi dari perkebunan kelapa sawit di Padang dan Pontianak. Berdasarkan pada morfologi tubuh buah, keragaman *Ganoderma* spp. di kedua perkebunan tersebut cukup tinggi (Gambar 1). *Ganoderma* sp. dari tubuh buah dan jaringan batang tanaman sawit yang terinfeksi berhasil diisolasi (Gambar 2).

Amplifikasi PCR menggunakan primer ITS1 dan ITS4 menghasilkan pita pada ukuran sekitar 650 pb. Hasil analisis sekuen ITS dari 39 isolat menunjukkan bahwa keragaman genetiknya cukup tinggi (Tabel 1). Dari 39 isolat, satu bukan merupakan spesies *Ganoderma* spp. melainkan *Fomitopsis ostreiformis*. Cendawan ini umumnya merupakan saproba dan belum diketahui patogenitasnya terhadap kelapa sawit. Pohon filogeni dari hasil analisis sekuen ITS disajikan pada Gambar 3. Dua *G. boninense* dari GenBank disertakan dalam pembuatan pohon filogeni sebagai pembanding. Dua jenis cendawan ini diisolasi dari kelapa sawit di Malaysia (Abdullah *et al.* 2008).

Hasil pemotongan daerah ITS1–ITS4 dengan enzim restriksi *Mlu*I menghasilkan potongan sekitar 113 pb dan 537 pb, sementara enzim *Sac*I memberikan pita sekitar 127, 523, dan 650 pb. Pemotongan enzim restriksi pada percobaan ini dilakukan secara *in silico* dengan *software* Geneious dan hasil pemotongan dapat dilihat pada Tabel 2.

PEMBAHASAN

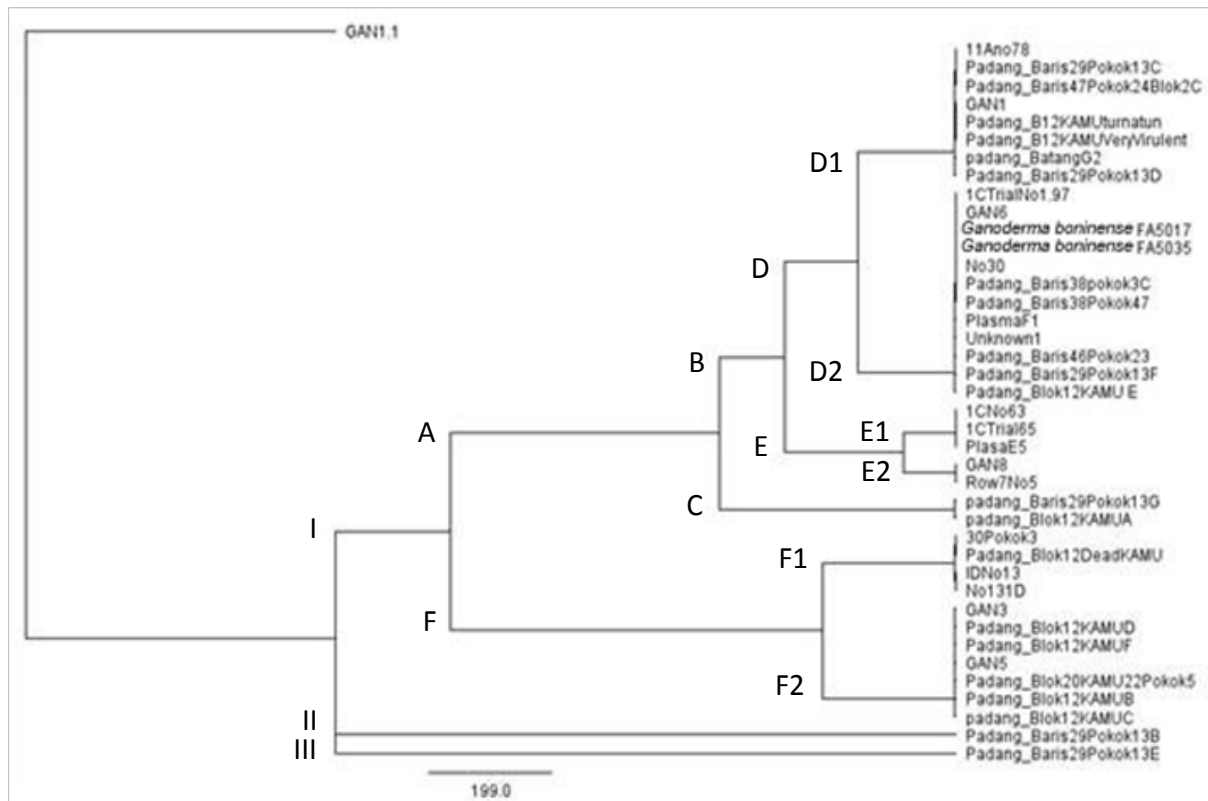
Daerah ITS dapat digunakan sebagai penanda keragaman genetika cendawan yang dapat membedakan individu-individu dalam spesies yang sama. Hasil analisis ITS menunjukkan bahwa keragaman genotipe *Ganoderma* spp. pada kelapa sawit cukup tinggi. Hal ini mungkin dapat dijelaskan oleh sifat



Gambar 1 Keragaman morfologi sejumlah tubuh buah *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan penyakit busuk pangkal batang. Keragaman morfologi tubuh buah ini cukup tinggi dan sesuai dengan hasil analisis keragaman genetica yang juga menunjukkan keragaman yang tinggi.



Gambar 2 Isolasi *Ganoderma* sp. dari tubuh buah. Miselia tumbuh dari potongan tubuh buah yang sudah disterilisasi permukaan. Miselia tersebut kemudian dipindahkan ke medium baru untuk dimurnikan.



Gambar 3 Pohon filogeni cendawan hasil isolasi dari perkebunan kelapa sawit di Padang dan Pontianak berdasarkan hasil amplifikasi fragmen DNA *internal transcribed spacer*.

Tabel 1 Hasil identifikasi 39 isolat yang diisolasi dari kelapa sawit berdasarkan pada fragmen DNA *internal transcribed spacer*

Isolat	Lokasi	Organisme	Kode akses GenBank
PlasmaF1	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. BJ-7 (99.6%)	AY220539
No131D	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. BJ-7 (99.6%)	AY220539
1CNo63	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. GB-1 (99.6%)	AY220542
1CTrialNo1.97	Pontianak	<i>Ganoderma boninense</i> (95%)	HQ235634
1CTrial65	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. GB-1 (99.3%)	AY220542
3 Pokok3	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. GB-1 (99.3%)	AY220542
PlasmaE5	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. GB-1 (99.6%)	AY220542
No30	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. STK-2006a (98.7%)	EF016754
11ANo78	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. GB-1 (87.1%)	AY220542
1DNo13	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. BJ-8 (99.6%)	AY220540
Row7No5	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. BJ-8 (99.6%)	AY220540
Unknown1	Pontianak	<i>Ganoderma</i> sp. BJ-7 (99.3%)	AY220539
GAN1	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. FA-S0 (90.3%)	AF255196
GAN1.1	Padang	<i>Fomitopsis ostreiformis</i> (100%)	FJ372684
GAN3	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. SB-1 (97.9%)	AY220544
GAN5	Padang	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i> (90%)	EU239386
GAN6	Padang	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i> (87%)	EU239386
GAN8	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. SB-1 (97.5%)	AY220544
Baris38Pokok47	Padang	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i> (99.8%)	EU239386
Baris47Pokok24B2C	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. SB-1 (96.8%)	AY220544
Baris38Pokok3C	Padang	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i> (99.7%)	EU239386
Blok20KAMU22P5	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. SB-1 (90.3%)	AY220544
Baris46Pokok23	Padang	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i> (96.8%)	EU239386
Batang G2	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. SB-1 (97.3%)	AY220544
Baris29Pokok13B	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. GanO-05 (77.4%)	HM173611
Baris29Pokok13C	Padang	<i>Ganoderma boninense</i> (87.9%)	EU841913
Baris29Pokok13D	Padang	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i> (95.7%)	EU239386
Baris29Pokok13E	Padang	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i> (87.1%)	EU239386
Baris29Pokok13F	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. BS-1 (84.3%)	AY220541
Baris29Pokok13G	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. MT-1 (85.9%)	AY220543
Blok12KAMUA	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. SB-1 (93.5%)	AY220544
Blok12KAMUB	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. MT-1 (85.9%)	AY220543
Blok12KAMUC	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. TAI-06 (91.3%)	AF255195
Blok12KAMUD	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. MT-1 (95.7%)	AY220543
Blok12KAMUE	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. AP-1 (91.5%)	AY220538
Blok12KAMUF	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. SB-1 (94%)	AY220544
Blok12KAMUtoratum	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. BS-1 (96.7%)	AY220541
Blok12DeadKAMU	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. SB-1 (98.1%)	AY220544
Blok12KAMUVeryVir	Padang	<i>Ganoderma</i> sp. SB-1 (98.1%)	AY220544

Tabel 2 Hasil pemotongan 17 isolat *Ganoderma* dari Padang dan Pontianak menggunakan enzim *MluI* dan *SacI* dari hasil amplifikasi ITS1- ITS4

Isolat	Enzim Restriksi	
	<i>MluI</i>	<i>SacI</i>
PlasmaF1	+	+
No131 D	+	+
1CNo 63	+	+
1CTrial 65	+	+
30Pokok3	+	+
PlasaE5	+	+
No30	+	+
1DNo13	+	+
Row7No5	+	+
Unknown1	+	+
GAN1.1	-	-
GAN3	+	+
GAN8	+	+
Baris38Pokok47	+	+
Baris38Pokok3C	+	+
Blok20KAMU22P5	+	+
Blok12DeadKAMU	+	+

tubuh buah yang merupakan hasil perkawinan heterokarion antarhifa yang berbeda. Untuk menghasilkan tubuh buah, *Ganoderma* sp. harus melakukan reproduksi seksual dengan hifa yang berbeda. Dengan demikian, rekombinasi DNA yang terjadi waktu reproduksi seksual berkontribusi terhadap keragaman genetika yang tinggi.

Pemotongan fragmen ITS dengan enzim restriksi *MluI* memberikan hasil pemotongan yang dapat membedakan *Ganoderma* sp. yang menyerang kelapa sawit dengan spesies *Ganoderma* sp. lainnya (Utomo *et al.* 2005). *MluI* memberikan hasil pemotongan fragmen pada semua sampel *Ganoderma* spp. pada kelapa sawit dan semua *G. boninense* yang diisolasi dari batang kelapa sawit, kecuali *F. ostreiformis*. Dari 17 sampel isolat *Ganoderma* spp. semuanya terpotong secara *in silico* dengan enzim *MluI* yang membuktikan bahwa spesies *Ganoderma* sp. tersebut merupakan spesies yang spesifik pada kelapa sawit.

GAN1.1 (*F. ostreiformis*) digunakan sebagai akar pohon filogeni karena cendawan ini diketahui bukan spesies *Ganoderma* sp. Pohon filogeni dapat dibagi menjadi tiga kluster utama (Gambar 3). Kluster I terdiri atas 2 subkluster, A dan F, sementara kluster II dan III hanya terdiri atas satu anggota *Ganoderma*, yaitu PadangBaris29Pokok13B dan PadangBaris29Pokok13E. Subkluster A dibagi lagi menjadi 2 kluster—B dan C—dan subkluster F menjadi F1 dan F2. Dua *G. boninense* acuan dari database NCBI berada di kluster D2 yang terletak pada kluster B. Terdapat lima isolat *Ganoderma* spp. yang paling mirip dengan *G. boninense* acuan, yaitu 1CTrialNo1.97, Gan6, No.30, PadangBaris38Pokok3C, dan PadangBaris38Pokok47. Hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa lima isolat ini memiliki patogenitas seperti *G. boninense*. Dari kelima isolat *Ganoderma* tersebut hanya 1CTrialNo1.97 yang berasal dari Pontianak, sementara lainnya berasal dari Padang. Penyebaran filogeni yang merata antara isolat dari Pontianak dan Padang menunjukkan bahwa tidak terdapat pengelompokan *Ganoderma* spp. yang jelas meski secara geografi terpisah dan tidak memungkinkan adanya pencampuran gen di antara keduanya. Meskipun demikian, ada beberapa individu dari daerah asal yang sama cenderung mengelompok.

Berdasarkan hasil pemotongan dan PCR daerah ITS, *Ganoderma* spp. dari dua perkebunan di Padang dan Pontianak memiliki karakteristik yang sama dan tidak saling mengelompok. Namun dari hasil pemotongan dengan enzim *MluI* membuktikan spesies-spesies yang diisolasi tersebut merupakan *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan BPB. Dari hasil ini dapat diketahui bahwa walaupun isolat-isolat tersebut berasal dari daerah yang berbeda, ciri dan karakteristiknya hampir sama. Meskipun demikian, analisis genetika ini merupakan tahap awal dari karakterisasi *Ganoderma* pada kelapa sawit. Untuk mengetahui perbedaan dalam hal patogenitas atau virulensi *Ganoderma*, diperlukan analisis genetika lanjut, terutama

terhadap gen-gen yang menyandikan protein efektor untuk virulensi atau gen-gen yang berperan dalam patogenisitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Cooper RM, Flood J, Rees RW. 2011. *Ganoderma boninense* in oil palm plantations: current thinking on epidemiology, resistance and pathology. *Planter*. 87:515-526.
- Elliott ML, Broschat TK. 2001. Observations and pathogenicity experiments on *Ganoderma zonatum* in Florida. *Palms*. 45:62-72.
- Ho YW, Nawawi A. 1985. *Ganoderma boninense* Pat. from basal stem rot of oil palm (*Elaeis guineensis*) in Peninsular Malaysia. *Pertanika*. 8:425-428.
- Latiffah Z. 2001. Comparative studies on *Ganoderma* from infected oil palm and coconut stumps with special reference to their morphological, molecular, and isozyme characteristics (disertasi). Serdang (MV): Univ Putra Malaysia.
- Latiffah Z, Abdullah F, Harikhrisna K, Tan SG, Ho YW. 2002. Morphological and growth characteristic and somatic incompatibility of *Ganoderma* from infected oil palm and coconut stumps. *Malaysian Appl Biol*. 31:37-48.
- Moncalvo JM, Wang HH, Hseu RS. 1995. Phylogenetic relationship in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*. 87(2):223-238. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/3760908>.
- Nusaibah SA, Latiffah Z, Hassaan AR. 2011. ITS-PCR-RFLP analysis of *Ganoderma* spp. infecting industrial crop. *Pertanika J Trop Agric Sci*. 34(1):83-91.
- Powers TO, Todd TC, Burnell AM, Murray PCB, Fleming CC, Szalanki AL, Adams BA, Harris TS. 1997. The internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *J Nematol*. 29:441-450.
- Turner PO. 1965. The incidence of *Ganoderma* disease of oil palms in Malaya and its relation to previous crop. *Ann Appl Biol*. 55:417-423. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.1965.tb07954.x>.
- Utomo C, Werner S, Niepold F, Deising HB. 2005. Identification of *Ganoderma*, the causal agent of basal stem rot disease in oil palm using a molecular method. *Mycopathologia*. 159(1):159-170. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-004-4439-z>.
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics. Di dalam: Innis MA, Sninsky DH, White TJ, editor. *PCR protocols*. London (UK): Academic Press. hlm 315-322.
- Zakaria L, Kulaveraasingham H, Guan TS, Abdullah F, Wan HY. 2005. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and random amplified microsatellite (RAMS) of *Ganoderma* from infected oil palm and coconut stumps in Malaysia. *Asia Pacific J Mol Biol Biotechnol*. 13:23-34.