

Analisis Keragaman Genetik *Acremonium* yang Berasosiasi dengan Tanaman Gaharu Menggunakan Teknik *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

Dewi Rahmawati¹ dan Nurita Toruan-Mathius²

¹Laboratorium Bioteknologi, SEAMEO BIOTROP, Jl. Raya Tajur Km 6, Bogor

²Plant Production and Biotechnology Div., TCLZ and Biotechnology Lab., PT SMART Tbk, Jl. Raya Pajajaran 78 F-6, Bogor

ABSTRACT

Genetic Diversity of *Acremonium* Associated with Agarwood Plant as Analyzed using the RAPD Technique.

Dewi Rahmawati and Nurita Toruan-Mathius. Agarwood or gaharu is a plant that has a high economic value in Asia, due to its use for production of incense and traditional medicines. The agarwood formation occurs in the trunk and roots of trees that have been infected by a fungus, such as *Acremonium* spp. Various fungi were associated with the agarwood formation. *Acremonium* is generally considered as highly polyphyletic, contains distantly related fungi. A study was done to identify genetic diversities in 10 isolates of *Acremonium* spp. from four different areas in Indonesia that are associated with *Aquilaria* and *Gyrinops verstigi* using the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique. Eight RAPD primers, i.e., OPA 02, OPB 04, OPB 07, OPB 17, OPC 11, OPD 03, OPD 05, and OPE 07 were used in the analyses. The results indicated that similarity index values of the genetic variation ranged from 0.21 to 0.97. Based on the Nei and Li's similarity coefficients, these values indicating the presence of high degree of genetic variability. The lowest degree of genetic similarity were found between isolates F (*Acremonium* spp., which is associated with *G. verstigi* from Mataram, Nusa Tenggara Barat), and LM2 from south coastal area of West Sumatra. The highest genetic similarity value (0.97) was found between isolates Sr2 and Sr4 from Sorong, Papua. Results from the cluster analysis indicated that the isolates could be grouped into two major clusters that were associated with their geographical locations.

Key words: Agarwood, genetic diversity, *Acremonium* spp., RAPD.

PENDAHULUAN

Gaharu terbentuk sebagai respon pohon gaharu (*Aquilaria* spp.) terhadap infeksi patogen yang mengakibatkan keluarnya resin. Resin yang terbentuk tidak dikeluarkan dari pohon, melainkan disimpan dalam jaringan kayu, sehingga jaringan kayu yang putih dan bertekstur halus berubah menjadi gelap dan keras (Anonim 2002). Gaharu telah digunakan selama ribuan tahun untuk pengobatan tradisional di Cina (Barden *et al.* 2000). Resin yang beraroma wangi dimanfaatkan

sebagai bahan dasar industri parfum. Umat Hindu dan Budha memanfaatkan gaharu sebagai dupa atau kemenyan dalam upacara ritual keagamaan (Perry dan Metzger 1980).

Pembentukan gubal gaharu pada tanaman gaharu ada hubungannya dengan mekanisme pertahanan yang merupakan bagian dari proses patogenesis dengan memproduksi metabolit sekunder. Umumnya metabolit sekunder yang dibentuk adalah dari kelompok seskuiterpenoid karena adanya infeksi mikroorganisme (Goodman *et al.* 1986). Umboh *et al.* (1998) melaporkan bahwa cendawan *Acremonium* spp. merupakan agen penginduksi gubal gaharu pada spesies *Aquilaria*. Di samping itu, percobaan inokulasi dengan isolat cendawan yang sama memberikan hasil yang berbeda antar tanaman. Hal ini menunjukkan bahwa pembentukan gubal gaharu dipengaruhi oleh genotipe *Aquilaria*.

Salah satu genus cendawan yang dapat menginduksi terbentuknya senyawa gaharu adalah *Acremonium* yang berfungsi sebagai bioelisor. Menurut Umboh *et al.* (2000), *Acremonium* merupakan penginduksi terbaik dalam pembentukan senyawa gaharu pada klon tanaman gaharu *Aquilaria filaria*, *A. malaccensis*, *A. microcarpa*, dan *A. crassna*. *Acremonium* juga merupakan satu-satunya genus yang berasosiasi dengan gaharu di daerah Riau, Nusa Tenggara Barat, dan Irian Jaya (Rahayu *et al.* 1998).

Rahmawati *et al.* (2006) telah mengidentifikasi isolat cendawan yang berasosiasi dengan tanaman gaharu asal Sorong (Papua) dan Martapura (Kalimantan Selatan) berdasarkan ciri-ciri fenotipik (morfologi) dan menggunakan 18S rDNA. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat tersebut adalah *Acremonium* spp. Isolat *Acremonium* spp. yang berasal dari berbagai daerah di Indonesia menunjukkan tingkat keragaman morfologi yang cukup tinggi, namun, keragaman genetiknya belum diketahui. Dilaporkan ada 105 spesies *Acremonium* yang hidup sebagai saprofit pada berbagai substrat, parasit pada hewan, cendawan antagonis, herbisida, atau endofit.

Di samping berdasarkan ciri-ciri fenotipik, keragaman genetik antarisolat cendawan, misalnya pada *A. cucurbitacearum* (Vicente *et al.* 1999), *Alternaria* spp. (Pyor *et al.* 2002), *A. implicatum* (Kelemu *et al.* 2003), dan *Bipolaris sorokiniana* dapat diketahui dengan menggunakan analisis berbasis DNA, di antaranya adalah *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Latha *et al.* 2004, Teixeira *et al.* 2004).

Nusaibah *et al.* (2007) melakukan re-evaluasi keragaman genetik antarspesies dan di antara isolat dalam spesies *Ganoderma* sp., yaitu cendawan yang menyerang akar tanaman kelapa sawit dari beberapa perkebunan kelapa sawit di Malaysia, menggunakan teknik *Amplified Fragment Length Polymorphic DNA* (AFLP). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa AFLP DNA mampu membedakan beberapa isolat yang fenotipiknya hampir sama. Razali *et al.* (2007) mempelajari keragaman populasi cendawan pada perkebunan kelapa sawit dan hubungannya dengan sistem pengelolaan, menggunakan *PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE). Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan populasi cendawan antarsistem pengelolaan yang berbeda.

Respon yang berbeda antar tanaman terhadap isolat-isolat *Acremonium* sp. menunjukkan adanya keragaman genetik antarisolat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik sepuluh isolat *Acremonium* dari empat daerah di Indonesia yang berasosiasi dengan pembentukan senyawa gaharu menggunakan teknik RAPD.

BAHAN DAN METODE

Sepuluh isolat *Acremonium* spp. yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari koleksi Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, SEAMEO BIOTROP, Bogor, yang berasosiasi dengan *Aquilaria* spp. dan *Gyrinops verstegii* dari empat wilayah di Indonesia (Tabel 1).

Isolasi dan Pemurnian DNA

DNA genom dari berbagai isolat *Acremonium* spp. yang diuji diisolasi dari miselium 0,5 g berumur satu minggu yang dikulturkan dalam medium cair M102, menggunakan metode Lee dan Taylor (1990). Pemurnian DNA dilakukan dengan menambahkan kloroform : fenol (24 : 1 vol/vol). Pada pemurnian tahap akhir, supernatan dipindahkan ke dalam Eppendorf baru dan ditambah dengan NaOAc 3 M 10 µl. DNA diendapkan dengan diinkubasi selama 24 jam pada suhu -20°C, endapan DNA kemudian dicuci dengan etanol 70% dan dikeringkan dengan pompa vakum pada suhu 50°C selama ±1 jam. DNA yang diperoleh dilarutkan dengan bufer TE 2 100-500 µl (Tris HCl 10 mM dan EDTA 0,1 mM), kemudian disimpan pada suhu -20°C.

Kualitas dan kuantitas DNA ditetapkan dengan elektroforesis (Sambrook *et al.* 1989). Sedangkan kualitas DNA ditetapkan berdasarkan adanya pita DNA berwarna putih tebal tanpa adanya *smear*.

Seleksi Primer RAPD

Dua puluh tujuh jenis primer acak 10-mer yang digunakan untuk seleksi primer-primer yang mampu menghasilkan pita DNA yang polimorfis adalah OPA 02, OPA 12, OPA 14, OPA 17, OPA 19, OPB 04, OPB 07, OPB 11, OPB 17, OPB 20, OPC 01, OPC 06, OPC 08, OPC 19, OPC 11, OPC 15, OPC 17, OPD 03, OPD 05, OPD 11, OPD 17, OPE 01, OPE 07, OPE 12, OPE 18, OPB 09, dan OPC 13 (Operon, Alameda, USA).

Reaksi PCR dilakukan dalam total reaksi 25 µl yang mengandung DNA genom cetakan 10 ng; primer 10 pmol; dNTPs 0,2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), 1 unit enzim *Taq* DNA polimerase dalam larutan 1 x PCR bufer dengan MgCl₂. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan alat GeneAmp PCR sistem 9700 (Applied Biosystems). Amplifikasi DNA sampel dilakukan sebanyak 45 siklus dengan tahapan PCR sebagai berikut 94°C 1 menit kondisi awal, denaturasi 94°C

Tabel 1. Sepuluh isolat *Acremonium* spp. dari empat daerah di Indonesia yang digunakan untuk analisis keragaman genetik.

Kode isolat	Inang	Asal
Sr1	<i>Aquilaria</i> spp.	Sorong, Papua
Sr2	<i>Aquilaria</i> spp.	Sorong, Papua
Sr4	<i>Aquilaria</i> spp.	Sorong, Papua
Sr5	<i>Aquilaria</i> spp.	Sorong, Papua
Sr7	<i>Aquilaria</i> spp.	Sorong, Papua
MP1	<i>Aquilaria</i> spp.	Martapura, Kalimantan Selatan
MP2	<i>Aquilaria</i> spp.	Martapura, Kalimantan Selatan
MP3	<i>Aquilaria</i> spp.	Martapura, Kalimantan Selatan
LM2	<i>Aquilaria</i> spp.	Pesisir Selatan, Sumatera Barat
F	<i>Gyrinops verstegii</i>	Mataram, Nusa Tenggara Barat

1 menit, penempelan primer 36°C 1 menit, sintesis DNA 72°C 2 menit, sintesis tambahan 72°C 4 menit dan akhir dari seluruh siklus dikondisikan pada suhu tetap 4°C. Sampel DNA hasil PCR sebanyak 15 µl ditambah dengan *loading dye* 3 µl dan dijalankan pada 1,2% gel agarose (AppliChem) pada tegangan listrik 70 volt, arus 100 A selama 1 jam 30 menit, kemudian gel agarosa direndam dalam etidium bromida 1% selama 1 jam dan divisualisasikan pada *gel logic 2000 Imaging System* UV dengan perangkat lunak kodak ID 2.6.

Analisis Data

Analisis data dari hasil RAPD dilakukan menggunakan analisis gerombol dengan teknik berhierarki menggunakan program *Numerical taxonomy and Multivariate Analysis System* versi 2.10 (NTSYS) (Rohlf 1993). Selanjutnya pengelompokan tersebut ditampilkan dalam bentuk dendrogram (Franco *et al.* 1997). Ukuran derajat kemiripan genetik antargenotipe berdasarkan koefisien kemiripan genetik atau jarak genetik ditetapkan dengan menggunakan metode *Unweight Pair Group Method Arithmetic* (UPGMA).

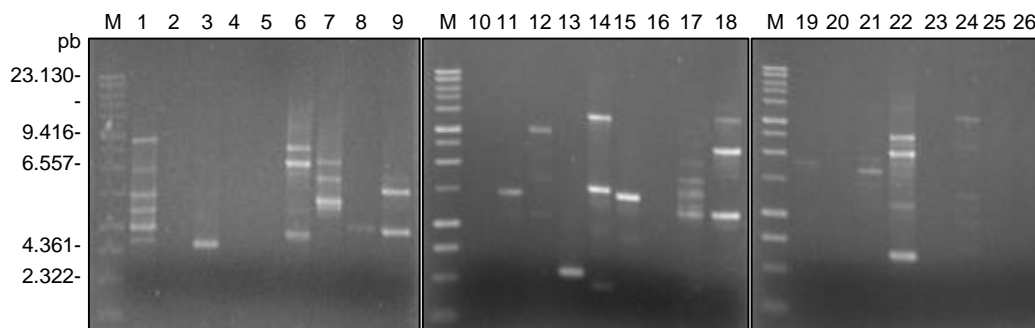
Fragmen yang dihasilkan dari analisis RAPD yang tampak sebagai pita DNA diterjemahkan menjadi data biner berdasarkan ada atau tidaknya pita yang dimiliki secara bersama oleh individu tanaman yang dianalisis. Nilai satu (1) diberikan untuk yang memiliki pita dan nilai nol (0) untuk yang tidak memiliki pita. Estimasi kemiripan genetik diperoleh berdasarkan jumlah pita yang dimiliki bersama. Pengelompokan data matriks dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode UPGMA, fungsi *Similarity Qualitative* (SIMQUAL) pada program NTSYS versi 2.1 (Rohlf 1993). Tingkat kepercayaan dari dendrogram berdasarkan UPGMA ditentukan melalui analisis *bootstrap* menggunakan program *Winboot* dengan pengulangan sebanyak 200 kali. Data matriks kemiripan genetik dihitung dari koefisien Dice (S) (Nei dan Li 1979).

HASIL DAN PEMBAHASAN

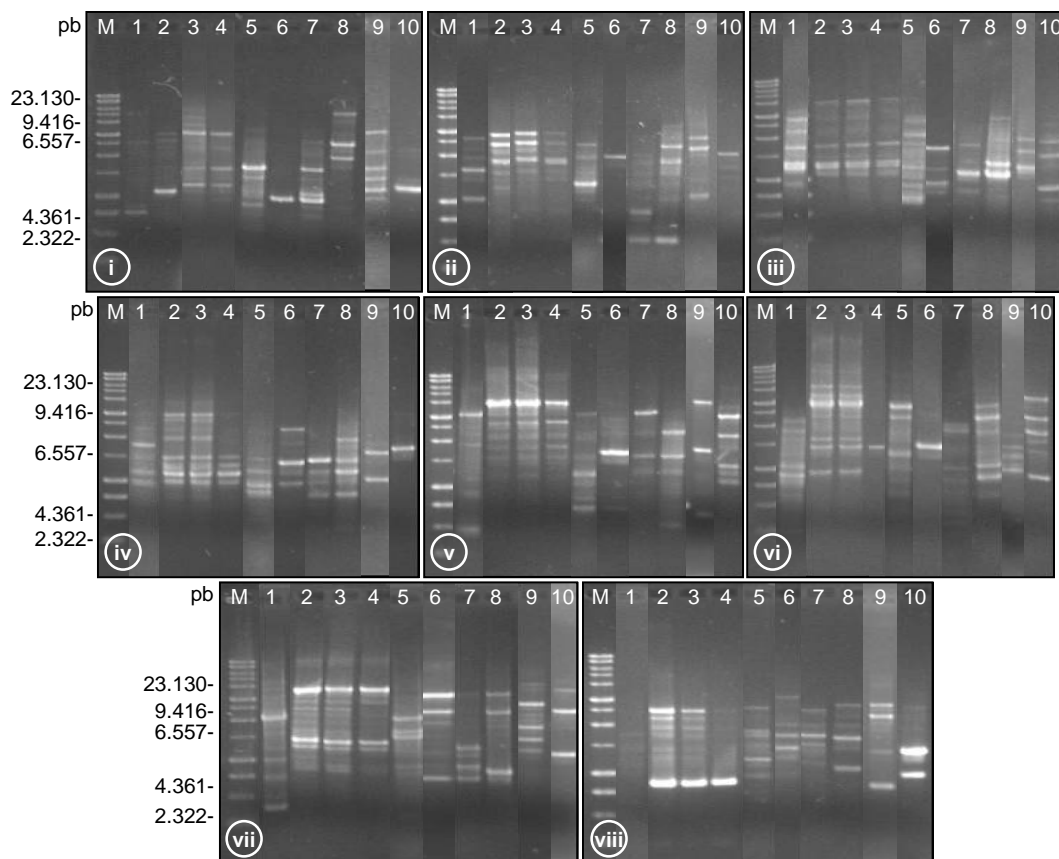
Dari 27 primer acak yang digunakan untuk seleksi primer, sebanyak 19 primer tidak dapat mengamplifikasi DNA contoh. Hanya delapan primer, yaitu OPA 02, OPB 04, OPB 07, OPB 17, OPC 11, OPD 03, OPD 05, dan OPE 07 yang menghasilkan pita yang polimorfis dengan ukuran fragmen 300-4.000 pb (Gambar 1). Berdasarkan pola fragmen DNA yang diperoleh, dihasilkan pita DNA sebanyak 1-8 buah (Gambar 2). Selanjutnya untuk penelitian keragaman genetik isolat yang diuji digunakan delapan primer tersebut di atas untuk mengamplifikasi DNA contoh.

Fraksinasi DNA hasil amplifikasi dari delapan primer terpilih menunjukkan adanya keragaman pita DNA antarisolat yang diuji dalam masing-masing primer yang sama. Jumlah pita DNA atau lokus yang dihasilkan adalah sebanyak 52 lokus (Gambar 2). Sebagian besar pita yang diperoleh merupakan pita yang kurang tegas, dan tidak ditemukan adanya pita yang khas untuk isolat tertentu. Diperoleh kisaran 21-97% kesamaan genetik antarisolat yang diuji (Tabel 2). Hubungan kekerabatan yang terdekat adalah antarisolat Sr2 dengan Sr4, yaitu 0,97. Kedua isolat tersebut berasal dari Sorong, Papua dan tanaman inangnya *A. malaccensis*. Kesamaan genetik terendah diperoleh antarisolat LM2 dengan isolat F, yaitu 0,21. Besarnya keragaman antarkedua isolat tersebut kemungkinan disebabkan asal dan tanaman induk yang berbeda. Isolat F berasal dari Mataram dengan tanaman induk *G. verstigi*, sedangkan isolat LM2 berasal dari Pesisir Selatan, Sumatera Barat dengan induk *A. malaccensis*. Kesamaan genetik antarisolat Sr1, Sr2, Sr4, Sr5, Sr7 berkisar antara 0,33-0,70 berarti antarisolat dari asal yang sama juga cukup beragam (Sorong dengan tanaman inang yang sama).

Dendrogram untuk pohon filogenetika menunjukkan bahwa seluruh isolat *Acremonium* yang diuji terbagi menjadi dua klaster. Klaster I beranggotakan



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA isolat cendawan *Acremonium* F dengan 27 primer acak. M: marka 1 kb ladder DNA, primer (1) OPA 02, (2) OPA 12, (3) OPA 14, (4) OPA 17, (5) OPA 19, (6) OPB 04, (7) OPB 07, (8) OPB 11, (9) OPB 17, (10) OPB 20, (11) OPC 01, (12) OPC 06, (13) OPC 08, (14) OPC 19, (15) OPC 11, (16) OPC 15, (17) OPC 17, (18) OPD 03, (19) OPD 05, (20) OPD 11, (21) OPD 17, (22) OPE 01, (23) OPE 07, (24) OPE 12, (25) OPE 18, (26) OPB 09, dan (27) OPC 13.



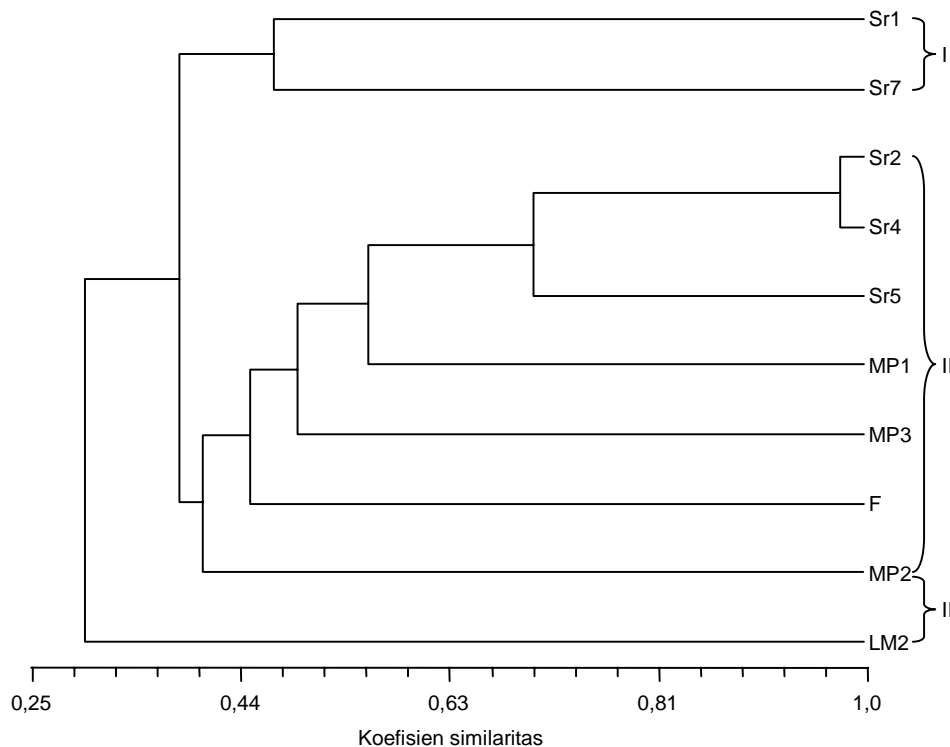
Gambar 2. Hasil fraksinasi DNA 10 isolat *Acremonium* spp. yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia, menggunakan primer (i) OPA 02, (ii) OPB04, (iii) OPB07, (iv) OPB17, (v) OPB11, (vi) OPD07, (vii) OPD05, dan (viii) OPD07.

Tabel 2. Matriks kemiripan genetik 10 isolat *Acremonium* spp. berdasarkan analisis RAPD menggunakan delapan primer acak.

	Sr1	Sr2	Sr4	Sr5	MP1	Sr7	MP2	MP3	F	LM2
Sr1	1,0000									
Sr2	0,4615	1,0000								
Sr4	0,4444	0,9725	1,0000							
Sr5	0,3881	0,6977	0,7059	1,0000						
MP1	0,4359	0,5979	0,5833	0,4932	1,0000					
Sr7	0,4746	0,3846	0,3636	0,3333	0,3385	1,0000				
MP2	0,3692	0,3571	0,3855	0,4333	0,4789	0,3462	1,0000			
MP3	0,4737	0,5053	0,5106	0,4225	0,5366	0,3492	0,4638	1,0000		
F	0,3143	0,4944	0,4773	0,4615	0,3947	0,3509	0,2857	0,3784	1,0000	
LM2	0,3051	0,3333	0,3377	0,3333	0,3077	0,2174	0,2308	0,3810	0,2105	1,0000

isolat LM2, yaitu *Acremonium* spp. yang berasosiasi dengan *A. malaccensis* berasal dari daerah Pesisir Selatan, Sumatera Barat. Kluster II beranggotakan isolat Sr1, Sr2, Sr4, Sr5, dan Sr7 yang berasal dari Sorong (Papua), isolat MP1, MP2, dan MP3 yang berasal dari Martapura (Kalimantan Selatan), dan isolat F yang berasosiasi dengan *G. verstigi*, berasal dari Mataram (Nusa Tenggara Barat). Kluster II terbagi menjadi dua kelompok kecil, yaitu Kelompok I yang terdiri atas isolat Sr1 dan Sr7, dan Kelompok II yang terdiri atas isolat Sr2, Sr4, Sr5, MP1, MP2, MP3, MP2, dan F. Ber-

dasarkan matriks kesamaan genetik tampak bahwa antarisolat memiliki kesamaan genetik yang rendah, artinya sangat beragam (Gambar 3, Tabel 2). Pengamatan *in planta* menunjukkan bahwa isolat F baik sebagai isolat tunggal maupun yang berkombinasi dengan cendawan dari genus lain mampu menginduksi pembentukan aroma wangi pada kayu gaharu tidak hanya pada spesies *A. malaccensis* dan *A. microcarpa* (Umboh *et al.* 2000), tetapi juga pada *A. crassa* (Isnaini 2004).



Gambar 3. Dendrogram 10 isolat cendawan *Acremonium* spp., yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia berdasarkan analisis RAPD.

Rahmawati *et al.* (2006) melaporkan bahwa dalam uji ganda antar isolat *Acremonium* spp. (isolat Sr dan F) dengan planlet *A. malaccensis* menunjukkan bahwa seluruh cendawan yang diuji bersifat patogenik dan mampu menghasilkan tingkat wangi yang beragam. Seluruh isolat Sr dan F menghasilkan tingkat wangi yang lebih menyengat dibandingkan dengan isolat MP, sedangkan isolat LM2 tidak menghasilkan aroma wangi. Rahmawati *et al.* (2006), juga melaporkan bahwa berdasarkan ciri-ciri morfologi koloni semua isolat yang diuji, hanya terdapat sedikit perbedaan bentuk koloni, warna koloni, dan miselium udara. Di samping itu, kecepatan tumbuh isolat juga berbeda. Pada umumnya, koloni isolat yang diuji berwarna oranye pucat, sedangkan koloni isolat Sr2 dan Sr5 yang berasal dari inang *Aquilaria* spp., dari Sorong, koloninya berwarna sedikit kemerah-merahan. Sebagian besar dari isolat memiliki miselium udara yang agak tipis. Hasil pengamatan histologis menunjukkan adanya tingkat kesamaan yang tinggi antar sebagian besar isolat Sr dengan isolat F.

Untuk mendapatkan gambaran yang lebih jelas mengenai penyebaran *Acremonium* spp. yang erat hubungannya dengan penyebaran tanaman gaharu di seluruh Indonesia, maka penelitian ini perlu dilanjutkan dengan menggunakan primer yang spesifik dengan jumlah yang lebih banyak. Penelitian yang sama

terhadap populasi-populasi lainnya dari asal daerah sebaran gaharu, sebaiknya dilakukan untuk mempelajari diversifikasi jamur *Acremonium* spp.

KESIMPULAN

Acremonium spp. yang berasal dari empat daerah di Indonesia menunjukkan tingkat keragaman genetik yang tinggi, yaitu antara 0,21-0,97. Isolat Sr2 dan Sr7 memiliki kesamaan genetik yang tinggi (0,97), keduanya berasal dari Sorong (Papua) dengan inang *A. malaccensis*, kedua isolat tersebut kemungkinan adalah satu spesies.

Isolat-isolat cenderung berkelompok berdasarkan geografis atau daerah asalnya. Pengelompokan isolat terdiri atas dua klaster, sedangkan isolat *Acremonium* spp. asal Sumatera Barat membentuk kelompok sendiri di luar isolat dari daerah lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2002. Cultivating the world's most expensive incense. eNews 25 July 2002: 2-3. <http://www.umn.edu/systemwids/enews/072502.html>.
- Barden, A., N.A. Anak, T. Mulliken, and M. Song. 2000. Hearth of the matter: Agarwood use and trade and CITES implementation for *Aquilaria malaccensis* (Traffic Network Report). Cambridge Traffic International.

- Franco, J., J. Croosa, J. Diaz, S. Saba, and S.A. Ebehart. 1997.** A sequential clustering strategy for classification. *Phytomorphology* 1:67-69.
- Goodman, R.N., Z. Kiraly, and K.R. Wood. 1986.** *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. Columbia University of Missouri Press, Columbia.
- Isnaini, Y. 2004.** Induksi produksi gubal gaharu melalui inokulasi cendawan dan aplikasi faktor abiotik. Tesis Sekolah Pascasarjana. Intsitut Pertanian Bogor.
- Kelemu, S., H. Dongyi, H. Guixiu, and Y. Takayama. 2003.** Detecting and differentiating *Acremonium implicatum*: Developing a PCR-based method for an endophytic fungus associated with the genus *Brachiaria*. *Mol. Plant Path.* 4(2):115-118.
- Latha, R., T.S. Suryanarayanan, and M.S. Swaminathan. 2004.** Genetic diversity in *Acremonium* endophytes isolated from Warmseason grasses as revealed by RAPD Markers. *J. Plant Biochem. Biotech.* 13:39-42.
- Lee, S. and J. Taylor. 1990.** Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. *In* Inns, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninky, and T.J White (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York. p. 282-287.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5269-5273.
- Nusaibah, S.A., S. Rajinder, and A.S. Idris. 2007.** Inter and intra-specific variation of four different Ganoderma species via AFLP. *Proc. of Agriculture, Biotechnology and Sustainability Conf. PIPOC* 2:898-906.
- Perry, L.M. and J. Metzger. 1980.** *Medicinal Plants of East and South east Asia: Attributed Properties and Uses*. MIT Press London.
- Pryor, B.M. and T.J. Michailides. 2002.** Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology* 92:406-416.
- Rahayu, G., Y. Isnaini, J. Situmorang, dan M.I.J. Umboh. 1998.** Cendawan yang berasosiasi dengan gaharu (*Aquilaria* spp.) dari Indonesia. *Dalam* Prosiding Seminar Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia. Universitas Lampung, 14-15 Desember 1998. PERMI cabang Lampung. hlm. 385-393.
- Rahmawati, D., Y. Isnaini, and N. Toruan-Mathius. 2006.** Karakteristik morfologi dan identifikasi berdasarkan 18S rDNA beberapa isolat *Acremonium* spp. yang berasosiasi dengan tanaman gaharu. Disampaikan pada seminar Bioteknologi LIPI, 15-16 November 2006.
- Razali, N.T.M., S.R. Ahmad-Ali, and A. Hamzah. 2007.** PCR-DGGE for analysis of fungal population under oil palm *Elaeis guineensis* (Jacq). *Proc. of Agriculture, Biotechnology and Sustainability Conf. PIPOC* 2:788-798.
- Rohlf, F.J. 1993.** NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.8. Exeter Software, New York. p. 10-13.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Teixeira, Hudson, Vieira, G.C. Maria das Graças, and C.J. Machado. 2004.** RAPD markers in the genetic diversity analysis of *Acremonium strictum* isolates. *Fitopatol. Bras.* 29(6):651-655.
- Umboh, M.I.J., G. Rahayu, H. Affandy, J. Situmorang, Y. Isnaeni, and A. Nuryadin. 1998.** The effort to increase agarwood production: Micropropagation of *Aquilaria* spp. and effort to increase it's agarwood. (Progress Report).
- Umboh, M.I.J., G. Rahayu, and H. Affandi. 2000.** Upaya peningkatan produksi gubal gaharu: Mikropropagasi *Aquilaria* spesies dan upaya peningkatan bioproses gubal gaharunya . Laporan Akhir Penelitian RUT V. Menristek-DRN. Jakarta.
- Vicente, M.J., D. Cifuentes, J.L. Cenis, and P. Abad. 1999.** RAPD-PCR polymorphism and vegetative compatibility group variation in Spanish isolates of *Acremonium cucurbitacearum*. *Mycolol. Res. Cambridge University Press* 103:1173-1178.
-