

Karakteristik Fragmen rDNA *Phytophthora* sp. dari Buah Kakao Berdasarkan Kemiripan Sekuen DNA dan Situs Pemotongan Enzim Restriksi

Muzuni,¹ Asniah²

¹ Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo, Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 16232, Indonesia

² Jurusan Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Halu Oleo, Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 16232, Indonesia

muzuni71@yahoo.co.id

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik fragmen rDNA *Phytophthora* sp. dari buah kakao berdasarkan kemiripan sekuen DNA dan situs pemotongan enzim restriksinya. Karakterisasi fragmen rDNA *Phytophthora* sp. dilakukan dengan mengamplifikasi fragmen rDNA menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reactions*) dengan primer spesifik *Phytophthora* (*Phy-F* dan *Phy-R*) yang dapat mengamplifikasi sekuen ITS 1, 5.8S rRNA, dan ITS2. Fragmen rDNA tersebut selanjutnya diurutkan nukleotidanya dan dianalisis menggunakan: program BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) untuk mengetahui kemiripannya dengan DNA lain, dan program BioEdit untuk mengetahui situs-situs pemotongan enzim restriksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fragmen rDNA yang dihasilkan berukuran 787 pb; memiliki kemiripan sebesar 99% dengan *Phytophthora palmivora*; dan tidak memiliki situs pemotongan enzim restriksi berupa *AflI*, *EcoRV*, dan *MfeI* sehingga dapat digunakan sebagai penciri *Phytophthora palmivora* dibanding dengan *Phytophthora* lainnya. Berdasarkan hasil karakterisasi menunjukkan bahwa primer *Phy-F* dan *Phy-R* dapat digunakan untuk mengamplifikasi fragmen rDNA *Phytophthora palmivora*.

Kata Kunci: *Phytophthora palmivora*, fragmen rDNA, PCR

Pendahuluan

Tanaman kakao (*Theobroma cacao*, L.) merupakan tanaman tropis, dikenal masyarakat Indonesia pertama kali tahun 1780 (Spilane, 1995), dan termasuk

.....
F. D. Tuheteru, Husna, A. Arif, & Albasri (Editor). (2021). *Prosiding Seminar Nasional Mikoriza: Mikoriza untuk Pembangunan Pertanian dan Kehutanan Berkelanjutan, Kendari 10 Agustus 2018*. UHO EduPress.

komoditas ekspor andalan penyumbang devisa bagi negara, penyedia lapangan kerja, serta merupakan mata pencaharian masyarakat Indonesia (Sulistiyowati dkk., 2003), Selain itu kakao dibutuhkan sebagai bahan baku industri makanan dan minuman, industri farmasi, industri kosmetika (Wahyudi dkk., 2008).

Tahun 2014, produksi kakao di Sulawesi Tenggara hanya sebanyak 125.079 ton, dan mengalami penurunan pada tahun 2015 dengan memproduksi kakao sebanyak 105.434 ton dengan luas lahan perkebunan kakao mencapai 29.880 ha. Penurunan produksi ini disebabkan oleh menurunnya produksi kakao di sentral-sentral penghasil kakao, termasuk di Kabupaten Konawe. Kabupaten Konawe hanya memproduksi kakao sebanyak 7.877 ton pada tahun 2014, padahal potensinya dapat mencapai 14.514 ton. Hal ini disebabkan oleh lahan perkebunan kakao yang mencapai 1.893 ha tidak produktif (Nasir, 2015). Namun, pada tahun 2016 produksi kakao di Sulawesi Tenggara mengalami peningkatan sebesar 120.421 ton (Suwandi, 2016).

Penurunan produksi kakao di Kabupaten Konawe disebabkan oleh adanya serangan jamur *Phytophthora* yang merupakan kelompok Oomycetes. Serangan *Phytophthora* tersebut mengakibatkan kerugian dan penurunan produksi tanaman kakao berkisar antara 10 sampai 30% di seluruh dunia, dan kerugian yang jauh lebih tinggi terjadi di daerah endemis, terutama di daerah basah pada musim hujan (McMahon & Purwantara, 2004).

Jenis *Phytophthora* yang menyerang buah kakao setiap daerah di Indonesia, telah diketahui identitasnya berdasarkan penelitian sebelumnya. Menurut Purwantara dan Prawirosoemardjo (2006), spesies *Phytophthora* yang menyebabkan penyakit pada kakao di daerah Provinsi Sulawesi Tenggara khususnya di Kabupaten Kolaka adalah *Phytophthora palmivora*. Namun, jenis *Phytophthora* yang menyerang tanaman kakao di Kabupaten Konawe belum diketahui secara pasti. Sehingga perlu adanya identifikasi lebih lanjut baik secara morfologi maupun molekuler. Identifikasi morfologi dilakukan untuk mempelajari struktur bagian luar tubuh mikroorganisme, namun demikian, identifikasi morfologi dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sehingga terkadang memberikan hasil yang keliru. Sifat morfologi yang digunakan untuk identifikasi adalah tipe koloni, bentuk hifa, produksi dan diameter klamidospora, dan percabangan sporangiofor (Waterhouse, 1974). Namun, karakter ini sering bersifat subyektif dan sangat ditentukan oleh pengetahuan dan pengalaman karena beberapa karakter saling tumpang tindih di antara

spesies dan variasi yang sangat nyata di antara isolat dalam spesies yang sama (Mangindaan dkk., 1992).

Oleh karena itu, perlu adanya pendekatan secara molekuler untuk menghasilkan informasi dengan akurat, ketetapan yang lebih tinggi dan waktu yang digunakan relatif cepat. Salah satu teknik analisis DNA yang digunakan untuk mengetahui variasi di dalam dan di antara spesies *Phytophthora* yakni analisis ruas DNA-ITS (*internal transcribed spacer*) dari RNA ribosom untuk mendeterminasi keragaman di dalam spesies *Phytophthora* (Cooke dkk., 1996) dan perbedaan runutan DNA telah digunakan untuk membedakan antara spesies *Phytophthora*. Oleh karena itu, kajian mengenai karakteristik fragmen rDNA *Phytophthora* sp. dari buah kakao berdasarkan kemiripan sekuen DNA dan situs pemotongan enzim restriksinya perlu dilakukan. Bila kemiripan fragmen rDNA yang diperoleh dengan teknik PCR mencapai 99% dibandingkan fragmen DNA yang ada di GeneBank, maka organisme sumber DNA tersebut adalah satu spesies. Primer yang digunakan dalam PCR dapat digunakan untuk mendeteksi spesies target. Demikian pula, jika situs pemotongan enzim restriksi tidak ada organisme target, namun ada pada organisme lain dalam satu genus, maka ketidakadaan situs tersebut merupakan salah satu penciri organisme target.

Metode Penelitian

Pengambilan Sampel

Proses pengambilan sampel dilakukan di Kabupaten Konawe Sulawesi Tenggara, Desa Olo-Oloho, Kecamatan Uepai. Pengambilan buah kakao yang terserang *Phytophthora* sp. dengan cara mengambil buah yang busuk secara acak kemudian sampel di bawah ke laboratorium untuk dikultur dan diisolasi DNANYa.

Pembuatan Media dan Kultur *Phytophthora* sp.

Media yang digunakan untuk peremajaan isolat *Phytophthora* sp., adalah Media V4 (*Vegetable Juice*). Komposisi media V4 yaitu Agar 20 g, Ekstrak V4 200 g (*Daun seledri, Tomat, Bayam dan Wortel*), CaCO_3 3g, dan akuades 800 mL (Banasuru, 2015), kemudian dipanaskan dengan *Hot plate*, dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*, dan disterilisasi dengan *autoklaf* sebagai pertumbuhan

media padat, sedangkan media yang tanpa penambahan agar digunakan sebagai media pertumbuhan cair. Isolat *Phytophthora* sp. yang telah diisolasi dari sampel buah kakao diambil dengan menggunakan ose pada bagian miseliumnya, lalu diinokulasi pada Erlenmeyer 100 mL yang berisi media V4 cair. Selanjutnya isolat diinkubasi dengan suhu 27° C selama 5 hari.

Isolasi DNA Genom *Phytophthora* sp.

Isolasi DNA genom *Phytophthora* sp. dengan menggunakan metode *Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide* (CTAB) yang telah dimodifikasi (Muzuni, 2014). Sebanyak 0.2 gram miselium *Phytophthora* sp., digerus menggunakan lumpang dan alu kemudian dimasukkan ke dalam *epENDORF* 1.5 ml. Sampel ditambahkan dengan 600 µl *buffer* lisis dan larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 65°C sambil dibolak-balik setiap 5 menit. Sampel diinkubasi ke dalam es selama 5 menit lalu disentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan dengan 1x Volume *Fenol Clorofom* (PC). Selanjutnya sampel disentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan dengan 0,1 volume sodium asetat 3 M pH 5,2 kemudian ditambahkan dengan 2x volume etanol 100% lalu diinkubasi pada suhu -20°C selama 2 jam dan disentrifugasi 10.000 rpm, suhu 4°C, selama 20 menit. Selanjutnya pelet DNA dicuci dengan 0,5 ml etanol 70%, lalu dikeringkan dan dilarutkan dalam 20 µl H₂O.

Desain Primer

Sekuen daerah rDNA dari beberapa spesies dari genus *Phytophthora* dikumpulkan dari bank data gen (*Genebank*) pada situs <http://www.ncbi.nlm.gov> dan disejajarkan menggunakan program BioEdit. Bagian yang mempunyai homologi tinggi di sekitar ujung 5' dan ujung 3' masing-masing digunakan sebagai *Forward* dan *Reverse Primer*. Primer spesifik yang digunakan dalam penelitian ini didesain dari bagian ujung 3' gen penyandi 18S rRNA hingga bagian ujung 5' gen penyandi 28S rRNA (Gambar 1).



Gambar 1. Struktur rDNA dan bagian yang diamplifikasi dalam proses PCR

Amplifikasi Fragmen rDNA dengan Teknik PCR

Fragmen rDNA *Phytophthora* sp., diamplifikasi dengan teknik PCR. Volume total PCR sebanyak 10 µl yang terdiri atas DNA genom/*template* (100 ng) sebanyak 1 µl (10µM), primer *Phy-F* dan *Phy-R* masing-masing 0.5 µl, 2x *master mix* 5 µl dan dH₂O sebanyak 3 µl. Program PCR terdiri atas pre-PCR pada suhu 94°C selama 5 menit; proses PCR sebanyak 35 siklus yang meliputi denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) 59°C selama 30 detik, pemanjangan rantai 72°C selama 90 detik dan post-PCR pada suhu 72°C selama 5 menit.

Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

Elektroforesis. Sebanyak 3 µL DNA dielektroforesis menggunakan gel agarose 1% pada arus 1A dan tegangan 80 volt selama 30 menit. Setelah elektroforesis, gel agarose direndam di dalam larutan etidium bromida selama 5 menit, lalu direndam dalam larutan akuades selama 5 menit. Visualisasi DNA menggunakan UV transluminator dan difoto menggunakan Photophoresis. DNA yang berkualitas baik jika pita DNA terkonsentrasi sedikit di bawah sumur.

Spektrofotometer. DNA dengan volume 5 µL dilarutkan ke dalam 995 µL akuades dengan menggunakan kuvet. Suspensi dihitung jumlah absorbansinya pada gelombang 260 nm dan gelombang 280 nm. Nilai perbandingan antara 1,8–2,0 menunjukkan kemurnian DNA yang tinggi. Nilai perbandingan di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi dari senyawa dengan berat molekul besar seperti protein, sedangkan di atas 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi berupa senyawa dengan berat molekul kecil seperti RNA (Farrel, 1993). Konsentrasi DNA dapat dihitung dengan rumus:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \text{FP}$$

Keterangan:

[DNA] : Konsentrasi DNA

A₂₆₀ : Nilai absorbansi panjang gelombang 260 nm

50µg/mL : Konstanta DNA

FP : Faktor Pengenceran

Pengurutan DNA

Pengurutan DNA dilakukan dengan menggunakan alat DNA *sekuencer* *ABI Prism 377*. Pengurutan DNA dilakukan dengan 1 sampel DNA yang

dikombinasikan dengan *primer forward* dan *primer reverse*. Pengurutan dilakukan dengan metode Sanger, menggunakan *terminator dye* berupa *fluorescent dye rhodamin (PRISM reaction dyedoaxy terminator cycle sekuencing kit)*. Setelah mendapatkan hasil pengurutan, urutan kemudian disejajarkan dengan menggunakan program NCBI BLAST.

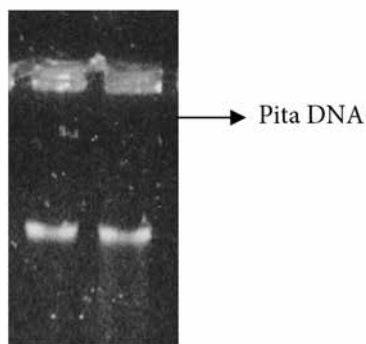
Analisis Data

Identifikasi urutan nukleotida dilakukan dengan beberapa analisis. Analisis kesejajaran lokal (*local alignment*) hasil pengurutan DNA dengan data yang ada di *Genebank* dilakukan dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) yang disediakan NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) melalui www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Aplikasi *BioEdit* untuk menganalisis menganalisis situs enzim restriksi. Setelah serangkain prosedur tersebut dilakukan maka organisme yang dianalisis dapat ditentukan jenisnya.

Hasil dan Pembahasan

Kuantitas dan kualitas DNA genom

Kualitas dan kuantitas hasil isolasi DNA genom dapat diketahui dengan pengujian menggunakan metode elektroforesis dan spektrofotometri. Hasil isolasi DNA menunjukkan kualitas yang sangat baik karena tidak terdapatnya pola *smear* pada DNA hasil isolasi (Gambar 2). Menurut Evan & Priori (1987) menyatakan bahwa kualitas DNA yang baik dan tidak terdegradasi pada hasil elektroforesis tidak memperlihatkan pola pita yang *smear*.

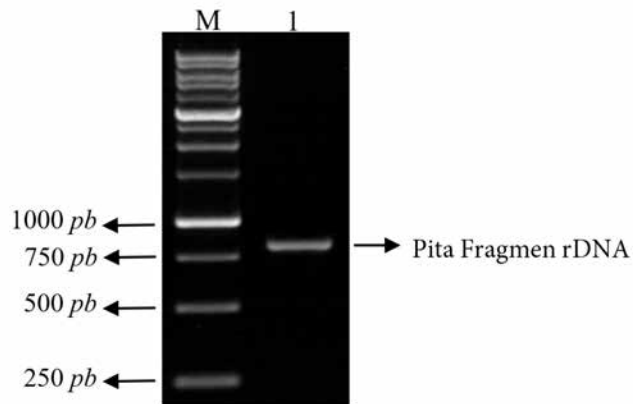


Gambar 2. Hasil elektroforesis isolasi DNA genom *Phytophthora* sp.

Pengukuran kemurnian DNA genom dapat dihitung menggunakan *spektrofotometer* dengan panjang gelombang λ 260 nm dan λ 280 nm. DNA dikatakan murni jika memiliki nilai rasio absorbansi pada λ 260 nm dan λ 280 nm antara 1,8–2,0. Nilai rasio yang lebih besar dari 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi RNA, sedangkan nilai rasio yang kurang dari 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi protein/fenol di dalam larutan DNA (Sulandri & Zein, 2003). Hasil pengukuran DNA hasil isolasi menunjukkan hasil yang murni karena mempunyai nilai rasio absorbansi 1,8. Hasil isolasi juga menunjukkan kuantitas yang baik, yaitu 1.630 ng/ μ l (Data tidak ditunjukkan).

Amplifikasi Fragmen rDNA *Phytophthora* sp.

Hasil amplifikasi fragmen rDNA dari DNA genom *Phytophthora* sp. memperlihatkan pita tebal dan tegas serta membentuk pita tunggal (*single band*) yang berukuran sekitar 750 pb (Gambar 3).



Gambar 3 Hasil elektroforesis amplifikasi fragmen rDNA isolat *Phytophthora* sp. menggunakan primer *Phy-F* dan *Phy-R* pada gel *agarose* 1% (1). *Marker* 1 kb (M).

Menurut Settani, dkk. (2006) suatu sampel DNA dikatakan spesifik dan berhasil diamplifikasi apabila hasil analisis elektroforesis menunjukkan terdapatnya pita tunggal DNA dengan ukuran sesuai berdasarkan penanda yang telah diketahui sebelumnya. Keberhasilan proses amplifikasi DNA dengan teknik PCR di pengaruhi oleh beberapa faktor yakni kualitas DNA, pemilihan primer, kondisi PCR, siklus PCR dan komposisi reagen PCR (Settani, 2006; Fatchiyah dkk., 2013).

Pengurutan Fragmen rDNA Isolat *Phytophthora* sp.

Hasil pengurutan DNA menunjukkan bahwa nukleotida yang berhasil diamplifikasi oleh primer *Phy-F* dan *Phy-R* terdiri atas bagian 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, dan bagian 28S rRNA. Fragmen rDNA yang diperoleh ukuran 787 pb dengan urutan seperti ditunjukkan pada Gambar 4.

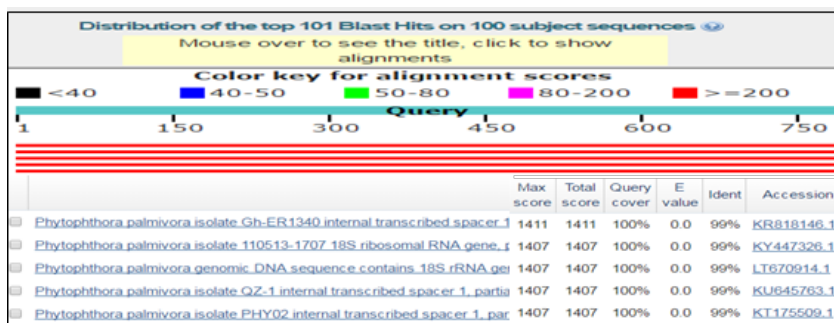
```

1  cCACAcCTAaAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAAAACTTAGTTGGGGTCTCTTTCGG 60
61  CGGGCGGCTGCTGGCTTCATTGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATGGCGAGCG 120
121 TTTGGGCTTCGGTCTGAACTAGTAGCTTTTTTAAACCCATTCTTTATAACTGATTATACT 180
181 GTAGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGC 240
241 TCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGT 300
301 GAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACCTCCGGGTTAGTCTGGGAGTATGCCTGT 360
361 ATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGTTTTCTTCCTCCGTGTAGTCCGGTGGTGGATGTGC 420
421 CAGATGTGAAGTGTCTTTCGGCTGGCTTTCGGATCGGCTGTGAGTCCCTTGAATGTACT 480
481 GAACTGTACTTCTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGCTGATTGTGAGGCTGCTTTCGCT 540
541 AGCCAGTCTGGCGACCAAGTTTGTCTGCTGTGGCGTTAATGGAGGAGTGTTCGATTCCGGG 600
601 TATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGACGCTTATTGAATATTCTTCAGCTGTGGTGGTATGA 660
661 TTGGTGAACCGTAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGA 720
721 GTGGCGGCTTCCGCTGTCGAGGGTCGATCCATTGGGAACTTGTGTATGCTTCGGCATGC 780
781 ATCTCAA
    
```

Gambar 4. Urutan fragmen rDNA *Phytophthora* sp.

Analisis BLAST Urutan Fragmen Isolat *Phytophthora* sp.

Analisis BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tools*) dilakukan dengan membandingkan data urutan nukleotida hasil PCR dengan sekuen nukleotida



Gambar 5. Hasil Analisis BLASTn urutan nukleotida produk PCR dengan urutan DNA yang ada pada *Genebank*.

yang terdapat pada *GeneBank*. Hasil analisis pensejajaran identitas sekuen disajikan pada Gambar 5.

Hasil analisis BLASTn memperlihatkan kemiripan 99% antara fragmen rDNA dengan *Phytophthora palmivora*, yang menunjukkan bahwa organisme sumber DNA merupakan spesies yang sama dengan *Phytophthora palmivora*. Identitas tersebut diperkuat oleh nilai *Query cover* sebesar 99% dengan nilai eror 0. Narita (2012) mengatakan bahwa suatu sekuen nukleotida dikatakan spesies yang sama apabila nilai *Query coverage* dan *Max identity* mendekati 100% dengan nilai eror mendekati 0. Kemiripan identitas tersebut terlihat dari besarnya nilai kesamaan urutan basa nukleotida yang dimiliki. Menurut Hall (2001), nilai *similarity* dapat ditentukan dari parameter *bit score* dan *identities*. Makin tinggi nilai *identities* makin menunjukkan kemiripan dengan sekuen acuan pada *Genebank*.

Tabel 1. Situs pemotongan enzim restriksi fragmen rDNA *Phytophthora* sp.

No.	Enzim Restriksi	Situs Pengenalan	Posisi				
			I	II	III	IV	V
1.	* <i>AflI</i>	C'TTAA_G	-	-	752	765	776
2.	** <i>BfrBI</i>	ATG'CAT	780	779	730	796	733
3.	** <i>Clal</i>	AT'CG_AT	249	248	279	265	302
5.	** <i>EcoICRI</i>	GAG'CTC	104	103	134	120	157
6.	* <i>EcoRV</i>	GAT'ATC	-	-	769	756	752
7.	* <i>MfeI</i>	CAATT_G	-	-	746	702	739
8.	** <i>PmlI</i>	CAC'GTG	22	22	53	39	76
9.	** <i>PsiI</i>	TTA'TAA	167	166	197	183	220
10.	** <i>PvuII</i>	CAG'CTG	647	646	677	663	700
11.	** <i>SnaBI</i>	TAC'GTA	277	276	307	293	330
12.	** <i>SpeI</i>	A'CTAG_T	139	138	169	155	192
13.	** <i>SspI</i>	AAT'ATT	637	636	667	653	690

Keterangan: ** = Enzim restriksi yang dapat digunakan sebagai marka molekuler untuk semua jenis *Phytophthora*; * = Enzim restriksi penanda khusus *P. palmivora*; I = Hasil isolasi *Phytophthora* sp.; II = *P. palmivora* isolat Gh-ER1340; III = *P. megasperma* isolat P93 (B9A); IV = *P. tropicalis* isolat H 778-1; V = *P. ramorum* isolat 110513-1707.

Pemetaan Enzim Restriksi

Enzim restriksi merupakan enzim yang dapat memotong fragmen DNA pada urutan nukleotida tertentu yang dikenalnya. Analisis situs pemotongan

enzim restriksi digunakan untuk mengetahui polimorfisme suatu organisme berdasarkan jenis, situs dan pola yang dihasilkan oleh enzim restriksi. Analisis enzim restriksi menggunakan program BioEdit pada fragmen ITS rDNA *Phytophthora* sp. dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil analisis dengan menggunakan program BioEdit memperlihatkan sekuen *Phytophthora* sp., memiliki 13 situs pemotongan enzim restriksi. Situs pemotongan enzim restriksi pada fragmen rDNA *Phytophthora* sp. terdiri atas *BfrBI*, *ClaI*, *EcoICRI*, *PmlI*, *PsiI*, *PvuII*, *SnaBI*, dan *SpeI* dapat digunakan sebagai marka molekuler dalam identifikasi semua jenis *Phytophthora* (Tabel 1). Sekuen *Phytophthora* sp., memiliki situs enzim restriksi yang sama dengan enzim restriksi yang dimiliki oleh *Phytophthora palmivora* Gh-ER1340 berupa *AflI*, *EcoRV*, dan *MfeI*. Hal ini menunjukkan bahwa isolat yang di miliki merupakan spesies *Phytophthora palmivora*.

Daftar Pustaka

- Banasuru G. 2015. Isolasi dan Karakterisai Morfologi *Phytophthora Palmivora* pada Buah Kakao pada Perkebunan Kakao di Konawe Selatan, Sulawesi Tenggara. Skripsi (tidak dipublikasikan). Fakultas Pertanian. Jurusan Agroteknologi. UHO. Kendari.
- Cooke D, Kennedy DM, Guy DC, Russell J, Unkle SE, dan Duncan JM. 1996. Relatedness Of Group I Species Of *Phytophthora* As Assed By Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Sekuences Of Ribosomal DNA. *Mycological Research*. **100**: 297–303.
- Evan HC & Priori C. 1987. Cocoa Pod Diseases. Causal Agents And Control. *Outlook On Agricul*. **16**: 35–41.
- Farrel RE. 1993. RNA Methodologies, A Laboratory Guide For Isolation And Characterization. New York: Academic Press, Inc.

- Fatchiyah, Arumingtyas EL, Widyarti S, dan Rahayu S. 2013. Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Hall BG. 2001. Phylogenetic trees made easy: A how-to manual for molecular biologists. Sunderland, Mass: Sinauer.
- Mangindaan HF, Thevenin JM, Kharie S, dan Motulo HF. 1992. The Susceptibility Of Coconut Varieties To *Phytophthora* In Indonesia: The Effect Of Environmental Factors. Coconut *Phytophthora* Workshop Proc. Manado 26–30 October 1992.
- McMahon P, dan Purwantara A. 2004. Phytophthora on cocoa. In Drenth A. & D. I. Guest (eds.). Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia. ACIAR Monograph No. 114, p.104–115
- Muzuni, Dwi AD, Satriani S. 2014. Karakterisasi Fragmen Gen 18S rRNA Pokea (*Batissa violacea celebensis* Martens, 1987) di Sungai Pohara Kecamatan Sampara, Kabupaten Konawe. *Jurnal Biowallacea* **1**(1): 25–38.
- Nasir G. 2015. Statistik Perkebunan Indonesia Komoditas Kakao, 2014–2016. Direktorat Perkebunan Jakarta.
- Narita V, Arum AL, Isnaeni SM, dan Fawzuya NY. 2012. Analisis Bioinformatika Berbasis WEB untuk Eksplorasi Enzim Kitonase Berdasarkan Kemiripan Sekuens. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*, **1**(4): 197–203.
- Purwantara A. dan Prawirosoemardjo. 2006. *Fluktuasi Intensitas Serangan Terhadap Phytophthora palmivora* Butl. pada Buah Kakao di Daerah Beriklim Basah. *Menara Perkebunan* **58**: 44–50.
- Settani I, Valmori S, Sinderen DW, Suzzi G, Papparela A, and Corsetti A. 2006. Combination of Multiplex PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sougdough-associated *Lactobacillus* species. *J. Appl and Env. Mic.* **72**(5): 3793–3796.
- Spilane JJ. 1995. Komoditi Kakao Peranannya dalam Perekonomian Indonesia. Yogyakarta, Kanisius.
- Sulandari S, & Zein MSA. 2003. Panduan Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi LIPI. Bogor.
- Sulistiowati E, Yohanes DJ, Sri S, Sukadar W, Loso W dan Nova P. 2003. Risalah Simposium Nasional Penelitian PHT Perkebunan Rakyat. Analisis Status Penelitian dan Pengembangan PHT pada Tanaman Kakao. Bogor.
- Suwandi, Nuryati L, dan Yasin A. 2016. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian 2016, Jakarta.
- Wahyudi T, Pujiyanto, dan Panggabean TR. 2008. Panduan Lengkap Kakao: Manajemen Agribisnis dari Hulu Hingga Hilir, Penebar Swadaya, Jakarta.

Waterhouse GM. 1974. *Phytophthora palmivora* and Some Related Species. In Gregory P. H. (Ed.). *Phytophthora Disease of Cocoa*. London, Longman. 51-70.