

KERAGAMAN 17 AKSESI PLASMA NUTFAH KAKAO BERDASARKAN PENANDA MORFOLOGI DAN MOLEKULER

VARIATION OF 17 COCOA ACCESSIONS GERMPLASM BASED ON MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR MARKER

Syafaruddin¹⁾ dan M. A. Nasution²⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar
Jalan Raya Pakuwon km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357

den_ovan@yahoo.com

²⁾Universitas “45” Makassar

Jln. Urip Sumoharjo KM. 4, Makassar

Telp. +62-411-452901, 452789 Fax. +62-411-424568

(Tanggal diterima: 28 Mei 2012, direvisi: 18 Juni 2012, disetujui terbit: 25 Juni 2012)

ABSTRAK

Kakao merupakan tanaman potensial, informasi lengkap termasuk molekuler sangat diperlukan untuk pengembangan ragam selanjutnya. Tujuan penelitian adalah mengevaluasi keragaman genetik, hubungan kekerabatan dan identifikasi kultivar tanaman kakao baik secara morfologi maupun molekuler. Penelitian dilaksanakan di lapangan, yaitu di Kabupaten Pinrang dan Luwu Provinsi Sulawesi Selatan, serta di Laboratorium Biologi Molekuler, BB-Biogen, Bogor. Penelitian dimulai Maret sampai Desember 2011. Bahan tanaman yang digunakan 17 akses kakao. Selain pengamatan karakteristik morfologi, dilakukan juga analisa molekuler dengan beberapa tahapan: Isolasi DNA mengikuti metode CTAB Doyle dan Doyle, pemurnian DNA mengikuti metode Sambrook dan Russel, penetapan kualitas DNA, dan Reaksi amplifikasi dan elektroforesis mengikuti metode Williams. Sedangkan untuk uji similaritas digunakan software N-Tsys. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 46 pola pita yang dihasilkan oleh 8 primer diperoleh 36 pita polimorfisme (78%) dan 10 pita monomorfik. Analisis kluster terhadap 14 karakter utama morfologi tanaman kakao menghasilkan dendrogram dengan koefisien kemiripan berkisar antara 65-98% atau terdapat keragaman genetik sebesar 2-35%. Sedangkan analisis kluster terhadap 46 pola pita DNA menghasilkan dendrogram dengan koefisien kemiripan berkisar antara 64-91% atau terdapat keragaman genetik sebesar 9-36%. Hasil analisis secara morfologi maupun molekuler, keduanya menunjukkan variasi yang sempit.

Kata Kunci: Kakao, keragaman, morfologi, molekuler

ABSTRACT

Cocoa is one of other important crops of Indonesia. Comprehensive information of cocoa is therefore needed, including molecular information for crop improvement. The purpose of this experiment was to find out information of genetic variation, genetic relationship and cultivar identification of cocoa by using morphology character and molecular analysis. The experiment was conducted at field in South Sulawesi and Molecular Biology Laboratory of BB-Biogen, Bogor since March till December 2011. Genetic material used were 17 accessions of cocoa, and other material were chemical substances. Besides morphological characteristics, molecular markers were also analyzed by using several steps: DNA isolation uses CTAB methods by Doyle and Doyle, DNA purification uses Sambrook and Russel methods, and amplification and electrophoresis reaction uses Williams methods. Whereas genetically similarity were analyzed by using N-Tsys. Result showed that of 46 band patterns of DNA is resulted from 8 primers yielded of 36 band patterns of polymorphism (78%) and 10 band patterns of monomorphism. Based on the cluster analysis of 14 main morphological characters, it was obtained a dendrogram with similarity coefficient about 65-98% or genetic variation about 2-35%. While cluster analysis to 46 band patterns of DNA was obtained a dendrogram with similarity coefficient about 64-91% or genetic variation about 9-36%. Based on morphological and genetic characters, both the results show narrow variation.

Keywords: Cocoa, variation, morphology, molecular

PENDAHULUAN

Dalam program pemuliaan secara konvensional, strategi untuk evaluasi keragaman genetik dapat dilakukan melalui pendekatan anatomi, morfologi dan fisiologi (Mahapetra *et al.*, 1995). Penggunaan karakter morfologi dalam tahap pengamatan kurang akurat, karena dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Demikian pula penggunaan kriteria agronomi yang berhubungan dengan komponen produksi dan produksi mempunyai kendala yang berhubungan dengan umur tanaman. Sebagai tanaman tahunan (*perennial*), kegiatan seleksi hingga diperoleh kakao unggul diperlukan waktu lama.

Saat ini pendekatan tersebut telah dilengkapi dengan teknik molekuler, sehingga memungkinkan diperolehnya suatu marka gen yang mengendalikan karakter target dengan cepat dan akurat. Hal ini sangat membantu efektifitas maupun efisiensi dari pelaksanaan proses seleksi yang akan dilakukan dalam program pemuliaan tanaman (Gupta *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2005; dan Richards, 2006). Seperti yang telah dikatakan oleh Weising *et al.* (1995) dan Cao *et al.* (2003) bahwa perkembangan marka molekuler telah terbukti dapat memfasilitasi penelitian dalam bidang ilmu seperti taksonomi, ekologi, genetika dan pemuliaan tanaman. Seleksi tingkat molekuler telah banyak dilakukan, di antaranya oleh Arus dan Morino-Gonzales (1993).

Pemanfaatan plasma nutfah dalam rangka perbaikan sifat-sifat agronomi dari aksesi-aksesi terpilih harus didasarkan pada determinasi genetik yang lebih akurat sehingga penentuan individu tanaman sebagai material dalam perbaikan genetik dapat dilakukan dengan tepat (Mohanty *et al.*, 2004; Ebbs dan Bender, 2006; Law dan Jacobsen, 2010). Penemuan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan otomatisasi peralatannya telah memberikan sumbangan yang besar dalam memacu perkembangan bidang biologi molekuler dan genetika (Chan *et al.*, 2004).

Peneliti bidang genetika dan biologi molekuler banyak menggunakan teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) karena beberapa alasan yaitu, (1) tidak perlu mengetahui latar belakang genom yang diteliti, (2) pelaksanaannya lebih cepat dan sederhana

dibandingkan teknik lain, seperti RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), dan (3) dapat digunakan untuk analisis genomik hampir pada semua organisme (Welsh dan McCleand, 1990; William *et al.*, 1990; Ni *et al.*, 2001; dan Modgil *et al.*, 2005). Penggunaan penanda RAPD memperlihatkan keragaman yang lebih tinggi dibandingkan isozim dan RFLP (Liu dan Furnier, 1993). Namun teknik ini juga masih memiliki kekurangan yakni tidak mampu mengidentifikasi heterozigot (Waugh, 1997).

Pada tanaman tahunan, teknik RAPD dapat digunakan untuk meningkatkan efisiensi seleksi awal. Selanjutnya banyak peneliti menggunakan teknik ini untuk studi genetika termasuk keragaman genetik (Tingey *et al.*, 1992; dan Alleman *et al.*, 2006). Oleh karena itu, analisis keragaman genetik dengan teknik RAPD cukup berpotensi karena selain memiliki kelebihan tersebut di atas juga mampu menghasilkan karakter yang tidak terbatas jumlahnya. Beberapa contoh penelitian tentang analisis keragaman genetik dengan menggunakan RAPD telah dilakukan oleh Welsh dan Mc Clelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Nayak *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2007; Ardiana, 2009; Randriani *et al.*, 2011; Syafaruddin *et al.*, 2011; Syafaruddin dan Santoso, 2011; dan Syafaruddin dan Tresniawati, 2011).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi keragaman genetik, hubungan kekerabatan dan identifikasi kultivar tanaman kakao baik secara morfologi maupun molekuler.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di sentra tanaman kakao kabupaten Pinrang dan Luwu Provinsi Sulawesi Selatan, serta di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor. Penelitian ini berlangsung mulai Maret sampai Desember 2011. Bahan tanaman yang digunakan adalah 17 aksesi kakao, yaitu M-01, AP, BT-6, M-04, BR-25, M-08, PBC, M-05, CCN-51, CCN-31, BB, M-06, SN, MY-03, SS-REWA, YM-01 (YM), dan ARDI.

Pengamatan morfologi dilakukan terhadap 14 karakter: 1) batang (tegak/ semi tegak/ terkulai), 2) bentuk daun (oval/ lonjong/ bulat/ bulatpanjang/ oblanceolate/ obovate), 3) bentuk pangkal (runcing/ bulat/ tumpul), 4) ujung daun (runcing/ ramping/ tumpul), 5) warna daun muda/ flush (merah/ kuning/ hijau), 6) ukuran buah (besar/ sedang/ kecil), 7) bentuk buah (bulat/ lonjong), 8) leher buah (jelas/ samar), 9) ujung buah (runcing/ tumpul), 10) permukaan buah (halus/ kasar), 11) kedalaman alur (dalam/ dangkal), 12) warna buah muda (merah/ hijau), 13) warna buah masak (kuning/ merah kekuningan/ hijau), dan 14) tingkat pembungaan (banyak/ sedang/ sedikit).

Kegiatan di laboratorium meliputi beberapa tahapan: (1) isolasi DNA mengikuti metode CTAB (Doyle dan Doyle, 1987), (2) pemurnian DNA mengikuti metode Sambrook dan Russel (1989), (3) penetapan kualitas DNA, dan (4) reaksi amplifikasi dan elektroforesis mengikuti metode Williams *et al.* (1990).

Data hasil pengamatan morfologi dan molekuler di uji similaritas dengan menggunakan *software* NTSYS-pc versi 2.02 dan MINITAB Release 14. Sebelum data morfologi dan data RAPD dianalisis, terlebih dahulu data tersebut diskor dengan nilai nol (0) jika tidak ada, dan nilai satu (1) jika ada pada karakter morfologi yang sama, sedangkan profil pita DNA hasil RAPD diskor nilai nol (0) jika tidak ada pita, dan satu (1) jika ada pita pada tingkat migrasi yang sama. Selanjutnya dilakukan analisis similaritas berdasarkan rumus Nei dan Li (1979), analisis pengelompokan menggunakan *Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested* (SAHN)-UPGMA (*Unweighted pair-group method, arithmetic average*) pada program NTSYS-pc

versi 2.02, dan hasil analisis ini disajikan dalam bentuk dendrogram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Polimorfisme RAPD

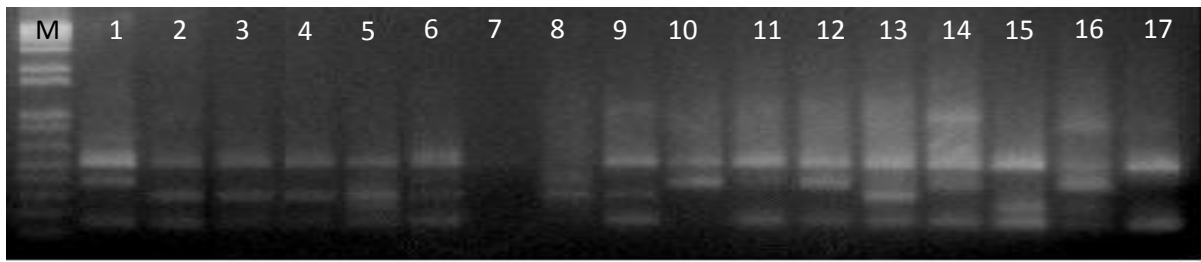
Tabel 1 menunjukkan hasil amplifikasi DNA yang dilakukan terhadap 17 aksesi kakao dengan menggunakan 8 primer RAPD yang telah diseleksi dari 20 primer yang dilakukan pengujian sebelumnya untuk melihat polimorfisme DNA terhadap *Theobroma cacao* L. Primer terseleksi ini merupakan primer dengan variasi yang luas dan sangat mewakili, yaitu OPD-08, OPE-01, OPN-06, OPB-04, OPN-20, OPG-16, OPG-18 dan OPU-06 yang menghasilkan total 46 pita, dengan ukuran fragmen DNA bervariasi. Hasil ini sesuai dengan pendapat yang dikemukakan oleh McPherson dan Longo (1992), Teulat *et al.* (2000), Kanno *et al.* (2005), dan Buisine *et al.* (2008), menyatakan bahwa ukuran fragmen DNA yang teramplifikasi tergantung daerah yang diapit oleh dua primer dalam arah bolak-balik.

Berdasarkan hasil amplifikasi, terlihat pola pita DNA terbagi dalam dua kelompok, yakni pita yang menunjukkan polimorfik dan pita monomorfik. Secara umum hasil amplifikasi dengan 8 primer ini sudah memperlihatkan polimorfisme DNA dengan 46 pita DNA. Primer yang menghasilkan jumlah pita terkecil adalah primer OPD-08 dan OPE-01, sedangkan yang terbanyak menghasilkan pita adalah primer OPN-20. Padmalatha dan Prasad (2006) menyatakan bahwa jumlah pita yang dihasilkan tergantung pada berapa banyak potongan DNA yang dihasilkan dari PCR.

Tabel 1. Primer RAPD yang digunakan untuk analisis keragaman kakao

Table 1. RAPD primers used for genetic variation analysis on cocoa

Penanda (50–30)	Variasi polimorfik pita DNA		
	Total	Polimorfik	% Polimorfik
OPD-08	3	2	66,67
OPE-01	3	3	100,00
OPN-06	5	5	100,00
OPB-04	6	6	100,00
OPN-20	10	6	60,00
OPG-16	4	1	25,00
OPG-18	8	7	87,50
OPU-06	7	6	85,71



M=Marker 1=M-01 2=AP 3=BT-6 4=M-04 5=BR-25 6=M-08 7=PBC 8=M-05 9=CCN-51 10=CCN-31 11=BB 12=M-06 13=SN 14=MY-03 15=SS-REWA 16=YM-01 17=ARDI

Gambar 1. Pola pita penanda RAPD yang dibangkitkan menggunakan primer OPU-06 pada 17 aksesii kakao
Figure 1. Band pattern of RAPD marker which is raising by using OPU-06 primer on 17 cocoa accessions

Tingkat polimorfisme primer yang digunakan adalah tinggi, terdapat tiga primer yang memiliki tingkat polimorfisme 100%. Dari 46 pola pita yang dihasilkan oleh 8 primer diperoleh 36 pita polimorfisme (78%) dan 10 pita monomorfik (36 : 10). Setiap primer menghasilkan 3-10 pita (rata-rata 5,75 pita setiap primer). Amplifikasi 8 klon kakao yang dilakukan Essy (2003) dengan menggunakan 19 primer acak menghasilkan 218 pita, dengan 179 pita polimorfik dan 39 pita monomorfik. Polimorfisme merupakan gambaran amplifikasi yang diperoleh dari perbedaan fragmen DNA yang bervariasi (McGregor *et al.*, 2000; Surzycki, 2000; dan Malone and Hannon, 2009). Contoh pola pita RAPD hasil amplifikasi primer OPU-06 menggunakan DNA dari 17 aksesii kakao dapat dilihat pada Gambar 1.

Primer yang tidak menghasilkan pita DNA mengindikasikan bahwa primer-primer tersebut tidak mempunyai homologi dengan DNA cetakan, karena terbentuknya fragmen pita DNA tergantung pada sekuen primer dan genotipe dari DNA cetakan. Perbedaan jumlah dan polimorfisme pita DNA yang dihasilkan dari setiap primer menggambarkan kompleksitas genom tanaman yang diamati. Pita RAPD merupakan hasil berpasangannya nukleotida primer dengan nukleotida genom tanaman, semakin banyak primer yang digunakan akan semakin terwakili bagian-bagian genom sehingga semakin tergambar keadaan genom tanaman sesungguhnya.

Polimorfisme yang dideteksi oleh RAPD pada prinsipnya merupakan hasil dari beberapa tipe peristiwa, yaitu: (1) insersi DNA di antara dua situs penempelan primer, (2) delesi pada bagian genom yang mengandung situs penempelan, dan (3) substitusi nukleotida pada situs penempelan primer

(Weising *et al.*, 1995). Insersi DNA yang berukuran besar di antara dua situs penempelan primer menyebabkan ketidakmampuan DNA polimerase untuk mensintesis DNA sehingga daerah tersebut tidak dapat diamplifikasi. Delesi pada genom yang mengandung situs penempelan menyebabkan primer tidak dapat menempel pada daerah tersebut sehingga daerah tersebut tidak dapat diamplifikasi. Delesi di antara dua situs penempelan menyebabkan perubahan panjang dan ukuran daerah yang diamplifikasi (Sahasrabudhe dan Deodhar, 2010).

Analisis Kluster Karakter Morfologi

Dari 17 aksesii terdapat 6 (enam) aksesii kakao dengan buah berwarna kuning ketika masak, yaitu aksesii M-01, M-04, BB, YM-01 (YM), SS-REWA, dan M-08, sedangkan 11 aksesii kakao berwarna merah kekuning-kuningan, yaitu M-05, M-06, PBC, BR-25, BTG, AP, SN, MY-03, ARDI, CCN-31 dan CCN-51.

Berdasarkan analisis kluster terhadap 14 karakter morfologi menghasilkan dendrogram dengan koefisien kemiripan 65-98% atau terdapat keragaman genetik 2-35% (Gambar 2). Pada koefisien kemiripan genetik (KKG) 65% atau jarak genetik 35% terbentuk dua kelompok. Kelompok pertama (I) pada koefisien kemiripan genetik (KKG) 70% atau jarak genetik 30%, terdapat enam aksesii, yaitu M-08, ARDI, CCN-51, CCN-31, SN dan M-05. Kelompok ini memiliki kesamaan karakter permukaan buah kasar, bentuk pangkal daun runcing, ujung daun ramping, dan warna buah kekuning-kuningan.

Kelompok dua (II) pada koefisien kemiripan genetik (KKG) 67% atau jarak genetik 33% terbentuk dua subkelompok. Subkelompok

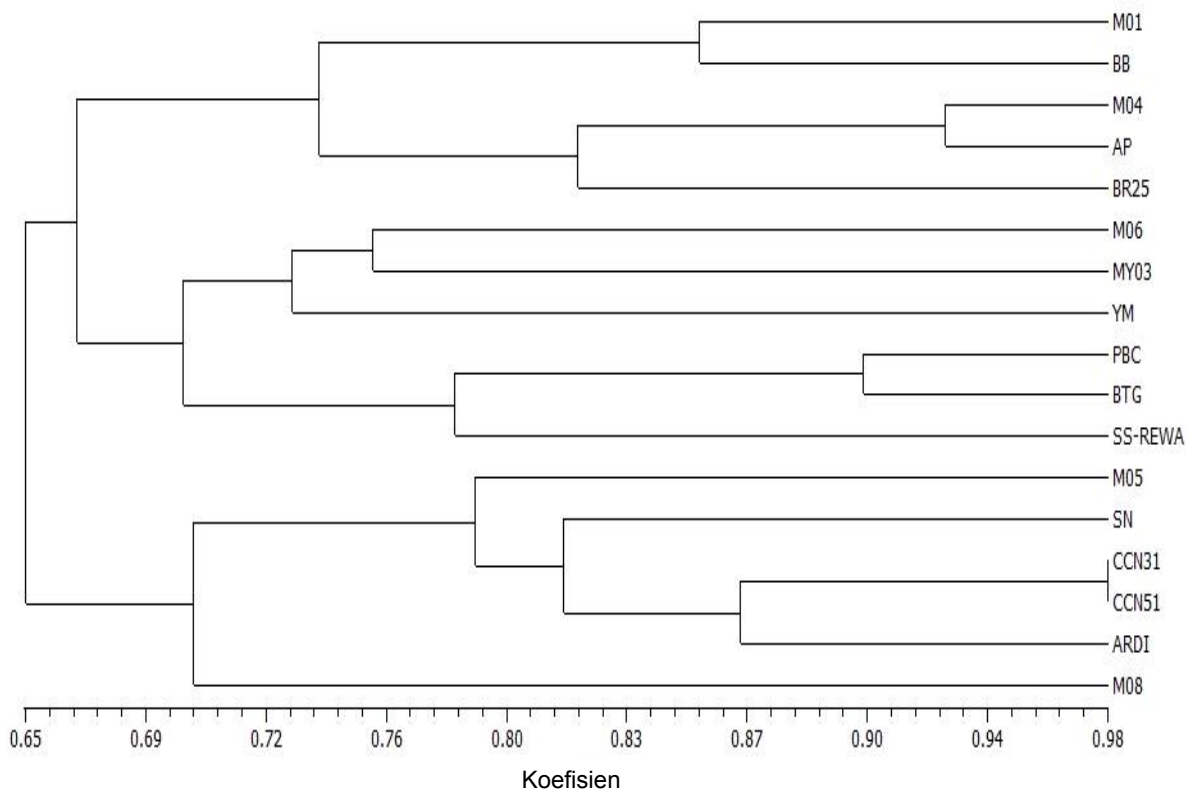
(a) dengan KKG 71% atau jarak genetik 29%, nampak bahwa aksesori SS-REWA, BTG, dan PBC memisah dari aksesori lainnya (YM-01 (YM), MY-03, dan M-06), sedangkan subkelompok (b) dengan KKG 74% atau jarak genetik 26% terlihat bahwa aksesori M-04 dan AP memisah dari aksesori M-01 dan BB. Pemisahan kelompok dua (II) menjadi dua subkelompok disebabkan perbedaan beberapa karakter yaitu permukaan buah, bentuk daun, dan warna daun muda (pucuk).

Analisis Kluster Pita DNA

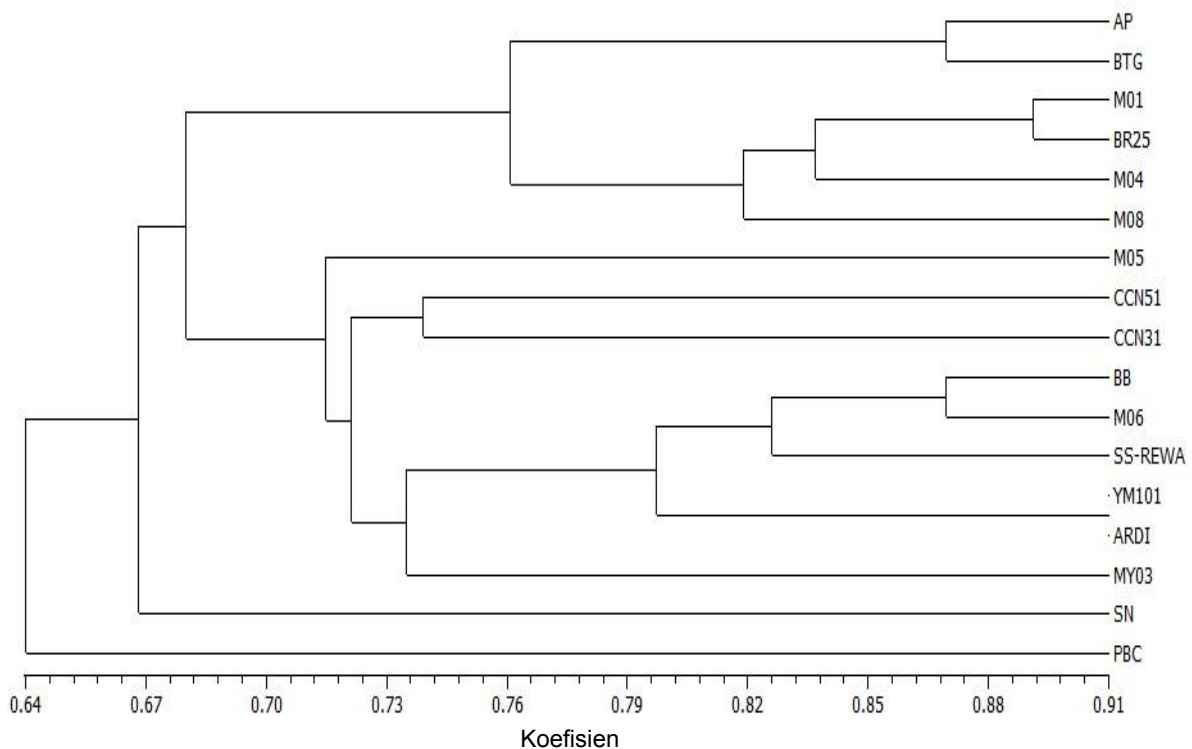
Analisis kluster terhadap 46 pola pita DNA menghasilkan dendrogram dengan koefisien kemiripan berkisar antara 64-91% atau terdapat keragaman genetik sebesar 9-36% (Gambar 3). Pada koefisien kemiripan genetik (KKG) 0,64 aksesori kakao terbentuk dua kelompok. Pada KKG

0,64 aksesori PBC memisah tersendiri dari aksesori lainnya.

Pada koefisien kemiripan genetik (KKG) 0,668 atau jarak genetik 33,20% terbentuk dua subkelompok. Subkelompok pertama (a) hanya terdapat satu aksesori, yaitu aksesori SN. Subkelompok dua (b) dengan KKG 68% atau jarak genetik 32%, nampak bahwa aksesori M-08, M-04, BR-25, M-01, BTG dan AP yang memiliki KKG 0,76 atau jarak genetik 24% memisah dari aksesori MY-03, ARDI, YM-01 (YM), SS-REWA, M-06, BB, CCN-31, CCN-51 dan M-05 yang memiliki KKG 0,72 atau jarak genetik 28%. Dari hasil analisis kedua karakteristik baik secara morfologi maupun molekuler, memperlihatkan kelompok besar dan subkelompok dalam setiap kelompok, tetapi keduanya menunjukkan variasi yang sempit baik kemiripan morfologi maupun kemiripan genetik.



Gambar 2. Dendrogram kemiripan morfologi hasil analisis kluster dengan metode pengelompokan UPGMA berdasarkan 14 karakter morfologi
Figure 2. Dendrogram of morphological similarity provided by cluster analysis of UPGMA method based on 14 morphology characters



Gambar 3. Dendrogram kemiripan genetik hasil analisis kluster dengan metode pengelompokan UPGMA berdasarkan 46 pita DNA
Figure 3. Dendrogram of genetic relationships based on UPGMA clustering of 46 band pattern of DNA

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis morfologi dan molekuler ke-17 aksesori kakao ternyata memperlihatkan variasi yang sempit sehingga diperlukan terobosan lain untuk meningkatkan keragaman genetik. Analisis kluster terhadap 14 karakter utama morfologi tanaman menghasilkan dendrogram dengan koefisien kemiripan berkisar 65-98% atau terdapat keragaman genetik 2-35%. Sedangkan analisis kluster terhadap 46 pola pita DNA menghasilkan dendrogram dengan koefisien kemiripan berkisar antara 64-91% atau terdapat keragaman genetik sebesar 9-36%.

DAFTAR PUSTAKA

- Alleman, M., L. Sidorenko, K. McGinnis, V. Seshadri, J. E. Dorweiler, and J. White. 2006. An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize. *Nature* 442: 295-298.
- Ardiana, D. W. 2009. Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi bufer CTAB. *Bul. Teknik Pertanian* 14 (1): 12-16.
- Arus, P. and J. Moreno-Gonzales. 1993. Marker-assisted selection. In: Hayward, M.D., N.O. Bosermark, and I. Romagosa (Eds.) *Plant Breeding: Principles and Prospects*. Chapman & Hall. London. p: 314-331.
- Buisine, N., H. Quesneville, and V. Colot. 2008. Improved detection and annotation of transposable elements in sequenced genomes using multiple reference sequence sets. *Genomics* 91: 467-475.
- Cao, X. F., W. Aufsatz, D. Zilberman, M. F. Mette, M. S. Huang, and M. Matzke. 2003. Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr. Biol.* 13: 2212-2217.
- Chan, S. W. L., D. Zilberman, Z. X. Xie, L. K. Johansen, J. C. Carrington, and S. E. Jacobsen. 2004. RNA silencing genes control *de novo* DNA methylation. *Science* 303: 1336.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Ebbs, M. L., and J. Bender. 2006. Locus-specific control of DNA methylation by the Arabidopsis SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell* 18: 1166-1176.
- Essy, H. 2003. Kemiripan genetik beberapa tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) berdasarkan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Thesis Institut Pertanian Bogor. 124 hlm.

- Gupta, P. K., R. K. Varshney, and M. Prasad. 2002. Molecular Markers: Principles and Methodology. In: Jain, S. M., D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia (Eds.). Molecular Techniques in Crop Improvement. p: 9-54.
- Kanno, T., B. Huettel, M. F. Mette, W. Aufsatz, E. Jaligot, and L. Daxinger. 2005. Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat. Genet.* 37: 761–765.
- Law, J. A., and S. E. Jacobsen. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11: 204–220.
- Liu, Z., and G. R. Furnier. 1993. Inheritance and linkage of allozymes and restriction fragment length polymorphisms in tremblingaspen. *J. Hered.* 84: 419–424.
- Mahapetra, K. C., C. H. P. Mishra, and B. Acharya. 1995. Clustering of rice mutans by different methods of analysis. *Indian J. Genet.* 55 (2): 138–147.
- Malone, C. D., and G. J. Hannon. 2009. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* 136: 656–668.
- McGregor, C. E., C. A. Lambert, M. M. Greyling, J. H. Louw, and L. Warnich. 2000. A comparative assessment of DNA finger Printing techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113: 135–144.
- McPherson, S., and F. Longo. 1992. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 268–279.
- Modgil, M., K. Mahajan, S. K. Chakrabarti, D. R. Sharma, and R. C. Sobti. 2005. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. *Sci. Hort.* 104: 151-160.
- Mohanty, I. C., D. Mahapatra, S. Mohanty, and A. B. Das. 2004. Karyotype analysis and studies on the nuclear DNA content in 30 genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Cell Biol. Int.* 28: 625-633.
- Nayak, S., B. K. Debata, V. K. Srivastava, and N. S. Sangwan. 2003. Evaluation of agronomically useful somaclonal variants in Jamrosa (a hybrid *Cymbopogon*) and detection of genetic changes through RAPD. *Plant Sci.* 164: 1029-1035.
- 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.
- Ni, J., P. M. Colowit, J. J. Oster, K. Xu, and D. J. Mackill. 2001. Molecular markers linked to stem rot resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 102: 511–516.
- Padmalatha, K., and 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. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 230-234.
- Qin, Y., L. Hong-Ling, and G. Yang-Dong. 2007. High-frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD. *Sci. Hort.* 111: 203-208.
- Randriani, E., D. Listyati, dan Syafaruddin. 2011. Keekerabatan plasma nutfah jambu mete berdasarkan marka *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). *Bul. Ristri.* 2 (2): 143-150.
- Richards, E. J. 2006. Inherited epigenetic variation-revisiting soft inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 7: 395–401.
- Sahasrabudhe, A., and M. Deodhar. 2010. Standardization of DNA Extraction and optimization of RAPD-PCR condition in *Garcinia indica*. *International Journal of Botany* 6 (3): 293-298.
- Sambrook, J., and D. W. Russel 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold-Spring Harbor Laboratory Pr. 2222 pp.
- Surzycki, S. 2000. Basic Techniques in Molecular Biology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 442 PP.
- Syafaruddin, dan C. Tresniawati. 2011. Variabilitas genetik plasma nutfah lada (*Piper nigrum* L.) berdasarkan marka *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). *Bul. Ristri.* 2 (1): 89 -98.
- Syafaruddin, dan T.J. Santoso. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Penelitian Tanaman Industri* 17 (1):11-17.
- Syafaruddin, E. Randriani, dan T. J. Santoso. 2011. Efektivitas dan efisiensi teknik isolasi dan purifikasi pada tanaman jambu mete. *Bul. Ristri.* 2 (2): 151-160.
- Teulat, B, C. Aldam, R. Trehin, P. Lebrun, J. H. A. Barker, G. M. Arnold, A. Karp, L. Boudouin, and F. Rognon. 2000. An Analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) population from across the geographic range using sequence-tagged microsatellite (SSRs) and RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 100: 764-771.
- Tingey, S. V., J. A. Rafalski, and J. G. K. Williams. 1992. Genetic analysis with RAPD markers. In *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Minneapolis, MN, USA. p: 3-8.
- Vargas, E. T., E. De Garcia, and M. Oropeza. 2005. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns. *J. Plant Physiol.* 162: 449-454.

- Waugh, R., K. McLean, A. J. Flavell, S. R. Pearce, A. Kumar, B. T. Thomas, and W. Powell. 1997. Genetic distribution of *BARE-1* retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol. Gen. Genet.* 253: 687-694.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Raton: CRC Press. 472 pp.
- Welsh, J., and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acid Res.* 18: 7213-7218.
- Williams, J. G. K., A. R. K. Kubelik, J. L. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by random primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid Res.* 18: 6531-6535.