

Analisis Variasi Genetik Varian Jati Arboretum dengan Penanda Mikrosatelit

Imas Cintamulya

Pendidikan Biologi-Pascasarjana Universitas Negeri Malang
Jl. Semarang 5 Malang. Email: warli66@gmail.com

Abstrak: Seleksi tanaman jati untuk memperoleh sifat unggul tidak cukup melalui penanda morfologi, tetapi juga perlu digunakan penanda molekuler berdasarkan polimorfisme DNA. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan kajian tanaman jati dari segi genetik pada level DNA, untuk melihat variasi genetik. Informasi variasi genetik jati diperlukan dalam pengadaan bibit untuk pembangunan hutan tanaman industri, dengan tujuan mencegah terjadinya *inbreeding* dan untuk keperluan konservasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis variasi genetik varian jati arboretum dengan penanda molekuler mikrosatelit dan menyusun buku pengayaan kajian dasar-dasar molekuler tumbuhan khususnya penanda molekuler mikrosatelit dalam menganalisis variasi genetik varian jati arboretum yang berkualitas. Adapun untuk mencapai tujuan pertama dilakukan langkah-langkah penelitian sebagai berikut: isolasi DNA, amplifikasi DNA, dan elektroforesis hasil amplifikasi. Data yang sudah diperoleh dianalisis dengan program GENEPOP Package versi 4.0.10, hasilnya berupa informasi mengenai frekuensi alel, heterozigositas, *genic* dan *genotype differentiation*, serta migrasi alel. Rancangan penelitian yang digunakan menurut Plomp (1997) yang hanya sampai 4 tahap, yakni: 1) tahap pengkajian awal; 2) tahap perancangan; 3) tahap realisasi (konstruksi); dan 4) tahap pengujian, evaluasi, dan revisi. Simpulan yang didapat adalah: 1) varian jati arboretum menunjukkan adanya variasi genetik yang tinggi; 2) menghasilkan buku pengayaan kajian dasar-dasar molekuler tumbuhan yang berkualitas.

Kata kunci: variasi genetik, varian jati, arboretum, penanda mikrosatelit, buku pengayaan

Indonesia merupakan salah satu pusat keanekaragaman kayu jati (Fofana, dkk., 2008). Hasil survey di Puslitbang Jati Perhutani Cepu ada sekitar 32 varian Jati arboretum baik yang berasal dari dalam maupun luar negeri. Variasi genetik dapat ditingkatkan dengan memanfaatkan plasma nutfah yang tersedia di alam, dan dapat pula dengan melakukan persilangan (Hutami, dkk., 2008). Informasi variasi genetik varian Jati arboretum menggunakan penanda molekuler mikrosatelit dapat dijadikan sebagai *database* plasma nutfah jati Indonesia dan untuk keperluan konservasi. *Database* plasma nutfah jati dapat digunakan oleh para pemulia tanaman untuk dijadikan sebagai bahan perakitan calon tanaman Jati unggul. Jati-jati unggul yang dihasilkan dari pemuliaan untuk selanjutnya digunakan untuk pembangunan hutan tanaman industri. Data molekuler Jati dengan penanda mikrosatelit sangat berguna dalam menetapkan metode terbaik pada konservasi genetik jati, karena sebagian besar hutan jati alam secara bertahap telah berubah menjadi jati monokultur (Narayan, dkk.,

2007). Salah satu indikator genetik dalam praktek manajemen hutan yang lestari adalah besarnya variasi genetik (Nam-koong dkk., 1996). Banyak pendekatan molekuler berdasarkan sifat polimorfisme DNA, untuk melihat adanya variasi genetik, di tingkat kultivar, antar kultivar dan spesies, atau antar spesies (Scott, dkk., 2000). Salah satunya melalui penanda molekuler mikrosatelit.

Mikrosatelit adalah salah satu penanda DNA dengan menggunakan primer (potongan pendek DNA sintetik) yang mengandung motif mikrosatelit pendek pada ujung 3' atau 5' atau mengapit daerah mikrosatelit yang terdiri dari satu sampai enam urutan nukleotida (motif) untuk amplifikasi DNA mikrosatelit. Mikrosatelit dapat dipakai sebagai alat dalam program pemuliaan karena kemampuan yang tinggi dalam mendeteksi perbedaan urutan basa, sampai satu pasang basa. Penggunaan penanda mikrosatelit relatif mudah karena menggunakan teknik PCR, terdistribusi pada seluruh kromosom, sehingga diharapkan semakin tinggi kemungkinan untuk mendapat pe-

nanda yang terpaut dengan suatu sifat tertentu. Mikrosatelit telah digunakan dalam memperkirakan aliran gen. Jenis urutan sederhana poly (dA), poly (dT) atau poly (dG-dT), poly (dC-dA) telah terbukti berulang-ulang dan menyisip di banyak genom eukariotik (Queller, dkk., 1993; Powell, dkk., 1996; Temnykh, dkk., 2000; Roy, dkk., 2004; Yu, dkk., 2004; Varshney, dkk., 2005; Fofana, dkk., 2008; Park dkk., 2009, Pandey dan Geburek, 2009).

Analisis variasi genetik menggunakan penanda mikrosatelit adalah analog dengan metode lama yakni elektroforesis protein. Sejumlah mikrosatelit diaplikasikan untuk mendeteksi sejumlah alternatif alel pada lokus genetik spesifik. Alel-alel individu mencerminkan frekuensi yang berbeda antar populasi yang berbeda (Bradley, dkk., 1998). Lebih banyak alel per lokus pada mikrosatelit. Berdasarkan beberapa hal di atas, mikrosatelit sebagai penanda DNA digunakan dalam melihat variasi genetik varian jati arboretum yang digunakan sebagai dasar dalam seleksi tetua pada program *breeding* terkait sifat-sifat tertentu untuk tujuan peningkatan produksi dan kualitas kayu jati.

METODE

Sampel varian jati arboretum diperoleh dari Puslitbang Perhutani Cepu (sebanyak 23 varian) yaitu: jati lengo (J LO), jati sungu (J SU), jati kluwih (J KL), jati daun bulat (J DB), jati godavari (J GO), jati daun lebar (J DL), jati hinh (J HI), jati deling (J DE), jati ponorogo (J PO), jati kesamben (J KE), jati gundih (J GUH), jati malabar (J ML), jati hamiltonia (J HA), jati glatstan (J GL), jati kapur (J KA), jati muna (J MU), jati siam (J SI) jati kovai (J KO), jati central prov (J CP), jati burma (J BU), jati denok (J DEK), jati gudik (J GUK) dan jati doreng (J DO) ditambah 2 jati *wild type* sebagai populasi pembanding. Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun pertama atau kedua jati (Draper dkk., 1988; Porebski, dkk., 1997; Keb-Llanes, 2002).

DNA genom jati diperoleh melalui isolasi dengan menggunakan metode buffer CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) menurut Orozco-Castillo dkk. (1994), yang sudah dimodifikasi. Dalam reaksi amplifikasi DNA, DNA genom jati digunakan sebagai cetakan (*template*) dengan pasangan primer (*mix*) sekuen pengapit (*flanking sequence*) nukleotida DNA mikrosatelit (*Forward dan Reverse*). Primer mikrosatelit yang digunakan dalam penelitian ini adalah lima seperti pada Tabel 1. Primer tersebut diisolasi

Tabel 1. Primer yang Digunakan dalam Penelitian

Lokus	Motif
CIRAD1TeakA06	(GA) ₁₅
CIRAD1TeakB03	(TC) ₅ TG (TC) ₈ (AC) ₅ (N) ₆₅ (AC) ₁₄
CIRAD1TeakH10	(TC) ₁₆
CIRAD3TeakB02	(TC) ₁₁ GC(TC) ₄
CIRAD3TeakF01	(TC) ₁₆

(Sumber: Verhaegen, dkk., 2005)

dari Jati (*Tectona grandis*) oleh Verhaegen dkk. (2005). Komponen amplifikasi DNA yang dibutuhkan adalah sebagai berikut: 2 µl larutan DNA sampel, 2 µl *forward* primer mikrosatelit, 2 µl *reverse* primer mikrosatelit, 12,5 µl *fast start/PCR mix*, dan air deion (dH₂O) 3 µl.

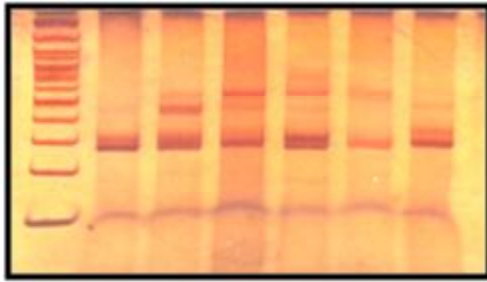
DNA diamplifikasi pada suhu 94°C selama 4 menit untuk denaturasi awal, kemudian dilanjutkan 30 siklus dengan setiap 1 siklus diprogram untuk denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, "*annealing*" 51°C selama 45 detik dan "*extention*" 72°C selama 45 detik. Siklus terakhir diikuti dengan inkubasi pada suhu 72°C selama 5 menit (Erlich, dkk., 1988; Saiki, dkk., 1988; Taylor, 1991; Rahman, dkk., 2000; Verhaegen, dkk., 2005). DNA hasil amplifikasi di-*running* pada 10 % PAGE (*Poly Acrylamid Gell Electrophoresis*) yang selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan perak.

Pita yang muncul pada gel akrilamid diasumsikan sebagai alel DNA mikrosatelit. Karena alel adalah kodominan, maka genotip ditentukan berdasarkan variasi alel yang ada, selanjutnya dianalisis dengan GENEPOP version 4.0.10. Didapat frekuensi alel, heterozigositas, genic dan *genotype differentiation* (Amin, 2003). Selain itu juga diperoleh nilai migrasi alel untuk populasi varian Jati arboretum.

HASIL & PEMBAHASAN

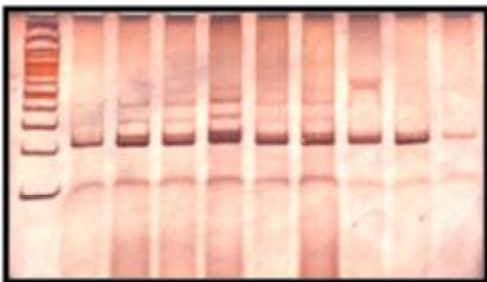
DNA hasil *running* setelah dihitung ukuran biasanya, kemudian dianalisis dengan menggunakan GENEPOP version 4.0.10, didapat frekuensi alel, heterozigositas, *genotype differentiation*, *genic differentiation*, dan migrasi alel. Contoh DNA hasil *running* pada gel akrilamid dapat dilihat pada Gambar 1, 2, dan 3. Sedangkan hasil analisis disajikan dalam Tabel 2, 3, 4, 5, dan 6.

Berdasarkan Tabel 2 menunjukkan bahwa frekuensi alel yang diperoleh pada varian Jati arboretum tinggi. Hal lain yang berhubungan dengan frekuensi alel tinggi pada varian Jati arboretum yaitu variasi alel. Dari kelima lokus mikrosatelit, lokus CIRAD1Te-



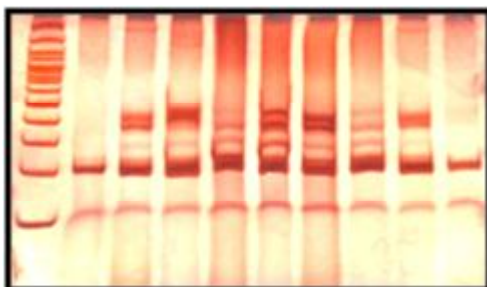
M JBU JWT1 JWT2 JDEK JGUK JDO

Gambar 1. DNA Jati Hasil *Running* dengan Primer CIRAD1TEAKB03



M JSU JKL JGO JDL JHI JDE JPO JKE JGUH

Gambar 2. DNA Jati Hasil *Running* dengan Primer CIRAD1TeakH10



M JSU JKL JGO JDL JHI JDE JPO JKE JGUH

Gambar 3. DNA Jati Hasil *Running* dengan Primer CIRAD3TEAKF01

Tabel 2. Frekuensi Alel Varian Jati Arboretum

Lokus	Jumlah alel	Ukuran (bp)	Frekuensi alel
CIRAD1TeakA06	16	102-386	0,025-0,175
CIRAD1TeakB03	9	105-456	0,025-0,425
CIRAD1TeakH10	6	105-546	0,025-0,450
CIRAD3TeakB02	11	105-450	0,025-0,275
CIRAD3TeakF01	9	196-400	0,025-0,650

akA06 yang paling banyak menghasilkan variasi alel (16 jenis), selanjutnya lokus mikrosatelit CIRAD3TeakB02 (11), lokus mikrosatelit CIRAD1TeakB03 dan lokus mikrosatelit CIRAD3TeakF01 masing-masing

Tabel 3. Heterozigositas Varian Jati Arboretum

Lokus	Jumlah alel	Ukuran (bp)	Heterozigositas
CIRAD1TeakA06	16	102-386	0.933
CIRAD1TeakB03	9	105-456	0.774
CIRAD1TeakH10	6	105-546	0.718
CIRAD3TeakB02	11	105-450	0.808
CIRAD3TeakF01	9	196-400	0.565
Rata-Rata Perlokus			0.760

Tabel 4. Diferensiasi Genotip Varian Jati Arboretum

Lokus	Jumlah genotip	Ukuran (bp)	Nilai Fst ^
CIRAD1TeakA06	13	102-386	0.046
CIRAD1TeakB03	8	105-456	0.075
CIRAD1TeakH10	6	105-546	0.015
CIRAD3TeakB02	13	105-450	0.135
CIRAD3TeakF01	7	196-400	0.024

Tabel 5. Diferensiasi Gen Varian Jati Arboretum

Lokus	Jumlah gen	Ukuran (bp)	P-value
CIRAD1TeakA06	16	102-386	0.774
CIRAD1TeakB03	9	105-456	0.185
CIRAD1TeakH10	6	105-546	0.447
CIRAD3TeakB02	10	105-450	0.043
CIRAD3TeakF01	7	196-400	0.075

Tabel 6. Hardy-Weinberg Test Varian Jati Arboretum

Lokus	Ukuran (bp)	P-value
CIRAD1TeakA06	102-386	0.000
CIRAD1TeakB03	105-456	0.010
CIRAD1TeakH10	105-546	0.001
CIRAD3TeakB02	105-450	0.070
CIRAD3TeakF01	196-400	0.442

Migrasi alel pada varian jati arboretum adalah:
 $1.58802 + 0,784288 : 2 = 1.186$

(9), dan lokus mikrosatelit CIRAD1TeakH10 yang menghasilkan variasi alel yang paling rendah (6). Hal ini menunjukkan bahwa lokus CIRAD1TeakA06 paling bagus dalam mengidentifikasi adanya variasi genetik dilihat dari variasi alel yang diidentifikasi. Rata-rata nilai heterozigositas perlokus varian jati arboretum tinggi. Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3, nilai heterozigositas untuk varian jati arboretum berkisar 0,565-0,933, dengan rata-rata perlokus 0,760.

Tabel 4 menunjukkan bahwa diferensiasi genotip yang diperoleh pada varian Jati arboretum tinggi. Hal ini dilihat dari rata-rata genotip varian jati arboretum

sebesar 9.4 perlokus. Jumlah genotip varian jati arboretum yang teridentifikasi berkisar antara 6-13. Lokus yang memiliki variasi genotip tinggi pada varian jati arboretum adalah lokus CIRAD1TeakA06 dan lokus CIRAD3TeakB02. Hal lain yang terkait dengan diferensiasi genotip, berdasarkan Tabel 4. yaitu nilai F_{st} . Nilai F_{st} untuk varian jati arboretum berkisar antara 0,015–0,135. Hal ini menunjukkan bahwa diferensiasi genotip pada populasi cukup untuk empat lokus (CIRAD1TeakA06, CIRAD1TeakB03, CIRAD1TeakH10, CIRAD3TeakB02) dan untuk lokus CIRAD3TeakF01 sedikit.

Diferensiasi gen yang teridentifikasi pada varian jati arboretum tinggi seperti ditunjukkan Tabel 5. Alel varian jati arboretum yang teridentifikasi berkisar antara 6–16 alel, dengan rata-rata alel perlokus 9.4. Hal lain yang terkait dengan diferensiasi gen ialah P -value. P -value untuk diferensiasi gen pada varian jati arboretum berkisar antara 0,043–0,774. Berdasarkan hal ini diferensiasi gen yang teridentifikasi pada lokus CIRAD1TeakA06 tinggi. Kalau diferensiasi gen pada populasi tinggi, menunjukkan variasi gen atau variasi genetik dalam populasi juga tinggi. Dengan demikian primer CIRAD1TeakA06 merupakan primer yang dapat mendeteksi adanya variasi gen atau variasi genetik yang tinggi pada varian jati arboretum.

Perubahan pada frekuensi alel dalam sebuah populasi organisme yang saling berkembangbiak menyebabkan terjadinya evolusi. Untuk memahami mekanisme yang menyebabkan sebuah populasi berevolusi, adalah sangat berguna untuk memperhatikan kondisi-kondisi apa saja yang diperlukan oleh suatu populasi untuk tidak berevolusi. Hukum Hardy-Weinberg menyatakan bahwa frekuensi alel (variasi pada sebuah gen) pada sebuah populasi yang cukup besar akan tetap konstan jika gaya dorong yang terdapat pada populasi tersebut hanyalah penataan ulang alel secara acak selama pembentukan sperma atau sel telur dan kombinasi acak alel sel kelamin ini selama pembuahan. Populasi seperti ini dikatakan sebagai dalam kesetimbangan Hardy-Weinberg dan tidak berevolusi.

Suatu populasi dikatakan memenuhi Hukum keseimbangan Hardy-Weinberg, apabila terjadinya kawin acak diantara individu-individu anggotanya. Artinya, tiap individu memiliki peluang yang sama untuk bertemu dengan individu lain, baik dengan genotip yang sama maupun berbeda dengannya. Melalui sistem kawin acak ini, frekuensi alel akan senantiasa konstan dari generasi ke generasi. Di samping kawin

acak, ada persyaratan lain yang harus dipenuhi bagi berlakunya hukum keseimbangan Hardy-Weinberg, yaitu tidak terjadi migrasi, mutasi, dan seleksi. Penting untuk dimengerti bahwa di luar laboratorium, satu atau lebih pengaruh ini akan selalu ada. Oleh karena itu, kesetimbangan Hardy-Weinberg sangatlah tidak mungkin terjadi di alam. Kesetimbangan genetik adalah suatu keadaan ideal yang dapat dijadikan sebagai garis dasar untuk mengukur perubahan genetik.

Varian Jati arboretum rata-rata hanya sekitar 10% memenuhi hukum keseimbangan Hardy-Weinberg, atau dengan kata lain bahwa varian Jati arboretum merupakan populasi yang tidak seimbang frekuensi alel (variasi pada sebuah gen) tidak konstan atau cenderung berubah. Terkait dengan masalah migrasi, pada varian Jati arboretum berdasarkan hasil analisis menunjukkan adanya migrasi alel sebanyak 1,186. Hal ini berpengaruh terhadap perubahan frekuensi alel dalam populasi varian jati arboretum yang akan meningkatkan variasi genetik pada populasi tersebut.

Berdasarkan frekuensi alel, heterozigositas, diferensiasi genotip, diferensiasi gen, dan migrasi alel di antara varian Jati arboretum menunjukkan adanya variasi genetik yang tinggi. Informasi variasi genetik pada varian Jati arboretum berguna sebagai *database* kekayaan plasma nutfah jati Indonesia dan sebagai pedoman untuk konservasi genetik jati. Variasi genetik pada varian jati arboretum tinggi, hal ini menunjukkan bahwa individu pada populasi tersebut beragam sehingga peluang untuk memperoleh genotip yang diharapkan akan besar (Sudarmadji, dkk., 2007). Oleh karena itu variasi genetik yang tinggi varian Jati arboretum, bisa digunakan untuk perakitan calon tanaman jati unggul, sehingga bisa diperoleh bibit yang kita harapkan. Melalui persilangan di antara varian jati arboretum akan dapat meningkatkan variasi genetik tanaman jati yang dimiliki perhutani. Adanya informasi dan data molekuler tentang variasi genetik pada varian jati arboretum yang tinggi sangat dibutuhkan untuk kepentingan program pemuliaan tanaman. Perlunya program pemuliaan jati, karena tanaman tersebut dijadikan salah satu prioritas andalan untuk pembangunan hutan tanaman industri, guna mencukupi permintaan akan kayu jati yang tinggi, sebab banyak diminati sehingga memiliki nilai ekonomi tinggi (Fofana, dkk., 2008).

Variasi genetik yang besar dapat dijadikan salah satu indikator dalam praktek manajemen hutan yang lestari. Variasi genetik yang besar sangat mempengaruhi

ruhi kemampuan tanaman jati untuk beradaptasi. Oleh karena informasi mengenai varian jati arboretum memiliki variasi genetik yang tinggi penting untuk menjaga kepunahan. Ke depannya varian jati arboretum dapat digunakan untuk persilangan yang dapat meningkatkan heterozigositas yang dapat menutupi terjadinya mutasi yang merusak. Hal ini penting untuk dapat terus mempertahankan aliran gen antar populasi dengan variasi genetik yang berbeda, tujuannya menghindari adanya *inbreeding*. Istilah *inbreeding* digunakan untuk menggambarkan berbagai fenomena yang terkait dengan persilangan antar kerabat dekat yang dapat meningkatkan homozigositas gen-gen resesif. Gen-gen resesif yang muncul bisa membawa sifat baik ataupun tidak baik. Dampak negatif *inbreeding* yang langsung dirasakan adalah menurunnya kualitas benih (Aria, 2009).

Oleh karena itu informasi variasi genetik varian jati arboretum yang tinggi bermanfaat untuk konservasi tanaman jati, karena sebagian besar hutan jati alam secara bertahap telah berubah menjadi jati monokultur (Narayan, dkk., 2007). Data molekuler jati dengan penanda mikrosatelit sangat berguna dalam menetapkan metode terbaik pada konservasi genetik dan untuk menjamin masa depan pada pelacakan evolusi variabilitas. Di samping itu juga sangat efektif memeriksa *provenance* (keaslian) kayu.

Penyebab terjadinya variasi genetik di antara varian jati arboretum karena adanya mutasi bahan genetik, migrasi antar populasi (aliran gen), dan perubahan susunan gen melalui reproduksi seksual. Bisa juga datang dari tukar ganti gen antara spesies yang berbeda. Mutasi akan menghasilkan variasi yang membuat suatu individu dapat menyesuaikan diri seperti pada perubahan lingkungan. Aliran gen merupakan migrasi alel-alel dari satu populasi atau spesies lain di mana mereka hadir pada suatu frekuensi berbeda.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan penanda mikrosatelit varian jati arboretum menunjukkan variasi genetik yang tinggi, dilihat dari frekuensi alel, heterozigositas, differensiasi genotip, differensiasi gen, dan migrasi alel.

DAFTAR RUJUKAN

- Amin, M. 2003. *Characterization and Application of Molecular Markers in The Peking Duck and Other Waterfowl species*. Dissertation. Halle-Wittenberg: Martin-Luther University.
- Aria, P. 2009. *Inbreeding*, (online), (<http://maswira.wordpress.com/>), diakses 20 Desember 2010.
- Breadley, D.G., Loftus, R.T., Cunningham, P., and Machugh, D.E. 1998. *Genetic and Domestic Cattle Origin. Evolutionary Anthropology*. Willey-Liss, Inc. pp. 79-86.
- Draper, J., Scott, R., Armitage, P. and Walden, R. 1988. *Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual*. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Keb-Llanes, 2002. Plant DNA Extraction Protocol. *Plant Mol. Bio.Rep*, Vol 20: 299a-299e.
- Namkoong, G., Boyle, T., Gregorius, H.R., Joly, H., Savolainen, O., Ratnam, W., and Young, A. 1996. *Testing Criteria and Indicators for Assessing the Sustainability of Forest Management*. Bogor: CIFOR.
- Narayanan, C., Wali, S.A., Shukia, N., Kumar, R., Mandal, A.K., & Ansari S.A., 2007. RAPD and ISSR Markers for Molecular Characterization of Teak (*Tectona Grandis*) Plus Trees, *Journal of Tropical Forest Science*, 19 (4): 218-225.
- Oroozco-Castillo, C., Chalmees, K. J., Waugh, R., and Powell, W. 1994. Detection on Genetic Diversity and selective Gene Introgression in Coffee Using RAPD Markers. *Theor. App. Genet*, Vol (89): 934-940.
- Pandey, M., And Geburek, T. 2009. Successful Cross-Amplification of *Shorea* Microsatellites Reveals Genetic Variation in The Tropical Tree, *Shorea robusta* Gaertn. *Hereditas*, Vol (146):29-32.
- Park, Y. J., Lee, J. K., and Kim, N. S. 2009. Simple Sequence Repeat Polymorphisms (SSRPs) for Evaluation of Molecular Diversity and Germplasm Classification of Minor Crops. *Molecules*, Vol (14): 4546-4569.
- Porebski, S., Bailey, L. G. And Baum, B. R. 1997. Modification of CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Mol. Biol. Rep*, 15 (1): 9-15.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalski, A. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trend Plant Sci*, Vol(1): 215-222.

- Queller, D., J. E. Strassmann, C. R. Hughes. 1993. Microsatellites and Kinship. *Tree*, Vol. 8 (8) : 285- 288.
- Rahman, M. H., Jaquish, B., dan Khasa, P.D. 2000 Optimization of PCR Protocol in Microsatellite Analysis with Silver and SYBR Stain. *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol (18): 339-348.
- Roy, C.B, Nazeer, M.A., And Saha, T. 2004. Identification of Simple Sequence Repeat in Rubber (*Hevea brasiliensis*). *Current Science*, 87(6): 807-811.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., dan Erlich, H. A. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Scott, K.D., Eggler, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E. M., Lee, L.S., and Henry, R.J. 2000. Analysis of SSRs Derived From Grape ESTs. *Theor.Appl. Genet*, Vol (100): 723-726.
- Sudarmadji, Mardjono, R., dan Sudarmo, H. 2007. Variasi Genetik, Heritabilitas, dan Korelasi Genotipik sifat-Sifat penting Tanaman Wijen (*Sesamun Indicum L.*). *Jurnal Littri*, 13 (3): 88-92.
- Taylor, G. R. 1991. Polymerase Chain Reaction: Basic Principle and Automation. In: *PCR Vol 1: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Temnykh, S., Park, W.D., Ayre, N., Cartinhaour, S., Hanck, N., Lipovich, L., Cho, Y.G., Ishii, T., and McCouch, S.R. 2000. Mapping and Genome Organization of Microsatellite Sequences in Rice (*Oryza sativa L.*). *Theor. Appl. Genet*, Vol.(100): 697-712.
- Yu, J.K. et al., 2004. Development and Mapping of EST-derived Simple Sequence Repeat (SSR) for Markers Hexaploid Wheat. *Genom*, Vol.(47): 805-818.
- Varshney, R. K., Graner, A., Sorrells, M. E. 2005. Genic Microsatellite Markers in Plants: Feature and Applications. *Trends in Biotechnology*, Vol (23):48-56.
- Verhaegen, D., Ofori, D., Fofana, I., Poitel, M., and Vaillant, A. 2005. Development and Characterization of Microsatellite Markers in *Tectona grandis* (Linn.f). *Molecular Ecology Notes*, Vol.(5): 945-947.
- Verhaegen, D., Fofana, I. J., Logossa, Z.A., and Ofori, D. 2010. What is the Genetic Origin of Teak (*Tectona grandis L.*) Introduced in Africa and Indonesia. *Tree Genetic & Genome*, Vol (6): 717-733.