

Analisis Keragaman Genetik Tanaman Anggur (*Vitis vinifera* L.) Varietas BS 60 Hasil Perbanyakan Secara kultur Jaringan Dengan Marka ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

Analysis Genetic Diversity of Grape (*Vitis vinifera* L.) Varieties BS 60 From Tissue Culture Propagation With ISSR Markers (Inter Simple Sequence Repeats)

Patricia Martina Kusuma Indaryani^{1*)}, Sumeru Ashari¹⁾ dan Baiq Dina Mariana²⁾

¹⁾ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Brawijaya University
Jln. Veteran, Malang 65145 Jawa Timur, Indonesia

²⁾Peneliti Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika
Jl. Raya Tlekung Junrejo, no 1, Batu, Jawa Timur Indonesia

^{*)}E-mail: patriciamartina1724@gmail.com

ABSTRAK

Perbanyakan secara kultur jaringan tidak menutup kemungkinan terjadinya variasi somaklonal yang menyebabkan variasi atau keanekaragaman pada tanaman hasil perbanyakan kultur jaringan. Penelitian dilaksanakan di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika mulai dari Januari hingga April 2019. Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode deskriptif kualitatif dengan hasil akhir pita DNA. Penentuan sampel berdasarkan 3 kategori yaitu sampel yang disubkultur 14 kali, sampel yang disubkultur 15 kali dan sampel tanpa masa kultur. Pengamatan dilakukan terhadap profil pita DNA yang dihasilkan. Pita DNA yang terbentuk diberi skor (1) dan pita tidak terbentuk diberi skor (0) yang selanjutnya menjadi sebuah matriks biner. Data kemudian dianalisis dengan analisis kluster *unweighted pair group method arithmetic averages* (UPGMA) dan divisualisasikan dengan menggunakan program NTSYS PC versi 2.20. Sampel yang disubkultur 14 kali memiliki persentase kemiripan dengan sampel tanpa masa kultur sebesar 85% - 89%. Sampel yang disubkultur 15 kali memiliki persentase kemiripan dengan sampel tanpa masa kultur sebesar 66%. Sampel yang disubkultur 14 kali memiliki persentase kemiripan dengan sampel yang disubkultur 15 kali sebesar 66%. Sampel

dengan koefisien kemiripan tertinggi dengan sampel tanpa masa kultur adalah kelompok A2 dengan koefisien kemiripan 0,89.

Kata kunci: Anggur, Frekuensi Subkultur, Keragaman Genetik, Marka Molekuler.

ABSTRACT

Tissue culture propagation doesn't rule out the possibility of somaclonal variation which causes variations or diversity in plants by multiplication of tissue culture. The study was conducted at Indonesian Citrus and Subtropical Fruits Research Institute from January to April 2019. The study was conducted using a qualitative descriptive method with final result of DNA bands. Sample determination based on 3 categories, sample subcultured 14 times, sample subcultured 15 times and sample without culture period. Observations based on the DNA profile from DNA band. The formed DNA band is given score (1) and if it not formed DNA band is given a score (0) which then becomes a binary matrix. Data analyzed by cluster analysis of unweighted pair group method arithmetic averages (UPGMA) and visualized with NTSYS PC version 2.20 program. Sample subcultured 14-times had percentage similarity with sample without culture period of 85% - 89%. Sample subcultured 15-times had percentage similarity with sample without

culture period of 66%. Sample subcultured 14-times had percentage similarity with sample subcultured 15-times of 66%. Samples with the highest similarity coefficient with samples without culture period is group A2 with a similarity coefficient of 0.89.

Keywords: Frequency Subculture, Genetic Diversity, Grape, Molecular Marker.

PENDAHULUAN

Konservasi plasma nutfah secara in situ maupun ex situ masih memungkinkan kematian/kehilangan tanaman akibat serangan hama dan penyakit maupun bencana alam. Konservasi plasma nutfah secara *in vitro* memiliki berbagai kelebihan, antara lain hemat dalam pemakaian ruangan, dapat menyimpan koleksi tanaman yang hampir punah dan tanaman yang tidak menghasilkan biji, bebas dari cekaman biotik dan abiotik. Pemeliharaan stabilitas genetik merupakan hal yang sangat penting diperhatikan untuk menjamin plasma nutfah yang disimpan tetap sesuai dengan identitas asalnya (Dewi *et al.*, 2014). Keanekaragaman genetik dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA yang dapat mempengaruhi fenotipe suatu organisme (Suryanto, 2003). Keragaman genetik dapat diketahui lebih awal melalui karakterisasi molekuler (Nugroho *et al.*, 2017).

Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) merupakan penanda molekuler yang umumnya digunakan untuk studi keanekaragaman genetika, filogeni, penandaan gen, pemetaan genom dan biologi evolusi pada berbagai tanaman (Bani *et al.*, 2017). Perbanyakan secara kultur jaringan tidak menutup kemungkinan terjadinya variasi somaklonal yang menyebabkan variasi atau keragaman pada tanaman hasil perbanyakan kultur jaringan. Maka dari itu diperlukan analisis keragaman genetik tanaman anggur varietas BS 60 hasil perbanyakan secara kultur jaringan untuk mengetahui tingkat keragaman yang terjadi. Penelitian ini bertujuan antara lain mengetahui penanda molekuler ISSR dapat mendeteksi keragaman anggur yang

dikonservasi secara kultur jaringan, mengetahui keragaman genetik yang muncul dari tanaman hasil konservasi secara *in vitro* dan mengetahui perbedaan frekuensi subkultur menimbulkan keragaman pada tanaman anggur hasil perbanyakan secara kultur jaringan.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, dari bulan Januari hingga April 2019. Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain adalah mortal, pistil, timbangan analitik, mikropipet, mikrotip, mikrotube, *water bath*, *freezer*, sentrifuge, *laminar air flow cabinet*, mesin PCR, set elektroforesis DNA, *BioDocAnalyze*, gelas ukur, *mini spin*, vortex, dan lemari asam.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun muda tanaman anggur varietas BS 60 hasil perbanyakan secara kultur jaringan yang telah disubkultur sebanyak 14 kali, 15 kali dan tanaman tanpa masa kultur jaringan, aquades, padatan PVP (*polyvinilpolypirolidone*), β -merkaptotanol, NaCl, EDTA, CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*), NaOH, kloroform, isoamilalkohol, etanol, *tris base*, RNase, *Dream Tag Green PCR Master Mix*, *water nuclease-free*, agarosa, ethidium bromide, loading dye, lambda, DNA ladder, buffer TE, bufer TBE. Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode deskriptif kualitatif dengan hasil akhir pita DNA. Penentuan sampel berdasarkan 3 kategori yaitu sampel yang disubkultur 14 kali, sampel yang disubkultur 15 kali dan sampel tanpa masa kultur. Pelaksanaan penelitian meliputi ekstraksi dan purifikasi DNA, uji kualitas DNA, PCR-ISSR dan elektroforesis DNA.

Ekstraksi dan Purifikasi DNA

Larutan bufer CTAB dibuat dengan komposisi CTAB 3 ml, NaCl 2,8 ml, EDTA 0,4 ml, *tris base* 1 ml dan aquades 2,8 ml diinkubasi dengan *water bath* selama 1 jam dengan suhu 65°C. Bagian tanaman yang digunakan berupa daun yang masih muda yang telah dibuang tulang daunnya (Nugroho *et al.*, 2016). Sebanyak 0,1 gram

daun muda tanaman anggur hasil perbanyak secara kultur jaringan digerus menggunakan mortal steril dan ditambahkan PVP secukupnya dan 1 ml bufer CTAB. Sampel yang sudah digerus dimasukkan kedalam *tube* 2 ml dan ditambahkan 20 µl β-merkuptoetanol dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 65°C (bolak – balik setiap 5 menit sekali). Ke dalam larutan tersebut ditambahkan Na-asetat 1/10 volume larutan dan chisam (kloroform : isoamil alkohol) sebanyak 1 ml. Sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit dan dipindahkan supernatan (fase atas) kedalam *tube* 2 ml. Ditambahkan kembali Na-asetat 1/10 volume larutan dan chisam (kloroform : isoamil alkohol) sebanyak 1 ml. Sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit dan pindahkan supernatan (fase atas) kedalam *tube* 1,5 ml. Selanjutnya ditambahkan Na-asetat sebanyak 1/10 volume total dan isopropanol dingin sebanyak 2/3 volume total dan disimpan dalam *freezer* selama 20 menit. Selanjutnya larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 8 menit lalu cuci pelet dengan etanol 70% untuk selanjutnya dikering anginkan di *Laminar Air Flow Cabinet* hingga bagian dalam *tube* mengering. Ditambahkan pelet dengan 300 µl larutan TE bufer dan 2 µl RNase lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Ditambahkan 1 ml etanol 70% dingin dan simpan dalam *freezer* selama 20 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit, lalu buang supernatan (fase atas) dan ditambahkan 700 µl etanol 70% dingin. Setrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit, berikutnya supernatan dibuang dan pelet dikering anginkan di *Laminar Air Flow Cabinet*. Selanjutnya ditambahkan 100 µl TE buffer kedalam *tube*.

Uji Kualitas DNA

Hasil ekstraksi DNA diuji kualitas DNA dengan konsentrasi agarosa 0,8 % dari bufer TBE. Dicampurkan antara 0,32 gram agarosa dengan 40 ml TBE buffer 0,5x dan dididihkan hingga larutan berwarna bening, ditambahkan 5 µl ethidium bromide. Larutan dituangkan kedalam cetakan dan pasang sisir. Larutan lambda 1, lambda 2

dan sampel masing – masing 6 µl dimasukkan dalam sumuran. Aplikasi elektroforesis dilakukan dengan tegangan listrik 50 volt selama 30 menit dan elektroforesis divisualisasi dengan menggunakan BioDoc Analyze BIO-RAD Gel Doc™ EQ.

PCR-ISSR

Campuran untuk proses PCR terdiri dari 4 µl DNA, 3 µl primer, 7µl *dream taq green* PCR Master Mix dan 1 µl *water nuclease-free*. 5 jenis primer ISSR yang digunakan menurut Chiang *et al.* (2010) terdapat pada Tabel 2 *Spindown* larutan dengan kecepatan 6 rpm selama 45 detik, lalu di *running* pada mesin PCR dengan siklus seperti Tabel 1, dan ulangi sebanyak 35 siklus.

Elektroforesis DNA

Hasil amplifikasi dielektroforesis dengan konsentrasi agarosa 1,2 % bufer TBE. Dicampurkan antara 0,48 gram agarosa dengan 40 ml TBE buffer 0,5x dan dididihkan hingga larutan berwarna bening, ditambahkan 5 µl ethidium bromide. Larutan dituang kedalam cetakan dan dipasang sisir. DNA sampel hasil amplifikasi dimasukkan masing – masing sebanyak 6 µl kedalam sumuran. Dialirkan dengan tegangan listrik 50 volt selama 60 menit dan elektroforesis divisualisasi dengan menggunakan BioDocAnalyze BIO-RAD Gel Doc™ EQ.

Pengamatan dilakukan pada profil pita DNA yang dihasilkan melalui proses elektroforesis. Penambahan atau kehilangan pita DNA dibandingkan dengan kontrol menunjukkan adanya *off-type* (Yuliati *et al.*, 2017). Masing – masing pita DNA diperlakukan sebagai sebuah karakter.

Tabel 1.Proses PCR

Proses	Suhu	Waktu
Inisial denaturasi	94°C	5 menit
Denaturasi	94°C	1 menit
<i>Annealing</i>	55°C	1,5 menit
Ekstensi	72°C	2 menit
Final ekstensi	72°C	5 menit
<i>Cooling</i>	4°C	

Keterangan: Proses 1 siklus PCR-ISSR.

Tabel 2. Jenis Primer

Primer	Sekuen Nukleotida (5'-3')
L 8	(GA) ₉ A
L 9	(GA) ₉ C
L 10	(GA) ₉ T
L 11	CCGGATCC(GA) ₉
L 13	CCGGATCC(GT) ₉

Keterangan: Sekuen nukleotida masing – masing primer ISSR.

Pita DNA yang terbentuk diberi skor untuk pita terbentuk (1) atau pita tidak terbentuk (0) yang selanjutnya menjadi sebuah matriks biner. Data kemudian dianalisis dengan analisis kluster *unweighted pair group method arithmetic averages* (UPGMA) dan divisualisasikan dengan menggunakan program NTSYS PC versi 2.20 (Ardiyani *et al.*, 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode Konservasi yang dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika

Sumber eksplan yang digunakan untuk konservasi dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika pada tanaman anggur berasal dari jaringan meristem. Eksplan meristem digunakan untuk mengurangi jaringan kultur terkontaminasi (Sitinjak, 2010). Pada konservasi *in vitro*, untuk menghindari ketidakstabilan genetik dalam penyimpanan, sebaiknya digunakan eksplan berupa jaringan yang telah terdiferensiasi seperti embrio, tunas, planlet, atau jaringan meristem (Dewi *et al.*, 2014).

Media tanam awal yang digunakan adalah media MS (*Murashige and Skoog*) dengan arang aktif tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Media tanam kedua yang digunakan adalah media WPM (*Woody Plant Media*) dengan myoinositol 100 mg/liter sebagai vitamin, BAP 1 mg/liter dan NAA 0,1 mg/ liter. Media tanam ketiga digunakan media MS (*Murashige and Skoog*) dengan myoinositol 250 mg/liter sebagai vitamin, BAP 0,5 mg/liter, NAA 0,025 mg/liter dan IBA 1 mg/liter. Media keempat dan seterusnya kembali digunakan media MS (*Murashige and Skoog*) dengan arang aktif tanpa penambahan zat pengatur

tumbuh. Planlet disubkultur setiap 4 bulan sekali untuk menjamin tersedianya nutrisi dalam media tanam. Planlet yang digunakan sebagai bahan penelitian sudah ditanam sejak 17 Februari 2014.

Hasil Elektroforesis

Hasil elektroforesis DNA tanaman anggur hasil perbanyakannya secara kultur jaringan dengan menggunakan primer L8, L9, L10, L11 dan L13 pada Tabel 3. Kelima primer tersebut sebelumnya dapat digunakan dengan optimal untuk mendeteksi keragaman genetik tanaman lengkung, namun pada penelitian kali ini primer dapat digunakan secara optimal untuk mendeteksi keragaman genetik pada tanaman anggur. Hal ini disebabkan primer memiliki sifat yang universal atau tidak merujuk pada sifat tertentu. Penanda ISSR merupakan penanda dominan yang tidak memerlukan desain primer karena bekerja secara acak (Trojanowska *and* Bolibok, 2004).

Intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, kemurnian dan konsentrasi DNA templat. Sebaran situs penempelan primer pada DNA cetakan. Adanya kompetisi tempat penempelan primer pada DNA cetakan yang menyebabkan satu fragmen diamplifikasi dalam jumlah banyak dan fragmen lainnya sedikit (Maulana, 2017). Semakin tinggi persentase polimorfisme pada suatu primer, akan menggambarkan semakin besar keragaman genetik. Jumlah pita DNA polimorfis dalam analisis keragaman genetik menentukan tingkat keragaman suatu populasi, karena banyaknya pita DNA polimorfis lebih dapat menggambarkan keadaan genom tanaman dan akan memperkecil bias yang disebabkan tidak terwakilinya bagian-bagian genom (Kawengian *et al.*, 2016). Semakin banyak pita DNA polimorfik keragaman genetik sampel semakin tinggi karena semakin banyak situs penempelan primer pada genom tanaman (Tasma, 2014).

Tabel 3. Persentase Polimorfisme

No.	Primer	Jumlah Pita Polimorfik	Jumlah Pita Monomorfik	Persentase Polimorfisme
1.	L8	12	6	66,6 %
2.	L9	3	6	33,3 %
3.	L10	5	5	50 %
4.	L11	6	7	46,2 %
5.	L13	8	6	57,2 %

Keterangan: Persentase pita polimorfisme pada masing-masing primer ISSR.

Keragaman Genetik Tanaman Anggur

Berdasarkan Gambar 1, dendogram keragaman genetik tanaman anggur varietas BS 60 hasil perbanyakan secara kultur jaringan memiliki tingkat kemiripan 66 - 100%. Keragaman genetik tanaman anggur terbagi menjadi 2 klaster utama pada koefisien kemiripan 0,66 yaitu kelompok A dan kelompok B. Kelompok A terdiri dari 11 sampel berupa 10 sampel yang telah disubkultur sebanyak 14 kali dan 1 sampel berupa tanaman anggur yang ada pada lapang. Kelompok B terdiri dari 10 sampel yang telah disubkultur sebanyak 15 kali. Pada masing - masing kelompok terbagi menjadi 2 sub klaster yaitu I dan II. Kelompok A terbagi menjadi kelompok kecil I dan II pada koefisien kemiripan 0,85. Kelompok B terbagi menjadi kelompok kecil I dan II pada koefisien kemiripan 0,82.

Sampel yang disubkultur 14 kali memiliki persentase kemiripan dengan sampel lapang sebesar 85% - 89%. Sampel yang disubkultur 15 kali memiliki persentase kemiripan dengan sampel lapang sebesar 66%. Sampel yang disubkultur 14 kali memiliki persentase kemiripan dengan sampel yang disubkultur 15 kali sebesar 66%. Sampel dengan koefisien kemiripan tertinggi dengan sampel lapang adalah kelompok A2 dengan koefisien kemiripan 0,89. Berdasarkan dendogram keragaman genetik tanaman anggur hasil perbanyakan secara kultur jaringan dapat diketahui perbedaan keragaman genetik setiap frekuensi subkultur sebesar 34%.

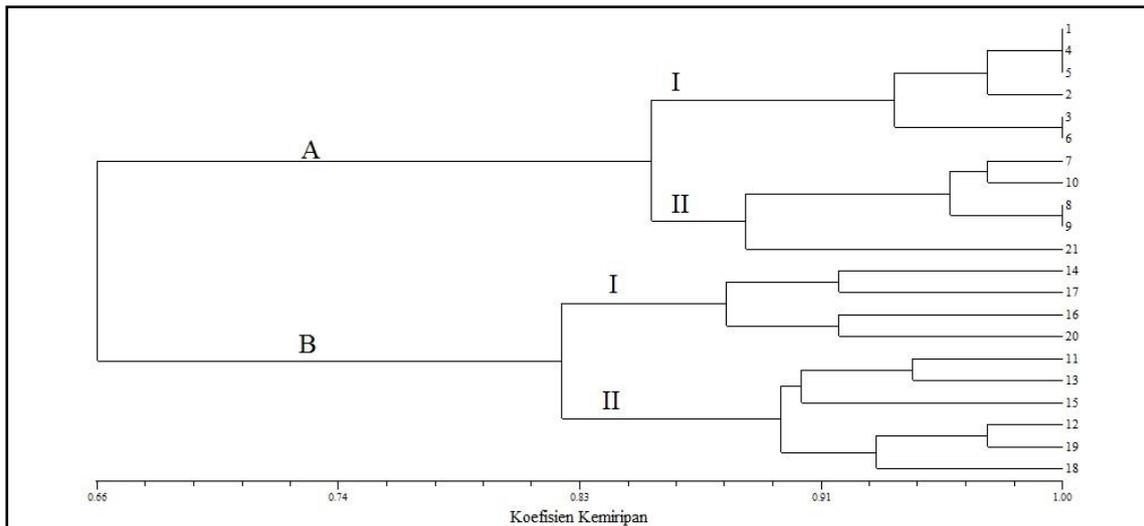
Keragaman genetik yang dihasilkan pada penelitian ini merupakan perbedaan sifat diantara individu masing - masing sampel pengamatan. Setiap pita yang dihasilkan dari amplifikasi DNA dianggap sebagai suatu sifat. Keragaman genetik terkait erat dengan jarak genetik. Semakin

besar jarak genetik semakin besar keragaman genetik individu dalam populasi. Sebaliknya semakin kecil jarak genetik maka semakin rendah keragaman genetiknya (Gusmiaty *et al.*, 2016).

Pengujian stabilitas genetik merupakan salah satu prasyarat utama dalam produksi tanaman yang diperoleh melalui teknik kultur jaringan untuk memastikan efektivitas protokol dalam menghasilkan benih yang *true to type*. Deteksi sejak dini keragaman genetik pada tanaman hasil mikropopagasi penting untuk menghindari pengembangan tanaman yang telah berubah genetiknya, hemat waktu, dan lebih efisien (Yuliati *et al.*, 2017).

Adanya keragaman genetik yang terjadi pada penelitian kali ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Menurut Harahap (2011), salah satu faktor yang mempengaruhi munculnya keragaman somaklonal adalah subkultur yang berulang - ulang yang dapat menyebabkan terjadinya mutasi. Hal ini didukung oleh Bairu *et al.* (2011), salah satu faktor yang menyebabkan keragaman somaklonal adalah frekuensi dan lama subkultur. Frekuensi subkultur menjadi salah satu faktor yang dapat menginduksi terjadinya variasi somaklonal. Hal itu disebabkan semakin tinggi frekuensi subkultur, maka semakin lama durasi sel terpapar dengan berbagai faktor yang dapat menginduksi terjadinya mutasi selama proses *in vitro* (Peng *et al.*, 2005).

Semakin lama tanaman dibudidayakan secara *in vitro*, maka akan semakin besar variasi somaklonal terjadi. Selain itu, multiplikasi jaringan yang terjadi selama kultur, dapat mempengaruhi stabilitas genetiknya. Ini menunjukkan bahwa perubahan genetik yang disertai



Gambar 1. Keragaman Genetik Tanaman Anggur.

Keterangan: 1-10 : Sampel yang disubkultur 14 kali
 11-20 : Sampel yang disubkultur 15 kali
 21 : Sampel tanpa masa kultur

dengan variasi somaklonal dapat disebabkan oleh perubahan isi nukleotida DNA karena terjadinya mutasi (penyisipan / penghapusan). Terjadinya mutasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yang dapat menyebabkan kondisi stress selama masa kultur, seperti pelukaan pada jaringan eksplan, ketidakseimbangan komponen media seperti gula atau zat pengatur tumbuh (auksin dan sitokinin), lingkungan kultur in vitro (kondisi pencahayaan/fotoperiodisme, kelembaban maupun suhu yang tinggi) (Krishna et al., 2016).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa penanda molekuler ISSR dapat mendeteksi keragaman anggur yang dikonservasi secara kultur jaringan. Penanda molekuler ISSR mampu menghasilkan jumlah total pita polimorfis yang dihasilkan pada kelima primer sebanyak 34 buah, sedangkan jumlah total pita monomorfis yang dihasilkan pada kelima primer sebanyak 30 buah. Berdasarkan hasil analisis kluster *unweighted pair group method arithmetic averages* (UPGMA), diperoleh dendrogram keseragaman genetik tanaman anggur dengan tingkat keseragaman genetik

tanaman anggur berkisar antara 66 – 100% dan tingkat keragaman genetik tanaman anggur berkisar sebesar 0 - 34%. Perbedaan antara frekuensi subkultur menimbulkan keragaman pada tanaman anggur sebesar 34%.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiyani, M, L.D. Sulistyaningsih, Y.N. Esthi. 2014.** Keragaman genetik *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze (Taccaceae) dari beberapa provinsi di Indonesia berdasarkan marka inter simple sequence repeats (ISSR). *Jurnal Berita Biologi*. 13(1): 85-96.
- Bairu, M.W., A.O. Aremu, V.S. Johanes. 2011.** Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Journal Plant Growth Regulator*. 63(2): 147-173.
- Bani, P.W, B.S. Daryono, Purnomo. 2017.** Penanda molekuler inter simple sequence repeats untuk menentukan ketahanan tanaman jagung terhadap penyakit bulai. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 13(4):127-135.
- Dewi, N., I.S. Dewi, I. Roostika. 2014.** Pemanfaatan teknik kultur in vitro untuk konservasi plasma nutfah ubi-

- ubian. *Jurnal Agrobiogen* 10(1): 34-44.
- Gusmiaty, M. Restu, Asrianny, S.H. Larekeng. 2016.** Polimorfisme penanda RAPD untuk analisis keragaman genetik pinus merkusi di hutan pendidikan unhas. *Jurnal Natur Indonesia*. 16(2):47-53.
- Harahap, F. 2011.** Kultur jaringan tanaman. Unimed Press, Medan.
- Kawengian, Y.B., E. Lengkong, J Mandang. 2016.** Keragaman genetic beberapa varietas kentang (*Solanum tuberosum* L.) berdasarkan penanda random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal Biologos*. 6(2): 60-67.
- Krishna, H., M. Alizadeh, D. Singh, U. Singh, N. Chauhan, M. Eftekhari, R. Sath. 2016.** Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *Journal Biotechnology* 6(54): 53-70.
- Maulana, Z. 2017.** Keragaman plasma nutfah padi lokal Sulawesi Selatan. SAH Media, Makasar.
- Nugroho, K., R.T. Terryana, Reflinur, Asadi,P. Lestari 2016.** Metode ekstraksi DNA pada *Jatropha* spp. Tanpa menggunakan nitrogen cair. *Jurnal Littri*. 22(4):159-166.
- Nugroho, K., R. Terryana, P. Lestari. 2017.** Analisis keragaman genetik kedelai introduksi menggunakan marka mikrosatelit. *Jurnal Informatika Pertanian*. 26(2): 121-132.
- Peng, X., T. Xhang, J. Zhang. 2015.** Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyamum* callus. *Journal Plant Biotechnology* 122(1): 67-77.
- Sitinjak, R. 2010.** Pemanfaatan meristem dalam teknik kultur jaringan. *Jurnal Akademia*. 14(4): 56-59.
- Tasma, I.M. 2014.** Skrining marka SSR untuk analisis diversitas genetic aksesori kelapa sawit. *Jurnal Buletin Palma*. 15(1): 1-13.
- Trojanowska, M., dan H. Bolibok. 2004.** Characteristic and comparison of three classes of microsatellite based markers and their application in plants. *Journal Cellular and Molecular Biology Letters*. 9(2): 221-238.
- Yuliati, F., H. Arisah, D. Agisimanto. 2017.** Pengujian stabilitas genetic planlet citrumelo hasil ttcl dari kultur in vitro dengan menggunakan tekniksekuen berulang. *Jurnal Hortikultura* 27(2): 165-172.
- Zhou, Y., C. Zhou, H. Yao, Y. Liu, R. Tu. 2013.** Application of ISSR markers in detection of genetic variation among chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb) cultivars. *Journal Life Science*. 5(4): 6-12.