

## **ANALISIS KERAGAMAN GENETIK JATI ASAL SULAWESI SELATAN BERDASARKAN MARKA *SIMPLE SEQUENCE REPEAT* (SSR)**

### **ANALYSES OF GENETIC DIVERSITY OF TEAK FROM SOUTH SULAWESI BASED ON SSR MARKERS**

**<sup>1)</sup>Munarti, <sup>2)</sup>Sudarsono dan <sup>3)</sup>Satriyas Ilyas**

<sup>1)</sup> Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Pakuan, Bogor  
(email: [munarti99@yahoo.com](mailto:munarti99@yahoo.com), Tel : +62 815 1417 6870 )

<sup>2)</sup> Lab. Biologi Molekuler Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut  
Pertanian Bogor (IPB), Bogor

<sup>3)</sup> Lab Benih, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor

#### **ABSTRACT**

*Teak (Tectona grandis Linn.f) is one of a tree in the rain forest which most popular in the word and has high economic value. The objectives of research were revealed genetic diversity and SSR markers polymorphism levels of teak from South Sulawesi. Plant materials were used for this research from four location (Ceddie, Bilokka, Welongnge, Massepe). The SSR primers used were AC01, AG04, AG16, ATC02 and AGT10. Analysis of data were used Gene Pop ver.3.1b software, AMOVA dan NTSYS ver. 2.02. Results of research showed that alleles detected from five SSR loci were 19 alleles, and the number of alleles each locus range from 2 to 5. Polymorphic Information Content (PIC) value were the highest of ATC<sub>02</sub> (0.70), locus and highest average of genec diversity for overall loci was population from Massepe (0.663). AMOVA results showed the high percentage of variant were within population (93.75%), following by among within groups. Individuals grouping analysis of overall population were showed five main groups on the 0.50 genetic distance coefficient.*

**Keywords:** *Tectona grandis. L, genetic diversity, SSR markers*

#### **ABSTRAK**

Jati (*Tectona grandis* Linn.f) merupakan salah satu pohon hutan tropis yang terkenal di dunia dan bernilai ekonomi tinggi. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh informasi keragaman genetik dan tingkat polimorfisme marker SSR pada tanaman jati asal Sulawesi Selatan. Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini berasal dari empat lokasi (Ceddie, Bilokka, Welongnge, Massepe). Primer SSR yang digunakan yaitu AC01, AG04, AG16, ATC02 dan AGT10. Analisis data menggunakan Gene Pop ver.3.1b software, AMOVA dan NTSYS ver. 2.02. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada 19 alel yang terdeteksi pada lima lokus SSR. Jumlah alel tiap lokus minimum 2 dan maksimum 5 alel. Nilai *Polimorphic Information Content* (PIC) tertinggi pada lokus ATC02 yaitu 0.70, dengan rata-rata keragaman genetik tertinggi pada populasi pohon asal Massepe (0.663) untuk semua lokus. Analisis AMOVA menunjukkan komponen dan presentase ragam terbesar terdapat di dalam populasi (93.75%), dibanding antar populasi dalam grup. Analisis pengelompokan Individu untuk semua populasi menunjukkan lima kelompok utama pada koefisien jarak genetik 0.50.

**Kata Kunci :** *Tectona grandis. L, Keragaman genetik, marka SSR*

## 1. PENDAHULUAN

Jati (*Tectona grandis* Linn.f) termasuk jenis kayu daun lebar dari famili verbanaceae yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Jati memiliki prospek yang baik karena didukung oleh manfaat yang beragam disamping itu termasuk kayu berkualitas tinggi. Jati merupakan vegetasi alami pada hutan tropik yang meliputi India bagian tengah dan selatan, Myanmar, wilayah barat laut Thailand, Laos serta Indonesia (Kertadikara 1996).

Plasma nutfah merupakan sumber genetik yang perlu mendapat perhatian, tidak hanya mengumpulkan dan memelihara tetapi juga mengkarakterisasi keragaman genetiknya serta mengevaluasi sifat-sifat yang dikehendaki untuk dimanfaatkan dalam pemuliaan tanaman. Keragaman genetik secara konvensional dapat terjadi melalui persilangan maupun adanya mutasi. Dengan kemajuan teknologi keragaman genetik dapat terjadi melalui variasi somaklonal, fusi protoplas maupun transper gen (Bennett 1993). Kemajuan dibidang biologi molekuler telah memberikan sumbangan yang besar dalam studi keragaman genetik, dengan melakukan analisis pada tingkat molekul DNA. Teknik ini sangat membantu pemuliaan tanaman dalam melakukan studi genetik yang lebih akurat.

Penanda SSR mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan penanda molekuler lainnya yaitu secara genetik keragamannya tinggi, kodominan (Mitchell *et al.* 1997), SSR memungkinkan untuk mengidentifikasi banyaknya alel dalam satu lokus (Rongwen *et al.* 1995), menyebar pada seluruh genom dan analisisnya dapat dilakukan tanpa menggunakan radioaktif (Hopkins *et al.* 1999).

Keberadaan SSR yang berlimpah pada genom tanaman, tingkat polimorfisme yang tinggi dan mudah untuk dianalisis menyebabkan SSR banyak digunakan dalam kegiatan pemuliaan tanaman antara lain analisis keragaman genetik kapas (Liu *et al.* 2000), kedelai (Narvel *et al.* 2000), dan DNA ingerringing plasma nutfah anggur (Lamboy dan Alpha 1998). Disamping itu cocok digunakan sebagai *probe* (penanda) untuk mendeteksi introgresi gen padi liar kedalam kultivar padi budidaya (Aswidinnor *et al.* 1995) dan dapat digunakan untuk deteksi mutasi dan kejadian evolusi (Akagi *et al.* 1998).

Penelitian tentang keragaman genetik plasma nutfa jati asal Sulawesi Selatan pada tingkat DNA belum pernah dilakukan, berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keragaman genetik populasi tanaman jati asal Sulawesi Selatan berdasarkan marka SSR.

## 2. METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Biologi Molekuler Tanaman Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor (IPB). Bahan tanaman berupa daun muda yang diambil dari empat lokasi di Sulawesi Selatan (Massepe, Welongnge, Bilokka, Ceddie).

Pengambilan sampel dilakukan secara acak, masing-masing lokasi diambil 20 tanaman yang berumur  $\pm$  20 tahun (populasi *adult*) dan 20 tanaman disekitarnya yang berumur kurang dari 2 tahun (populasi *seedling*). Primer SSR yang digunakan yaitu AC01, AG04, AG16, ATC02 and AGT10 sedangkan metode pewarnaan menggunakan *silver staining*. Analisis data menggunakan software, AMOVA dan NTSYS ver. 2.02.

**Isolasi DNA.** Metode isolasi DNA dilakukan mengikuti prosedur *Cetyl Triethyl Ammonium Bromide* (CTAB) yang dikembangkan oleh Wilkie (1997) dan Wenzel *et al.* (1997) yang dimodifikasi. DNA yang diperoleh dilarutkan ke dalam 0.5 ml buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4; 1mM, EDTA pH 8.0). untuk menghilangkan RNA dari preparasi diinkubasi dengan RNase A (20  $\mu$ g/ml) pada suhu 37°C selama 60 menit. Kuantitas dan kemurnian DNA diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Kemurnian DNA berdasarkan nilai rasio  $A_{260}/A_{280}$  (Sambrook *et al.*, 1989).

**Amplifikasi DNA dengan PCR.** Amplifikasi DNA dilakukan menurut metode Song *et al.* (2003). Reaksi amplifikasi menggunakan 25  $\mu$ l campuran larutan yang mengandung 1x buffer PCR ( 10 mM KCl, 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM Tris-HCl, 20 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 % Triton X-100 pH 8.8, 1mM masing-masing dNTP, 0.1 $\mu$ M primer SSR, 20 ng DNA genom dan 0.5 unit taq DNA polymerase (Biolab). Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat Perkin-Elmer Cetus Gene Amp PCR System 2400. Denaturasi awal pada suhu 94° C, untuk amplifikasi suhu denaturasi 94° C selama 40 detik, suhu *annealing* 52° C 1 menit, perpanjangan primer 72° C 7 menit masing-masing 35 siklus.

**Elektroforesis gel polyacrilamid.** DNA hasil PCR dicampur dengan 3  $\mu$ l *loading buffer* (80 % formamide, 10 mM EDTA, 1 mg/ml xylene cyanol FF, 1 mg/ml bromophenol blue) kemudian didenaturasi selama 5 menit pada suhu 95° C, 3  $\mu$ l campuran reaksi tersebut digunakan untuk elektroforesis pada gel polyakrilamid 6 % dengan 1 x buffer TBE (89 mM Tris – Base, 89 mM asam borate, 2 mM EDTA pH 8.0. Kondisi elektroforesis menggunakan 2000 V dan suhu 55° C selama dua jam, pita DNA hasil amplifikasi divisualisasi dengan metode *silver staining* (Caetano dan Peter 1994).

**Analisis data.** Pita DNA hasil *silver staining* diskor menggunakan kode biner (1/0) 1 jika ada pita dan 0 jika tidak ada pita. Penentuan keragaman genetik didalam dan antar populasi menggunakan Gene Pop ver.3.1b, Analisis Molekuler Varian (AMOVA) dengan

software arlequin v.2000. Estimasi kesamaan genetik dibuat dalam bentuk matriks dengan *similarity for qualitative data* (SIMQUAL) merupakan sub program *similarity and dissimilarity*. Klustering dengan sub program SAHN Clustering metode *Klaster Unweighted Pair Group Method With Arithmetic* (UPGMA) program NTSYS pc. versi 2.02.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1. Distribusi frekuensi alel

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa jumlah alel yang ditemukan pada setiap lokus SSR adalah minimum 2 alel dan maksimum 5 alel. Jumlah alel tertinggi pada lokus ATC02 (5 alel) pada hampir semua populasi yang dianalisis (Tabel1).

Tabel 1. Jumlah dan rata-rata frekuensi alel SSR pada delapan populasi jati asal Sulawesi Selatan

Lokus	Alel	Populasi								X <sup>a</sup>
		AC	CS	AB	SB	AW	SW	AM	SM	
AC <sub>01</sub>		N=16	N=18	N=15	N=18	N=14**	N=14**	N=15**	N=15**	
	1	0.094	0.139	0.1	0.083	0	0.036	0.233	0.3	0.123
	2	0.094	0.111	0.067	0.056	0.286	0.286	0.2	0.067	0.146
	3	0.656	0.694	0.8	0.806	0.607	0.536	0.467	0.633	0.649
	4	0.156	0.056	0.033	0.056	0.107	0.143	0.1	0	0.081
AG <sub>04</sub>		N=16	N=15	N=19**	N=17**	N=16	N=10	N=8	N=11	
	1	0.5	0.667	0.395	0.294	0.656	0.4	0.563	0.682	0.519
	2	0.313	0.1	0.526	0.471	0.188	0.4	0.188	0.273	0.307
	3	0.156	0.167	0.079	0.206	0.156	0.2	0.188	0.045	0.149
	4	0.031	0.067	0	0.029	0	0	0.063	0	0.024
AG <sub>16</sub>		N=11	N=18	N=9	N=19	N=17	N=4	N=11	N=5	
	1	0.5	0.444	0.278	0.342	0.441	0.75	0.409	0.5	0.458
	2	0.273	0.25	0.167	0.526	0.412	0.125	0.273	0.3	0.291
	3	0.227	0.278	0.556	0.132	0.147	0.125	0.318	0.2	0.248
	4	0	0.028	0	0	0	0	0	0	0.004
ATC <sub>02</sub>		N=18	N=20	N=16	N=19	N=13**	N=16**	N=14**	N=12**	
	1	0.306	0.225	0.313	0.132	0	0.313	0.143	0.167	0.199
	2	0.083	0.15	0.156	0.079	0.192	0.125	0.25	0.167	0.150
	3	0.194	0.35	0.125	0.342	0.5	0.438	0.321	0.417	0.336
	4	0.278	0.075	0.219	0.263	0.308	0.125	0.25	0.167	0.211

	5	0.139	0.2	0.188	0.184	0	0	0.036	0.083	0.104
AGT <sub>10</sub>		N=19**	N=19**	N=20**	N=20**	N=19**	N=18**	N=19**	N=20**	
	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Keterangan: AC (*adult* Ceddie), SC (*seedling* Ceddie), AB (*adult* Bilokka), SB (*seedling* Bilokka), AW (*adult* Welongnge), SW (*seedling* Welongnge), AM (*adult* Masepe), SM (*seedling* Masepe).

$X^a$  = rata-rata frekuensi alel semua populasi

\*\* = Nyata menyimpang dari kesetimbangan Hardy-Weinberg

Alel 3 pada lokus AC01 mempunyai peluang lebih besar karena mempunyai rata-rata frekuensi yang lebih besar dibanding alel yang sama pada lokus yang lain. Alel 4 pada lokus AG16 kemungkinan alel spesifik karena hanya ditemukan pada populasi bibit asal Ceddie sedangkan pada populasi yang lain tidak ditemukan. Penambahan alel di lokus AC01 dan ATC02 ditemukan pada populasi *seedling* asal Welongnge yaitu ada 4 alel sedangkan pada populasi *adult* pada lokasi yang sama hanya 3 alel.

### 3.2 Tingkat Polimorfisme Lokus SSR

Tingkat polimorfisme masing-masing lokus dihitung menggunakan *Polimorphic Information Content* (PIC) berdasarkan frekuensi pola pita diantara genotipe. Nilai PIC diindikasikan berapa banyak populasi yang heterogenus untuk satu lokus spesifik. Nilai PIC yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 0.37 sampai 0.70 dengan rata-rata 0.52 (tabel 2), nilai PIC tertinggi pada lokus ATC02 dibanding lokus yang lain.

Tabel 2. Tingkat polimorfisme marker SSR pada populasi jati asal Sulawesi Selatan

Lokus SSR	Jumlah alel	PIC
AC01	4	0.45
AG04	4	0.53
AG16	4	0.55
ATC02	5	0.70
AGT10	2	0.37
Rata-rata	3.8	0.52

Menurut Kim *et al.* (2002) nilai PIC yang lebih besar dari 0.75 maka pada lokus tersebut dianggap lebih informatif. Rendahnya nilai PIC yang diperoleh pada penelitian ini kemungkinan jumlah sampel yang digunakan lebih sedikit, kemungkinan lain disebabkan oleh perkawinan antar kerabat yang mempunyai genotipe yang hampir sama ataupun jumlah penada yang digunakan sedikit.

### 3.3 Keragaman Populasi Tanaman Jati

Hasil analisis Molekuler Varian (AMOVA) menunjukkan bahwa sumber keragaman tertinggi terdapat dalam populasi dengan persentase 93.75 % untuk populasi *adult*. Sedangkan persentasi ragam antar grup dan antar populasi dalam grup itu sendiri hanya menyumbang 2.57 % dan 3.68 % terhadap total keragaman (tabel 3). Keragaman tertinggi pada populasi *seedling* juga terdapat dalam populasi yaitu 92.74 %, sedikit lebih rendah dari pada persentasi ragam pada populasi *adult* (tabel 4). Populasi *adult* dan *seedling* mempunyai variasi yang tinggi diantara individu tanaman dibanding antar grup dan antar populasi dalam grup. Persentase ragam pada populasi *adult* dan populasi *seedling* tidak jauh berbeda, kemungkinan bahwa populasi *seedling* tersebut masih keturunan dari populasi *adult* yang ada pada lokasi yang sama sehingga tidak menambah keragaman dalam populasi.

Tabel 3. Analisis molekuler varian (AMOVA) populasi *adult* berdasarkan lima lokus SSR

Sumber Keragaman	d.b.	Jumlah Kuadrat	Komponen Ragam	Persentase Ragam	<i>P</i>
Antar grup	2	8.053	0.0453	2.57	0.00000
Antar populas dalam grup	1	2.922	0.0649	3.68	0.00040
Dalam populasi	74	122.474	1.6551	93.75	0.16881
Total	77	133.449	1.7654		

Persentase ragam dalam populasi yang diperoleh pada penelitian ini lebih tinggi dibanding penelitian sebelumnya tentang keragaman genetik gandum menggunakan penanda SSR yaitu hanya 54 % variasi yang ditemukan dalam aksesi (Dean *et al.* 1999).

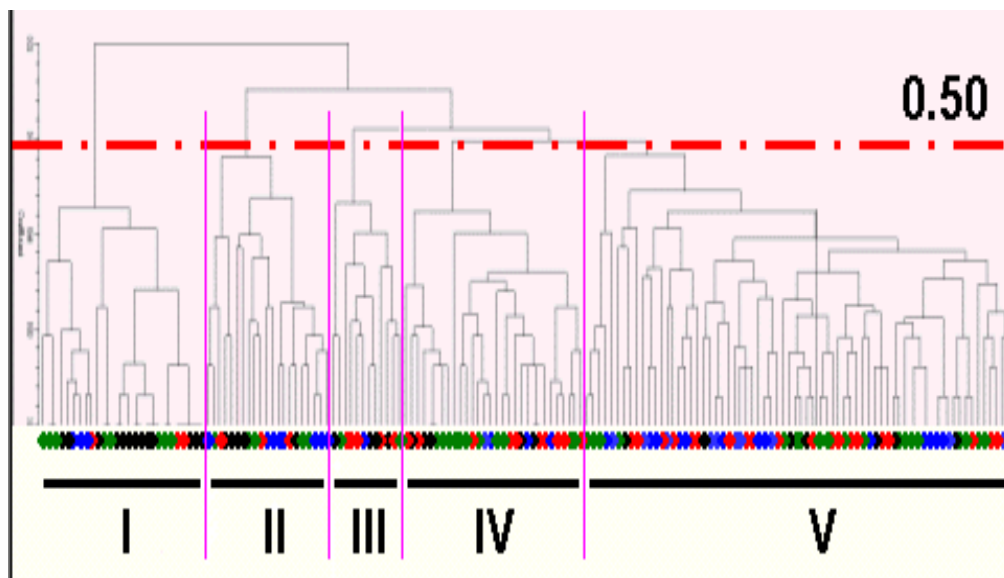
Tabel 4. Analisis molekuler varian (AMOVA) populasi *seedling* berdasarkan lima lokus SSR

Sumber Keragaman	d.b.	Jumlah Kuadrat	Komponen Ragam	Persentase Ragam	<i>P</i>
Antar grup	2	14.462	0.0053	0.17	0.00000
Antar populasi dalam grup	1	7.100	0.2146	7.09	0.00079
Dalam populasi	76	213.450	2.8086	92.74	0.16772
Total	79	235.012	3.0284		

Analisis pengelompokan (dendogram) untuk semua populasi yang dianalisis menunjukkan bahwa individu dari setiap populasi mengelompok secara acak, tiap kelompok utama terdapat individu yang mewakili tiap lokasi dari populasi, meskipun tiap lokasi terpisah sekitar  $\pm 30$  km (gambar 1). Penelitian sebelumnya pada populasi *Shorea leprosula* dilaporkan bahwa populasi yang ada di Bukit Perak dengan populasi yang ada di Panti secara genetik hampir sama meskipun kedua populasi tersebut terpisah 920 km (Lee *et al.* 2000). Berdasarkan penelitian ini ternyata bahwa genotipe individu tidak dipengaruhi oleh tempat, dalam hal ini genotipe individu tidak spesifik lokasi. Dendogram juga menunjukkan bahwa pada koefisien 0.50 terdapat lima kelompok utama yang terbagi

lagi kedalam sub kelompok kecil dengan jarak genetik yang bervariasi.

Jarak genetik akan berpengaruh terhadap struktur dan variasi genetik selain itu pengaruh sistem perkawinan menyebabkan terjadinya rekombinasi alel-alel dari tetua jantan dan betina akibatnya akan membentuk struktur dan variasi genetik yang berbeda antar populasi induk dan keturunan. Persilangan antara individu yang memiliki jarak genetik cukup dekat akan mengakibatkan terjadinya peristiwa silang dalam (*inbreeding*).



- ◆ = Populasi asal Ceddie, ◆ = Populasi asal Bilokka, ◆ = Populasi asal Welongnge,
- ◆ = Populasi asal Masepe

Gambar 1. Dendrogram individu populasi tanaman jati asal Sulawesi Selatan

#### 4. KESIMPULAN DAN PROSPEK

Penggunaan marker SSR pada penelitian ini menunjukkan bahwa dari lima lokus SSR yang digunakan pada populasi tanaman jati yang berasal dari empat lokasi yang berbeda di Sulawesi Selatan hanya empat yang polimorfis. Jumlah alel dan nilai polimorfisme (PIC) tertinggi terdapat pada lokus ATC<sub>02</sub>. Jumlah alel yang diperoleh pada penelitian ini adalah 2 sampai 5 alel dengan rata-rata 3.8 alel per lokus. Analisis AMOVA menunjukkan individu dalam populasi menyumbang keragaman yang terbesar baik populasi pohon maupun populasi bibit.



Analisis pengelompokan menunjukkan bahwa individu dari lokasi yang berbeda membentuk kelompok bersama dengan jarak genetik yang dekat. Sistem pengelompokan tersebut menunjukkan bahwa individu yang dianalisis dari lokasi yang berbeda kemungkinan berasal dari tetua yang sama dengan basis genetik yang sempit.

Tanaman jati yang ada di Sulawesi Selatan perlu dieksplorasi kemungkinannya untuk dijadikan lokasi konservasi *in situ* karena memiliki nilai keragaman genetik yang tinggi dan dapat dijadikan sebagai sumber bahan genetik yang dapat di simpan di lokasi lain yang sesuai dengan kondisi alaminya sebagai upaya konservasi *ex situ*.

## 5. DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Akagi H Y, Yokozeki A. Inagaki T, Fujimura.. Oringin and evalution of twin microsatellites in the genus *Oryza*. *Heredity*1998. 81:187–197.
- [2]. Aswidinnoor H, Nelson RJ, Gustafson JP. . Genome specific repetitive DNA probes Detect Introgression of *Oryza minuta* genome into cultivated rice, *Oryza sativa*. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology Biotechnology* 1995. 3:3(215-223).
- [3]. Bennett J. Maps and Markers. P 7-13. In genome analysis of plants, pestsand pathogens. Workshop Handbook, Central Research Institute for Food Crops Bogor, Indonesia 14-16 Juni 1993. IRRI Manila.
- [4].Caetano G, Peter MG. Staining nucleic acids with silver :An alternative to radioisotopic and Fluorescent labeling 1994.Promega note magaine number 45, p. 13.
- [5]. Dean RE, Dahlberg JA, Hopkins Ms, Mitchell SE, Kresuvich S.Genetic redundancy and diversity among ‘orange’ accessions in the U.S.National sorghum collection as assessed with simple sequence repeat (SSR) markers. *Crop sci* 1999.39 :1215-1221.
- [6]. Hopkins MS et al. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. *Crop Sci* 1999.. 39:1243-1247.
- [7]. Kertadikara AWS and Prat D. Gene diversity study based on isozyme analysis in teak (*Tectona grandis* L.f) provenance. In : TJB Boyle, Boontawee B (editor). *Measuring and monitoring Biodivrtsity in tropical and temperate forests France* 1997.. Hlm 227-235.
- [8]. Kim H, Geun Park K, Bum Baek S, Jung Suh, Hyun Nam J. Genetic diversity of barley cultivars as revealed by SSR markers. 2002.

- [9]. Lamboy WF, Alpha CG. Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting accession of grape (*Vitis* L) species. *J.Amer.Soc.Hort.Sci* 1998. 123: 182-188.
- [10]. Lee SL, Wickneswari R, Mahani MC, Zakri AH. Genetic diversity of tropical tree species, *Sorea leprosula* Miq (Dipterocarpaceae), in Malaysia : Implication for conservation of genetic Resource and tree improvement. *Biotropica* 2000.32(2): 213-224.
- [11]. Liu S, Cantrell RG, Stewart J. Simple sequence repeat based assessment of genetic diversity in cotton race stock accessions. *Crop Sci* 2000.. 40:1459-1469.
- [12]. Mitchell SE, Kresovich S, Jester CA, Hernandez CJ. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. *Crop Sci* 1997.. 37:617-624.
- [13]. Narvel JM, Fehr WR, Chu WC, Grant D, Shoemaker RC. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introduction and elite genotype. *Crop Science* 2000. 40:1452-1458.
- [14]. Rongwen J, Akkaya MS, Bhagwat AA, Lavi U, Cregan PB. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor Appl Genet* 1995.. 90:43-48.
- [15]. Sambrook J, Fritsh E H, Maniatis T. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbar Laboratory Press New York 1989.. 568p.
- [16]. Song ZP, Wang XB, Chen JK, Lu BR. Genetic diversity in the northern most *Oriza rufipogon* population estimated by SSR markers. *Theor Appl.Genet* 2003.. 107: 1492-1499.
- [17]. Wenzel G, Lossl A, Pryanto B. DNA Isolation from Plant Material. A. BTIG Training Course, Puspiptek Serpong 1997. 11p.
- [18]. Wilkie S. Isolation of total genomic DNA. *Plant Molecular Biology. A Laboratory Manual* 1997.Pp.3-1