

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/325617593>

ANALISIS FILOGENETIK BEBERAPA KLON KARET DENGAN MARKA AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) Phylogenetic Analysis of Rubber Tree Clones using AFLP (Amplified Fragment Lengt...

Article · June 2018

CITATIONS
0

READS
355

1 author:



[Devit Purwoko](#)

Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

17 PUBLICATIONS 1 CITATION

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



IMPROVEMENT OF CULTURE EFFICIENCY OF PALM OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq.) THROUGH EMBRIOGENESIS WITH TRANSCRIPOTOMIC ANALYSIS [View project](#)



Development SSR marker based on NGS data [View project](#)



ANALISIS FILOGENETIK BEBERAPA KLON KARET DENGAN MARKA AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

Phylogenetic Analysis of Rubber Tree Clones using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Marker

Juniza Firdha Suparningtyas¹, Okky Dwi Pramudyawardhani², Devit Purwoko³, Teuku Tajuddin^{3*}

¹Departemen Biokimia FMIPA Institut Pertanian Bogor. Jl Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

²Bioteknologi FST Universitas Al Azhar Indonesia. Jl Sisingamangaraja Jakarta Selatan 12110

³Balai Bioteknologi BPPT. Gedung 630 Kawasan PUSPIPTEK, Tangerang Selatan, Banten 15314

*Email: teuku.tajuddin@bppt.go.id

ABSTRACT

National rubber productivity is lower than other rubber producing countries in the world. The DNA marker-based plant breeding program is required to increase latex production and other superior characters. Breeding process by identifying genetic diversity can be done using AFLP marker. The aim of this study was to analyze the phylogenetic six rubber clones. Pre-amplification and amplification process were performed using 64 primer pair combinations followed by electrophoresis in 6% polyacrylamide gel. A total of 2806 AFLP fragments have been detected. Phylogenetic tree of six clones showed 60% of genetic similarity, which was consisted of two groups. GT 1 clone in the first group and was separated from other clones in the second group. Sub-group at the phylogenetic peak contained IRR 104 and RRIM 600 clones with genetic similarity of 74%. The information obtained from this study showed the genetic diversity of the six rubber clones. The unique bands were obtained as marker specific which could be used to identify clones.

Keywords: AFLP, DNA marker, phylogenetic tree, polymorphism, rubber clones

ABSTRAK

Produktivitas karet nasional masih lebih rendah dibanding dengan negara-negara penghasil karet lainnya di dunia. Diperlukan program pemuliaan tanaman karet yang berbasis marka DNA untuk meningkatkan produksi lateks serta karakter unggul lainnya. Proses pemuliaan untuk mengidentifikasi keragaman genetik bisa dilakukan dengan marka AFLP. Tujuan studi ini adalah untuk menganalisis filogenetik enam klon karet berdasarkan produktivitasnya. Proses pre-amplifikasi dan amplifikasi dilakukan dengan menggunakan 64 kombinasi pasangan primer yang dilanjutkan dengan analisis hasil elektroforesis pada gel poliakrilamid 6%. Sebanyak 2806 pita AFLP telah dihasilkan. Keekerabatan keenam klon menunjukkan kemiripan genetik sebesar 60%. Pohon filogenetik membentuk dua kelompok, yang memisahkan GT 1 dengan klon-klon lainnya. Sub-kelompok pada puncak filogenetik terdiri dari klon IRR 104 dan RRIM 600 dengan kemiripan genetik sebesar 74%. Informasi yang diperoleh telah menunjukkan keragaman genetik keenam klon karet yang bersifat polimorfis. Diperoleh pita-pita unik dari pasangan primer tertentu yang dapat berperan sebagai marka spesifik dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi klon.

Kata Kunci: AFLP, klon karet, marka DNA, pohon filogenetik, polimorfisme,

PENDAHULUAN

Tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) adalah komoditi perkebunan penghasil lateks sebagai sumber bahan baku industri otomotif. Lateks atau karet alam memiliki kualitas yang lebih baik dari pada karet sintetik, karena daya elastisitasnya yang lebih tinggi. Karet alam tidak mudah panas, mempunyai daya aus tinggi, serta bersifat plastisitas sehingga pengolahannya menjadi lebih mudah, khususnya bagi industri ban pesawat udara dan mobil balap. Disamping itu karet alam memiliki daya tahan yang tinggi terhadap keretakan (Bueche 1957; Shan et al. 2011).

Produksi karet alam ikut berkontribusi bagi pertumbuhan ekonomi nasional sebagai sumber devisa nonmigas dan turut serta dalam pelestarian fungsi lingkungan hidup. Indonesia adalah negara penghasil karet alam kedua terbesar di dunia setelah Thailand (Rubber Board 2016). Walaupun Indonesia memiliki luas kebun karet terbesar di dunia (3,6 juta hektar) namun produktivitasnya rendah, hanya 1 ton/ha. Produktivitas ini masih berada di bawah negara-negara penghasil karet lainnya di dunia, seperti Viet Nam (1,7 ton/ha), Thailand (1,6 ton/ha), dan Malaysia (1,3 ton/ha) (Kementerian Pertanian 2015). Inti dari permasalahan ini bermula dari kurangnya perhatian pemerintah terhadap komoditi karet, walaupun sebenarnya karet termasuk dalam daftar 15 komoditi yang menjadi prioritas di Dirjenbun Kementan (Dirjenbun 2015). Selanjutnya juga dikemukakan bahwa 85% perkebunan karet di Indonesia adalah milik rakyat (Kementerian Pertanian 2015). Namun umumnya perkebunan rakyat ini kurang produktif dan hanya setengah dari mereka yang memiliki akses pada teknologi budidaya, penanggulangan penyakit maupun bibit unggul (Damanik et al. 2010). Pada tahun 2012 sampai dengan 2014, peningkatan ekspor karet cukup signifikan dari 2.445 ribu ton meningkat menjadi 2.624 ribu ton. Namun demikian nilai jualnya mengalami penurunan, senilai USD 7.861 miliar pada tahun 2012 menjadi USD 4.742 miliar pada tahun 2014 (Dirjenbun 2016). Demi menyusun program pemuliaan tanaman karet yang berbasis marka DNA untuk meningkatkan produksi lateks

nasional, diperlukan klon-klon karet unggul yang memiliki keunggulan genetik yang tinggi terutama pada karakter yang berkaitan dengan daya produktivitas hasil tanaman dan ketahanan terhadap serangan penyakit.

Keberagaman genotipe plasma nutfah tanaman karet merupakan modal dasar untuk keberhasilan program pemuliaan dalam pengembangan tanaman unggul sebagai upaya meningkatkan kapasitas produksi lateks. Teknik pemuliaan tanaman dalam perolehan bibit unggul yang lebih cepat sangat diperlukan mengingat teknik pemuliaan tanaman secara konvensional memerlukan waktu seleksi yang panjang hingga 20-25 tahun, sejak persilangan sampai menghasilkan produk klon unggul. Sebagai alternatif untuk memanfaatkan keunggulan biologi molekuler adalah pemuliaan tanaman yang dipandu dengan marka DNA yang hanya membutuhkan waktu sepertiganya, yaitu 7-8 tahun (Collard and Mackill 2008; Jiang 2013). Dengan demikian dapat melengkapi pengembangan dalam pemuliaan tanaman karet yang unggul dan potensial secara cepat. Pemilihan marka DNA yang digunakan dalam analisis genetik perlu mempertimbangkan tujuan yang diinginkan, fasilitas laboratorium yang tersedia serta kelebihan dan kekurangan dari berbagai marka DNA tersebut. Marka DNA yang ideal adalah memiliki kemudahan akses, kemudahan prosedur analisis, polimorfisme yang tinggi, ko-dominan yang dapat membedakan antara homozigot dan heterozigot, serta tingkat pengulangannya yang tinggi.

Studi keragaman genetik pada karet telah dilakukan oleh beberapa peneliti dengan menggunakan beragam marka DNA, yaitu: marka *intron length polymorphism* atau ILP (Li et al. 2013), *Random Amplified Polymorphic DNA* atau RAPD (Wibowo 2010; Novalina dan Sagala 2011), marka isozim dan mikrosatelit (Gouvea et al. 2010; Le Guen et al. 2011), marka *simple sequence repeat* atau SSR (Feng et al. 2012; Hamzah 2014), dan marka EST-SSR (Feng et al. 2009; Yu et al. 2010; Perseguini et al. 2012). Menurut Toruan-Mathius et al. (2002) hasil yang diperoleh dari teknik RAPD tidak konsisten. Hal ini disebabkan oleh rendahnya akurasi dalam pengulangan hasil amplifikasi, sedikitnya jumlah fragmen DNA

yang diperoleh dari primer yang digunakan dan jumlah lokus yang dihasilkan, serta rendahnya tingkat diferensiasi dalam analisis dendrogram klon karet. Dengan demikian hasil setiap kelompok klon karet kurang terpisah dengan baik. Pada penelitian ini digunakan marka AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) karena memiliki tingkat pengulangan dengan derajat kekonsistenan hasil yang tinggi, dapat membedakan homozigot dan heterozigot (Wooten et al. 2009), keragaman tanaman dengan pola sidik jari DNA spesifik (Tajuddin et al. 2012) serta biaya awal (*start-up cost*) yang tidak begitu mahal dan tidak membutuhkan informasi sekuens awal dibanding SSR dan SNP (Jiang 2013). Marka AFLP juga telah digunakan pada tanaman karet (Nurhaimi-Haris et al. 2003; Xiao et al. 2009; Roy et al. 2012; Tang et al. 2013). Menurut Kuck et al. (2012) kelebihan dari marka AFLP dapat mendeteksi variasi dan keragaman genetik antar populasi, individu, serta spesies berdasarkan perbedaan letak basa tertentu dari marka DNA dalam genom tanaman.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis keragaman genetik dari enam klon tanaman karet dengan menggunakan marka AFLP. Selain itu juga untuk masing klon. Manfaat yang diharapkan dari studi ini

adalah untuk dapat menjadi acuan dalam pemilihan tetua atau induk untuk persilangan klon selanjutnya, dan primer selektif yang diperoleh dapat digunakan di lapang untuk memandu pada tahap seleksi pada program pemuliaan berikutnya.

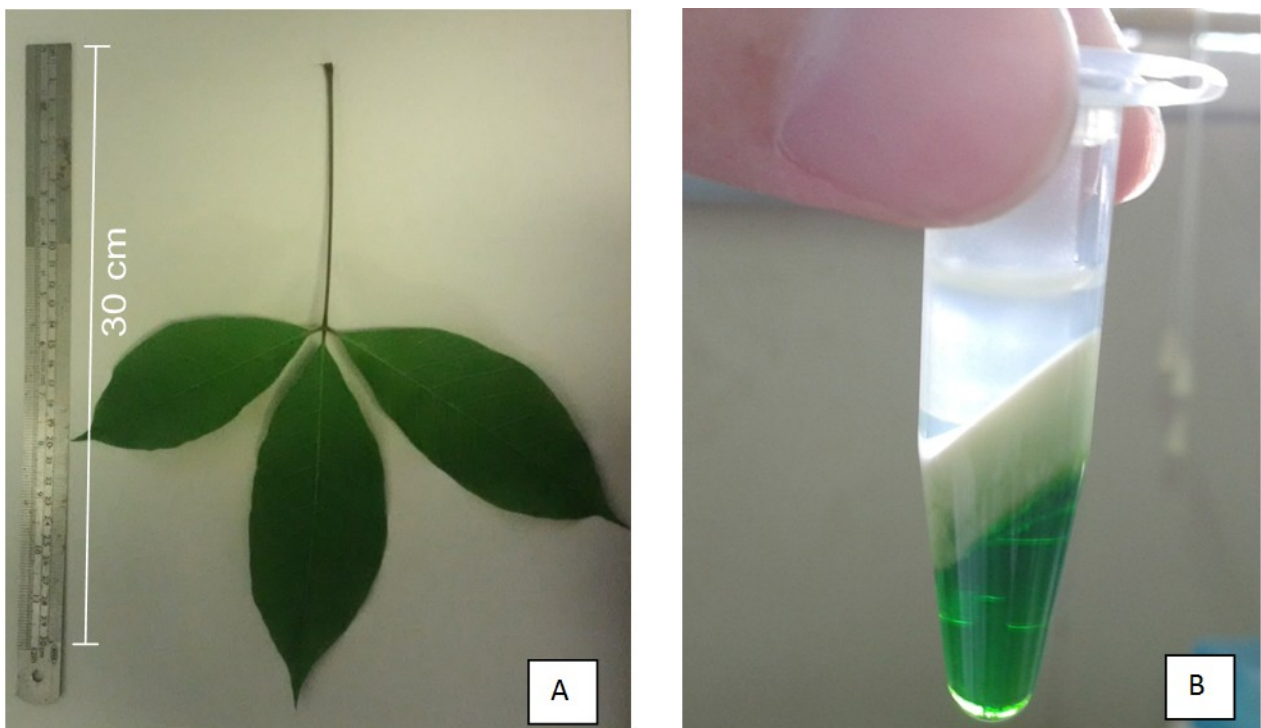
BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman

Bahan tanaman karet yang digunakan adalah klon GT 1, IRR 104, PB 260, PR 300, RRIC 100 dan RRIM 600, dengan produktivitas yang bervariasi yang berumur lebih dari 15 tahun dan ditanam di lahan kebun koleksi Balai Bioteknologi BPPT.

Analisis kuantitatif dan kualitatif

Isolasi DNA genom karet dilakukan dengan metode CTAB (Doyle 1990) dengan beberapa modifikasi menggunakan sampel daun (Gambar 1). Modifikasi dilakukan pada penambahan jumlah merkuptoetanol menjadi 1% dan aplikasinya dipisah dari buffer ekstraksi. Rasio kemurnian DNA terhadap kontaminasi protein dan konsentrasi DNA hasil isolasi diuji menggunakan spektrofotometer Nanodrop yang diukur pada perbandingan panjang gelombang 260 dan 280 nm (A_{260}/A_{280}).



Gambar 1. (A). Sampel daun karet dan (B). pemisahan DNA karet dalam tube

Setiap sampel DNA hasil isolasi diambil sebanyak 4 µL untuk dilakukan pemisahan pada elektroforesis gel agarosa konsentrasi 1,5% dalam bufer TE 1X dengan daya 50 V selama 50 menit dan menggunakan pewarna SYBR safe (Bakhtiar et al. 2010).

Analisis polimorfisme DNA

Metode AFLP yang digunakan berdasarkan pada metode Vuylsteke et al. (2007). Setelah proses amplifikasi, produk pre-amplifikasi primer tunggal diamplifikasi selektif menggunakan kombinasi pasangan primer (Tabel 1).

Sebanyak 1 µL produk pre-amplifikasi ditambah dengan 2,5 µL buffer PCR 10x, 2 µL dNTP campuran, 2,5 µL 25 mM MgCl₂, 0,2 µL Taq polymerase, primer terpilih 10 pmol Trul dan 10 pmol EcoRI masing-masing 1 µL, dan 14,8 µL ddH₂O sampai volume mencapai 25 µL. Larutan kemudian diaduk secara perlahan dan disentrifugasi singkat untuk menurunkan seluruh cairan

Tabel 1. Pasangan primer amplifikasi selektif

No	Primer	No	Primer
1.	M-CAA E-AAC	33.	M-CTA E-AAC
2.	E-AAG	34.	E-AAG
3.	E-ACA	35.	E-ACA
4.	E-ACC	36.	E-ACC
5.	E-ACG	37.	E-ACG
6.	E-ACT	38.	E-ACT
7.	E-AGC	39.	E-AGC
8.	E-AGG	40.	E-AGG
9.	M-CAC E-AAC	41.	M-CTC E-AAC
10.	E-AAG	42.	E-AAG
11.	E-ACA	43.	E-ACA
12.	E-ACC	44.	E-ACC
13.	E-ACG	45.	E-ACG
14.	E-ACT	46.	E-ACT
15.	E-AGC	47.	E-AGC
16.	E-AGG	48.	E-AGG
17.	M-CAG E-AAC	49.	M-CTG E-AAC
18.	E-AAG	50.	E-AAG
19.	E-ACA	51.	E-ACA
20.	E-ACC	52.	E-ACC
21.	E-ACG	53.	E-ACG
22.	E-ACT	54.	E-ACT
23.	E-AGC	55.	E-AGC
24.	E-AGG	56.	E-AGG
25.	M-CAT E-AAC	57.	M-CTT E-AAC
26.	E-AAG	58.	E-AAG
27.	E-ACA	59.	E-ACA
28.	E-ACC	60.	E-ACC
29.	E-ACG	61.	E-ACG
30.	E-ACT	62.	E-ACT
31.	E-AGC	63.	E-AGC
32.	E-AGG	64.	E-AGG

yang ada di dinding tabung. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan PCR. Program yang digunakan adalah sebagai berikut: satu siklus 94°C selama 2 menit, 94°C selama 30 detik, 65°C selama 30 detik dan 72°C selama 2 menit. Tahap berikutnya adalah suhu penempelan (*annealing*) yang diturunkan 0,7°C selama 60 detik dan diakhiri dengan suhu 4°C.

Elektroforesis gel poliakrilamid

Produk amplifikasi PCR dielektroforesis pada gel poliakrilamid 6% (0,1% ammonium persulfat (APS) dan TEMED) dengan ukuran 13 x 11 Cm. Pre-elektroforesis (pemanasan) dilakukan selama 20 menit (110 W) supaya suhu permukaan gel kira-kira 50°C. Hasil amplifikasi PCR dicampur dengan 20 µL loading buffer dan 19 µL H₂O, kemudian didenaturasi pada suhu 95°C selama tiga menit dan segera didinginkan di dalam lemari es. Larutan sampel sebanyak 10 µL, dimasukkan pada setiap sumur gel dan dielektroforesis selama ±40 menit (80 W). Gel poliakrilamid kemudian diwarnai dengan larutan perak nitrat di atas *shaker* selama 30 menit, dicuci dengan dH₂O bebas ion selama 10 detik, kemudian ditambah larutan pengembang (45 g sodium karbonat; 2,25 mL formaldehid 37%; 300 µL sodium tiosulfat dalam 1500 mL ddH₂O pada suhu 4–10°C) dan dibiarkan hingga fragmen-fragmen dapat dilihat sesuai yang diinginkan. Selanjutnya larutan fiksasi dituangkan dan dibiarkan selama dua menit, dan dilapis dengan *cellophane membrane backing* (BIORAD), serta dibiarkan selama lebih kurang dua hari sampai kering.

Analisis data

Pita-pita DNA diubah ke dalam bentuk data biner dengan memberi nilai 1 jika munculnya pita DNA dan 0 jika tidak ada pita. Data biner yang diperoleh dari AFLP tersebut selanjutnya digunakan dalam analisis keragaman genetik, kemiripan genetik dibuat dalam bentuk matriks dengan SIMQUAL (*similarity for qualitative data*). Berdasarkan nilai kemiripan genetik tersebut dilakukan analisis pengelompokan menggunakan sub program SAHN dengan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Average*) program NTSYS-pc 2.11.

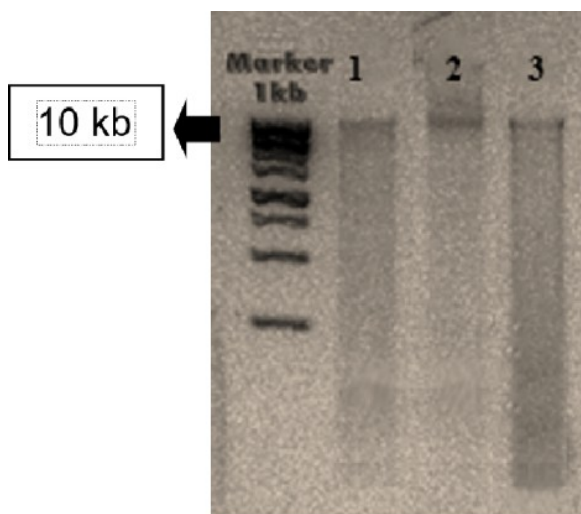
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA tanaman karet

Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi dari klon-klon karet diperoleh nilai yang sangat baik. Nilai tertinggi diperoleh dari klon PB 260 dengan konsentrasi 4310,4 ng/μL, dan yang terendah adalah RRIC 100 dengan konsentrasi 905,8 ng/μL (Tabel 2). Rasio absorban pada 260 dan 280 nm digunakan untuk menilai kemurnian DNA. Sampel DNA akan dianggap murni apabila didapati rasio sekitar 1,8 – 2,0. Apabila rasio tersebut lebih tinggi, maka dapat diindikasikan adanya zat pengotor berupa protein, fenol atau kontaminan lain yang kuat serapannya pada 280 nm (Nanodrop Technology Inc 2007). Hal ini terjadi pada klon RRIC 100 dengan rasio kemurnian

Tabel 2. Konsentrasi dan kemurnian DNA tanaman karet hasil isolasi

Jenis Klon	Konsentrasi DNA maksimum (ng/μL)	Kemurnian (A260/A280)
GT 1	1374,3	1,61 - 2,02
IRR 104	1024,2	1,80 - 1,97
PB 260	4310,4	1,55 - 1,81
PR 300	4127,3	1,60 - 1,78
RRIC 100	905,8	2,05 - 2,17
RRIM 600	1259,5	1,70 - 2,04

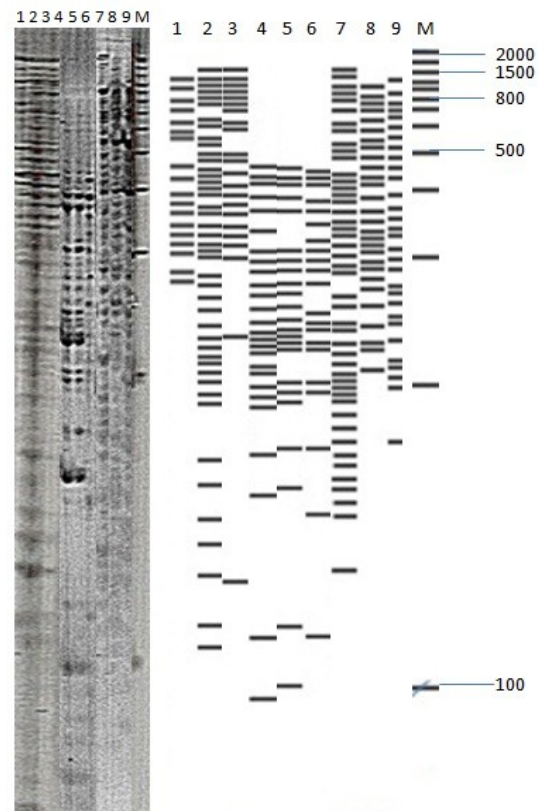


Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA isolasi (Marka 1 kb, 1-3: DNA klon IRR 104, klon RRIM 600, dan klon PR 300)

2,17 pada gelombang serapan A_{260}/A_{280} , yang muncul *smear* pada gel hasil elektroforesis yang diduga merupakan zat pengotor atau kontaminan (gambar tidak ditampilkan). Sedangkan apabila rasio lebih rendah dari kisaran 1,8 – 2,0 maka dapat diindikasikan adanya kontaminan berupa RNA pada sampel yang diuji (Nanodrop Technology Inc 2007). Selanjutnya hasil analisis kualitatif berupa elektroferogram menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi memiliki ukuran DNA genom sekitar 10 kb (Gambar 2).

Produk PCR AFLP tanaman karet

Hasil elektroforesis produk ligase pada tahap pre-amplifikasi dilakukan pengenceran 10x dan 1x (tanpa pengenceran). Hasilnya menunjukkan bahwa pita fragmen hasil pre-amplifikasi dengan tanpa pengenceran (1x) lebih jelas dibanding dengan pita fragmen pre-amplifikasi pengenceran 10x yang terlihat samar. Selanjutnya produk pre-amplifikasi yang digunakan pada tahap



Keterangan:
 Klon GT 1 (1)M-CAT/E-ACT (2)M-CAG/E-ACT (3)M-CTG/E-ACA
 Klon PB 260 (4)M-CAG/E-ACT (5)M-CTG/E-ACA (6)M-CAA/E-ACA
 Klon RRIC 100 (7)M-CTG/E-ACC (8)M-CAA/E-ACC (9)M-CTA/E-ACC

Gambar 3. Hasil elektroforesis gel poliakrilamid

amplifikasi selektif ialah hasil pre-amplifikasi dengan tanpa pengenceran, untuk memperoleh pita-pita AFLP yang optimal.

Dari tahap pre-amplifikasi kemudian dilanjutkan ke tahap amplifikasi menggunakan 64 kombinasi pasangan primer terhadap semua klon tanaman karet. Hasil amplifikasi divisualisasikan pada gel poliakrilamid 6%. Gel poliakrilamid dengan konsentrasi 6% direkomendasikan untuk memisahkan fragmen DNA sebesar 80 – 800 bp (Barril dan Nates 2012). Menurut Nurhaimi-Haris et al. (2003), proses *silver staining* telah menunjukkan hasil yang lebih baik ketika memvisualisasi fragmen-fragmen AFLP yang berasal dari daun karet melalui gel poliakrilamid. Gambar 3 memperlihatkan pita-pita DNA yang terlihat pada GT 1, PB 260, dan RRIC 100 hasil beberapa pasang primer selektif bersama dengan marka *Thermo Scientific Fermentas Gene Ruller* 100 bp serta replika yang dibuat secara manual.

Berdasarkan dari pengukuran pita menggunakan marka *Thermo Scientific Fermentas Gene Ruller* 100 bp dan dengan aplikasi program komputer PhotocaptMw versi 99.0.2.0, hasil pita yang didapatkan dari 64 pasang primer adalah 2806 pita. Ukuran pita berkisar antara 65 – 3833 bp.

Dari elektroferogram AFLP dihasilkan jumlah pita AFLP terbanyak adalah 24 pita yang berasal dari amplifikasi M-CAT/E-AAG pada klon PR 300 (tidak ditampilkan). Klon

IRR 104 menghasilkan 10 pita oleh primer M-CAC/E-AGG dan M-CAT/E-ACA. Selanjutnya, pita klon RRIM 600 diperoleh sejumlah 23 pita oleh primer M-CAC/E-AAG.

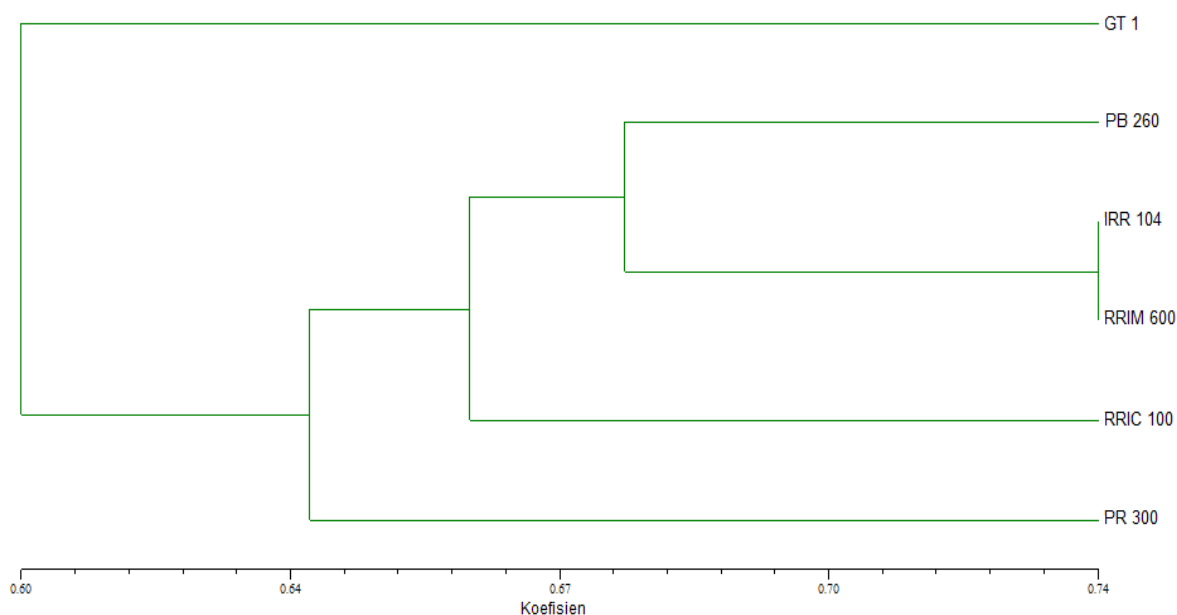
Keragaman genetik klon Karet

Elektroferogram yang dihasilkan dari amplifikasi AFLP diperoleh pita-pita AFLP dengan berbagai variasi ukuran. Untuk pembentukan pohon filogenetik berupa dendrogram, dilakukan pengolahan data biner berdasarkan variasi tersebut. Dendrogram dibuat menggunakan semua pita AFLP.

Dari dendrogram diperoleh koefisien kemiripan genetik antar keenam klon adalah rendah yaitu sebesar 0,60 yang berarti menunjukkan kekerabatan genetik keenam klon sebesar 60% (Gambar 4). Pada koefisien kemiripan 64% tampak dua kelompok kekerabatan. Kelompok 1 hanya terdiri dari klon GT 1. Sedangkan kelompok 2 terdiri dari klon PB 260, IRR 104, RRIM 600, RRIC 100 dan PR 300.

Marka spesifik klon

Dari elektroferogram diketahui ada primer yang menghasilkan pita-pita unik. Pita unik adalah pita yang mempunyai satu ukuran tertentu yang hanya muncul pada satu klon saja, oleh satu pasang primer spesifik. Pasangan primer M-CAA/E-ACA menghasilkan satu pita unik untuk klon GT 1 pada ukuran 168 bp, sedangkan pasangan



Gambar 4. Pohon filogenetik enam klon karet berdasarkan pola pita marka AFLP

primer M-GAC/E-ACG menghasilkan 2 pita unik pada ukuran 383 dan 138 bp. Untuk klon IRR 104, pita unik ukuran 20 bp diperoleh dari pasangan primer M-CAA/E-AGC. Pita-pita unik dari berbagai pasangan primer untuk klon-klon tertentu beserta ukurannya dapat dilihat pada Tabel 3.

Pembahasan

Keragaman genetik merupakan variasi yang terjadi di dalam genom suatu spesies,

Tabel 3. Pasangan primer spesifik dan ukuran unik yang dihasilkan pada masing-masing klon

Klon	Pasangan primer spesifik	Ukuran pita unik
GT 1	M-CAA/E-ACA	168 bp
	M-CAA/E-ACT	2357 bp
	M-CAG/E-ACT	156 bp
	M-CAT/E-AAG	437 bp
	M-CTG/E-AAG	2416 bp
	M-CTC/E-ACA	1445 bp
	M-CTG/E-ACG	376 bp
	M-GAC/E-ACG	383 bp, 138 bp
IRR 104	M-CAA/E-AGC	20 bp
	M-GAC/E-AGG	138 bp, 86 bp, 70 bp
PB 260	M-CAG/E-AGC	2250 bp
	M-CTA/E-ACA	187 bp
	M-CTC/E-AAC	226 bp
	M-CTT/E-ACT	109 bp
	M-GAC/E-ACG	1907 bp
	M-GAC/E-AGC	1906 bp
RRIC 100	M-CAG/E-AGC	179 bp
	M-CAT/E-ACC	1701 bp
	M-CTA/E-ACA	2916 bp
	M-CTC/E-ACA	3500 bp
	M-CTC/E-ACC	418 bp
	M-CTG/E-ACC	160 bp
	M-GAC/E-AGC	3428 bp
RRIM 600	M-CTC/E-ACG	326 bp
	M-CTC/E-ACA	31 bp
	M-CAC/E-ACG	333 bp
	M-CTA/E-AGG	261 bp
	M-CTT/E-ACC	185 bp
PR 300	M-CTC/E-AAC	30 bp, 23 bp
	M-CTA/E-AGG	64 bp
	M-CAT/E-ACC	72 bp, 61 bp
	M-CAT/E-AAG	91 bp, 71 bp, 54 bp
	M-CAC/E-ACC	58 bp
	M-CTG/E-AGG	51 bp, 43 bp

yang disebabkan oleh berbagai macam faktor. Variasi genetik pada tanaman banyak dimanfaatkan pada persilangan guna menghasilkan varietas-varietas unggul. Salah satunya di Indonesia adalah tanaman karet dengan berbagai macam klon telah dihasilkan sejak tahun 1864 (Heru dan Andoko 2008). Enam klon yang digunakan dalam penelitian ini yaitu GT 1, IRR 104, PB 260, PR 300, RRIC 100 dan RRIM 600 adalah klon-klon yang dikembangkan di beberapa negara, termasuk Indonesia.

GT 1 (Gondang Tapen 1) merupakan klon primer yang berasal dari Indonesia yang termasuk sebagai klon tertua. Sedangkan IRR 104 (*Indonesian Rubber Research*) adalah klon karet unggul anjuran asal Indonesia berdasarkan Surat Keputusan Menteri Pertanian Tahun 2005. Klon ini berasal dari tetua BPM 101 dengan RRIC 110 (Kementerian Pertanian 2007; Lasminingsih dan Sipayung 2012). Klon PB 260 berasal dari persilangan PB 5/51 dengan PB 49 dan dikembangkan oleh Prang Besar, Malaysia. Berikutnya klon PR 300 (*Proefstation Rubber*) asal Indonesia yang berasal dari persilangan PR 226 dan PR 228 yang keduanya juga berasal dari Indonesia. Ketiga klon tersebut merupakan klon penghasil lateks (Daslin 2014). Klon RRIC (*Rubber Research Institute of Ceylon*) merupakan klon asal Sri Lanka, dan BPM (Balai Penelitian Medan) yang merupakan klon asal Indonesia. Klon RRIM 600 berasal dari Malaysia yang merupakan hasil persilangan TJIR 1 (Tjirandji 1) asal Indonesia dengan PB 86 asal Malaysia (Situmorang et al. 2007; Priyadarshan 2011). Terakhir klon RRIC 100 adalah klon yang berasal dari persilangan RRIC 52 dengan PB 86 yang dikembangkan di Sri Lanka.

Data biner pita DNA AFLP digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik atau dendrogram sehingga diketahui tingkat kemiripan genetik keenam klon karet, GT 1, IRR 104, PB 260, PR 300, RRIC 100 dan RRIM 600. Diperoleh hasil bahwa keenam klon membentuk dua kelompok yang menunjukkan hubungan kekerabatan secara fenotipe produktivitas menurut Priyadarshan (2011) sebagai klon unggul penghasil lateks. Daslin (2005) membagi sejarah pemuliaan tanaman karet ke dalam 4 generasi. Klon GT 1 termasuk dalam generasi II dengan produktivitas 704 kg/ha/tahun, sedangkan

PR 300 adalah generasi III dengan produktivitas 1090 kg/ha/tahun. Klon-klon generasi IV termasuk IRR 104, PB 260, RRIC 100 dan RRIM 600 dengan produktivitas 1630 kg/ha/tahun (Daslin 2013; Daslin dan Pasaribu 2015).

Klon RRIM 600 dan RRIC 100 dikembangkan dan berasal dari dua negara yang berbeda, yaitu dari Malaysia dan Sri Lanka. Kedua klon ini memiliki koefisien kemiripan genetik sebesar 66%. Jarak kekerabatan yang dekat ini bisa terjadi karena persilangan keduanya dihasilkan dari satu tetua donor yang sama yang berasal dari Malaysia, yaitu PB 86. Klon IRR 104 dan RRIM 600 membentuk satu sub-kelompok pada puncak pohon filogenetik dengan koefisien kemiripan genetik sebesar 74%. Klon yang berada pada kelompok kekerabatan yang sama berarti bahwa klon tersebut memiliki jarak kekerabatan yang dekat (Gregory 2008; Townsend et al. 2012).

Nurhaimi-Haris et al. (2003) melakukan pengujian marka AFLP pada 10 klon karet berdasarkan tingkat resistensi terhadap cendawan patogen daun *Corynespora cassiicola*, dengan menggunakan 10 pasang primer selektif. Dari hasil penelitiannya, diperoleh kemiripan genetik pada 10 klon karet sebesar 85,0%. Keragaman genetik dalam spesies merupakan modal dasar bagi suatu tanaman untuk tumbuh, berkembang dan beradaptasi dengan perubahan lingkungan atau penyakit sehingga dapat bertahan hidup dari generasi ke generasi (Woelan et al. 2014). Hal ini bisa terjadi karena lingkungan tempat tumbuh terutama jika lingkungan tersebut diketahui sangat berbeda secara geografisnya sehingga dapat mempengaruhi keragaman genetik yang mengekspresikan variasi secara fenotipenya. Dengan demikian fenotipe merupakan hasil interaksi genotipe dengan lingkungannya (Kubota et al. 1998; Syukur et al. 2012).

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini sesuai dengan penelitian Toruan-Mathius et al. (2002). Mereka telah melakukan pengujian keragaman genetik klon-klon karet berdasarkan marka AFLP dan RAPD, yang membedakan dua kelompok klon karet menjadi klon yang bersifat resisten terhadap patogen *Corynespora cassiicola* dan klon yang bersifat rentan terhadap jenis patogen tersebut. GT 1 termasuk ke dalam golongan

klon yang rentan terhadap jenis patogen tersebut, sedangkan RRIC 100 termasuk ke dalam golongan resisten.

Uji kuantitatif terhadap DNA hasil isolasi dari daun karet dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer Nanodrop pada panjang gelombang 260 dan 280 nm, sedangkan uji secara kualitatif menggunakan gel elektroforesis agarosa 1% dengan pewarna *SYBR safe* (Gambar 1). DNA termasuk baik dan murni jika memiliki rasio A_{260}/A_{280} antara 1,8 – 2,0 (Yuwono 2007). Dengan nilai kemurnian yang diperoleh, DNA hasil isolasi masih dapat digunakan sebagai cetakan DNA pada PCR untuk marka AFLP karena selama proses PCR tetap akan mengamplifikasi cetakan DNA secara spesifik oleh primer walaupun dengan kemurnian yang rendah (Bintang 2010). Dengan demikian kemurnian DNA hasil isolasi yang diperoleh ini tetap dapat digunakan dalam proses tahapan AFLP.

Konsentrasi DNA hasil isolasi yang berbeda-beda dapat disebabkan oleh rusaknya DNA selama proses isolasi atau adanya kontaminan (Healey et al. 2014). Pada penelitian ini tahapan AFLP digunakan konsentrasi DNA karet yang diencerkan hingga 250 ng/ μ L, namun dalam penelitian yang lainnya dengan konsentrasi DNA 50 ng/ μ L saja AFLP dapat dilakukan (Nurhaimi-Haris et al. 2003). Pengenceran ini dimaksudkan agar menghasilkan produk PCR AFLP dengan ketebalan pita yang seragam. Analisis kualitatif menggunakan pewarna *SYBR safe*. *SYBR safe*, yang memiliki nama lain yaitu metil benzen sulfonat dan dilarutkan dalam dimetilsulfoksida (Evenson et al. 2012), membuat pita DNA berpendar setelah dielektroforesis di bawah sinar UV. Hasil kualitatif tersebut telah cukup menunjukkan keberadaan DNA tanaman karet, walaupun tidak secara utuh karena adanya *smear* pada masing-masing lajur. Pita tebal yang berada di atas menunjukkan bahwa bobot molekul DNA genom yang diperoleh cukup besar, yaitu sekitar 10 kb. *Smear* di bawah pita DNA menunjukkan telah terjadinya degradasi atau fragmentasi DNA genom selama proses isolasi (Hamzah 2014).

Enzim restriksi yang digunakan dalam studi ini adalah *EcoRI* sebagai enzim pemotongan jarang (*rare cutter*) dan *TruI* sebagai enzim pemotongan sering (*frequent*

cutter). Enzim *TruI* yang digunakan adalah enzim yang mengenali situs pemotongan basa yang mirip dengan enzim *MseI*, hanya saja suhu optimal pada saat proses pemotongan berlangsung berbeda, yaitu 65°C untuk *TruI* dan 37°C untuk *MseI*. Pemotongan enzim restriksi bertujuan untuk mendapatkan jumlah fragmen DNA yang optimum sehingga pola pita AFLP nantinya dapat diberi nilai dengan baik karena tingkat polimorfisme yang dihasilkan lebih tinggi.

Menurut Reflinur dan Lestari (2015) banyaknya DNA yang terdegradasi sebelum mengalami digesti menyebabkan banyak DNA genom tidak terpotong sempurna oleh kedua enzim restriksi dan tidak menempel dengan baik oleh kedua adapter yang menyebabkan fragmen DNA tidak teramplifikasi dengan sempurna karena tidak memiliki situs penempelan primer. Oleh karena itu, DNA yang baik merupakan faktor penting dalam metode AFLP ini untuk menghindari pemotongan DNA yang tidak sempurna dan dapat menyebabkan kesalahan dalam identifikasi pita polimorfis (Nurhaimi-Haris et al. 2010). Kekeliruan dalam mengidentifikasi pita menyebabkan tidak munculnya ukuran pita yang sesuai pada elektroferogram di tahap pemotongan dan penempelan. Hal ini menyebabkan perbedaan ukuran fragmen DNA pada elektroferogram gel poliakrilamid setelah amplifikasi. Namun, dalam studi ini semua pita yang dihasilkan tetap dianggap mewakili karakter tertentu pada masing-masing klon, maka semua pita digunakan dalam identifikasi keragaman genetik.

Berdasarkan hasil elektroferogram yang diperoleh dan pengolahan data biner, pita terbanyak dihasilkan oleh pasangan primer M-CAT/E-AAG pada klon PR 300, dengan jumlah sebanyak 24 pita. Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, jumlah pita AFLP pada studi ini sedikit lebih rendah dibandingkan dengan jumlah dari penelitian sebelumnya yang dapat mencapai 34 – 65 pita AFLP (Nurhaimi-Haris et al. 2010). Jumlah pita yang lebih sedikit kemungkinan disebabkan karena pita yang seharusnya dihasilkan belum tampak ketika pita lain sudah muncul. Hal ini dapat disebabkan karena dalam proses pewarnaan perak nitrat yang kurang optimum.

Pola pita spesifik dapat digunakan untuk mengidentifikasi klon-klon karet karena adanya pola polimorfisme yang unik pada masing-masing klon. Masing-masing primer menghasilkan polimorfisme yang berbeda yang dapat digunakan untuk identifikasi suatu tanaman (Misra et al. 2010; Ghosh et al. 2011). Menurut Chial (2008), polimorfisme yang bersifat unik dapat dijadikan sebagai identitas genotipe atau sidik jari DNA suatu sampel yang diuji. Pola polimorfisme yang dihasilkan dapat digunakan untuk identifikasi klon karet melalui deteksi pita spesifik pada primer yang digunakan. Sebelum pita spesifik ini dapat digunakan sebagai sarana seleksi di lapang, maka diperlukan tahap validasi terlebih dahulu untuk memastikan perannya sebagai pemandu dalam pemuliaan tanaman karet.

KESIMPULAN

Marka AFLP berhasil digunakan untuk menganalisis keragaman genetik enam klon karet yang ada di kebun koleksi Balai Bioteknologi, BPPT berdasarkan jumlah pita polimorfis yang muncul dan tingkat kemiripan genetik yang dihasilkan. Analisis keragaman genetik dari enam klon karet yaitu GT 1, IRR 104, PB 260, PR 300, RRIC 100 dan RRIM 600 menggunakan 64 pasang primer dan menghasilkan 2806 pita AFLP dengan ukuran pita yang bervariasi antara 65 hingga 3833 bp dan bersifat polimorfis. Tingkat kemiripan genetik keenam klon karet tersebut adalah sebesar 64%, dan terbagi dalam dua kelompok dengan tingkat kemiripan genetik pada puncak pohon filogenetik yang diperoleh antara IRR 104 dan RRIM 600 adalah 74%. Beberapa pita unik diperoleh sebagai marka spesifik untuk klon-klon tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- Bakhtiar Y, Yahya S, Sumaryono W, Sinaga MS, Budi SW, Tajuddin T (2010) Isolation and identification of Mycorrhizosphere bacteria and their antagonistic effects towards *Ganoderma boninense in vitro*. *Microbiol Indones* 4:96-102. doi: 10.5454/mi.4.2.9

- Barril P, Nates S (2012) Introduction to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis matrices with respect to their detection sensitivities, *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*, Magdeldin S (Ed). ISBN: 978-953-51-0458-2. Intech. doi: 10.5772/38573
- Bintang M (2010) *Biokimia: Teknik Penelitian*. Erlangga, Jakarta
- Bueche F (1957) Mechanical properties of natural and synthetic rubbers. *J Polym Sci* 25: 305-324. doi: 10.1002/pol.1957.1202511005
- Chial H (2008) DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphisms (AFLP): No genome sequence required. *Nat Educ* 1:176
- Collard BCY, Mackill DJ (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil Trans R Soc B* 363: 557–572. doi: 10.1098/rstb.2007.2170
- Damanik S, Syakir M, Tasma M, Siswanto (2010) *Budidaya dan pasca panen karet*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Bogor
- Daslin A (2005) Kemajuan pemuliaan dan seleksi dalam menghasilkan kultivar karet unggul. *Hlm: 26–37*. Prosiding Lokakarya Nasional Pemuliaan Tanaman Karet, 22–23 November 2005. Balai Penelitian Sungei Putih, Pusat Penelitian Karet, Medan
- Daslin A (2013) Produktivitas klon karet pada berbagai kondisi lingkungan di perkebunan. *Agrium* 18: 1-6
- Daslin A (2014) Perkembangan penelitian klon karet unggul IRR seri 100 sebagai penghasil lateks dan kayu. *Warta Perkebunan* 33:1-10
- Daslin A, Pasaribu SA (2015) Uji adaptasi klon karet IRR seri 100 pada agroklimat kering di kebun Sungei Baleh Kabupaten Asahan Sumatera Utara. *J Penelitian Karet* 33: 25-34
- Dirjenbun (2015) *Rencana Strategis Direktorat Jenderal Perkebunan Tahun 2015-2019*. Direktorat Jenderal Perkebunan Kementerian Pertanian. Jakarta
- Dirjenbun (2016) *Statistik Perkebunan Indonesia Karet 2015-2017*. Direktorat Jenderal Perkebunan, Kementerian Pertanian, Jakarta
- Doyle JJ (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Evenson WE, Boden LM, Muzikar KA, O’Leary DJ (2012) ¹H and ¹³C NMR assignments for the cyanine dyes SYBR safe and thiazole orange. *J Org Chem* 77:10967-10971. doi: 10.1021/jo3021659
- Feng S, Wu Y, Li W, Yu F, Wang J (2012) Analysis of genetic diversity and SSR allelic variation in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *The Molecular Basic of Plant Genetic Diversity*. Caliskan M (Ed). 7:136-150. ISBN: 978-953-51-0157-4
- Feng SP, Li WG, Huang HS, Wang JY, Wu YT (2009) Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*) *Mol Breeding* 23:85–97. doi: 10.1007/s11032-008-9216-0
- Ghosh S, Majumder PB, Sen Mandi S (2011) Species-specific AFLP markers for identification of *Zingiber officinale*, *Z. montanum* and *Z. zerumbet* (Zingiberaceae). *Genet Mol Res* 10:218-29. doi: 10.4238/vol10-1gmr1154
- Gouvea LRL, Rubiano LB, Chioratto AF, Zucchi MI, Goncalves PS (2010) Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. *Genet Mol Biol* 33:308-318. doi: 10.1590/S1415-47572010005000039
- Gregory TR (2008) Understanding evolutionary trees. *Evo Edu Outreach* 1: 121-137. doi: 10.1007/s12052-008-0035-x
- Hamzah P (2014) *Evaluasi marka Simple Sequence Repeat (SSR) untuk identifikasi genotip klon karet (Hevea brasiliensis)*. Skripsi, Institut Pertanian Bogor
- Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ (2014) Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10:21. doi: 10.1186/1746-4811-10-21
- Heru DS, Andoko A (2008) *Petunjuk Lengkap Budi Daya Karet*. Agromedia Pustaka, Jakarta

- Jiang GL (2013) Molecular markers and marker-assisted breeding in plants Pp 45-83. Andersen SB (Ed.) Plant breeding from Laboratories to Fields. ISBN 978-953-51-1090-3. InTech. doi: 10.5772/52583
- Kementerian Pertanian (2007) Klon karet unggul untuk 2006-2010. Tabloid Sinar Tani Edisi 28 Maret-3 April 2007
- Kementerian Pertanian (2015) Outlook Karet – Komoditas Pertanian Subsektor Perkebunan. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, Sekretariat Jenderal
- Kubota C, Tajuddin T, Kozai T (1998) Photoautotrophic micropropagation of mangosteen plantlets. Jap J Trop Agr 42:31-32
- Kück P, Greve C, Misof B, Gimmich F (2012) Automated masking of AFLP markers improves reliability of phylogenetic analyses. PLoS One 7:e49119. doi: 10.1371/journal.pone.0049119
- Lasminingsih M, Sipayung HH (2012) Petunjuk Praktis Pembibitan Karet. ISBN: 979-006-402-0. AgroMedia Pustaka, Jakarta
- Le Guen V, Gay C, Xiong TC, Souza LM, Rodier-Goud M, Seguin M (2011) Development and characterization of 296 new polymorphic microsatellite markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Plant Breeding 130: 294–296. doi: 10.1111/j.1439-0523.2010.01774.x
- Li D, Xia Z, Deng Z, Liu X, Feng F (2013) Development, characterization, genetic diversity and cross-species/genera transferability of ILP markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Genes Genom 35:719-731. doi: 10.1007/s13258-013-0122-4
- Misra A, Shasany AK, Shukla AK, Darokar M, Singh S, Velusamy S, Singh J, Bagchi GD, Jain SP, Saikia D, Khanuja SPS (2010) AFLP markers for identification of *Swertia* species (Gentianaceae). Genet Mol Res 9:1535-1544. doi: 10.4238/vol9-3gmr785
- NanoDrop Technologies Inc (2007) ND-1000 Spectrophotometer V3.5 user's manual
- Novalina, Sagala AD (2011) Studi segregasi dan pewarisan marka-marka RAPD pada tanaman karet hasil persilangan PB 260 dengan PN. Biospecies 4:18-26
- Nurhaimi-Haris, Aswidinnoor H, Toruan-Mathius N, Purwantara A (2003) Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) berdasarkan metode *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP). Menara Perkebunan 71:1-15
- Nurhaimi-Haris, Suwanto A, Suhartono MT, Aswidinnoor H (2010) Isolation and cloning of cDNA fragments from rubber plant with resistant and susceptible characters to *Corynespora cassiicola* using cDNA-AFLP method. Menara Perkebunan 78:33-42
- Persequini JMKC, Romao LRC, Brinez B, Junior EJS, Goncalves PS, Benchimol LL (2012) Genetic diversity of cultivated accessions and wild species of rubber tree using EST-SSR markers. Pesq agropec bras 47:1087-1094
- Priyadarshan PM (2011) Biology of *Hevea* Rubber. CABI, London
- Reflinur, Lestari P (2015) Penentuan lokus gen dalam kromosom tanaman dengan bantuan marka DNA. J Litbang Pert 34:177-186
- Roy CB, Ravindran M, Saha T (2012) Efficient screening of AFLP primer combinations for evaluating genetic diversity among cultivated rubber (*Hevea brasiliensis*) clones. Natural Rubber Research 25:21-30
- Rubber Board (2016) Monthly Rubber Statistical News Vol 7 No 12 May 2016. Statistics & Planning Department, Rubber Board, Kottayam-686 002 Kerala, India
- Shan C, Gu Z, Wang L, Li P, Song G, Gao Z, Yang X (2011) Preparation, characterization, and application of NR/SBR/Organoclay nanocomposites in the tire industry. J Appl Polym Sci 119: 1185-1194. doi: 10.1002/app.32773
- Situmorang A, Sinaga MS, Suseno R, Hidayat SH, Siswanto, Darussamin A (2007) Virulensi isolat *Corynespora cassiicola* asal sentra perkebunan karet Indonesia terhadap beberapa klon karet anjuran. J Penelitian Karet 25:37-58

- Syukur M, Sujiprihati S, Yunianti R (2012) Teknik Pemuliaan Tanaman. Penebar Swadaya, Jakarta
- Tajuddin T, Cartealy IC, Safarrida A, Purwoko D, Zulaeha S, Ardiyani M (2012) Identification on Indonesian accessions of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. using AFLP markers. *Biology, Medicine & Natural Product Chemistry* 1:33-37
- Tang C, Xiao X, Li H, Fan Y, Yang J, Qi J, Li H (2013) Comparative analysis of latex transcriptome reveals putative molecular mechanisms underlying super productivity of *Hevea brasiliensis*. *PLoS One* 8(9):e75307. doi: 10.1371/journal.pone.0075307
- Toruan-Mathius N, Lalu Z, Soedarsono, Aswidinnoor H (2002) Keragaman genetik klon-klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) yang resisten dan rentan terhadap *Corynespora asiicola* berdasarkan penanda RAPD dan AFLP. *Menara Perkebunan* 70:35-49
- Townsend JP, Su Z, Tekle YI (2012) Phylogenetic signal and noise: Predicting the power of a data set to resolve phylogeny. *Syst Biol* 61:835-849. doi: 10.1093/sysbio/sys036
- Vuylsteke M, Peleman JD, van Eijk MJ (2007) AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nat Protoc* 2:1399-1413. doi: 10.1038/nprot.2007.174
- Wibowo IY (2010) Analisis keragaman genetik tanaman karet hasil persilangan antara RRIM 600 dan PN 1546 dengan menggunakan teknik RAPD. Skripsi, Institut Pertanian Bogor
- Woelan S, Sayurandi, Irwansyah E (2014) Keragaman genetik tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) dari hasil persilangan interspesifik. *J Penelitian Karet* 32:109-121
- Wooten JA, Tolley-Jordan LR (2009) Validation of phylogenetic signals in amplified fragment length data: testing the utility and reliability in closely related taxa. *BMC Res Notes* 2:26. doi: 10.1186/1756-0500-2-26
- Xiao X, Li H, Tang C (2009) A silver-staining cDNA-AFLP protocol suitable for transcript profiling in the latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Mol Biotechnol* 42:91-99. doi: 10.1007/s12033-008-9139-3
- Yu F, Wang BH, Feng SP, Wang JY, Li WG, Wu YT (2010) Development, characterization, and cross-species/genera transferability of SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*) *Plant Cell Rep.* 30:335–344
- Yuwono T (2007) Teori dan Aplikasi *Polymerase Chain Reaction*. Andi Publisher, Yogyakarta