

## PENANDA DNA UNTUK ANALISIS GENETIK TANAMAN

*(DNA Markers for Plants Genetic Analysis)*

ZULFAHMI

Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian dan Peternakan,  
Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau, Kampus Panam, PO Box 1004,  
Pekanbaru 28293, Riau Tel.+62-761-562051, Fax +62-761-562052.  
E-mail: fahmi2509@gmail.com.

### ABSTRACT

*Genetic diversity is an important aspect for plant to adapt on environment changes. Information on genetic diversity at individual, species and population levels are required for a basic consideration to formulate strategy conservation and breeding program and utilizing of genetic resources. In the last few decades, the development of DNA based molecular markers techniques has been a significant increase and its are routinely being used in ecological, evolutionary, taxonomical, phylogenetic, population genetic, identification studies of plant sciences. These DNA based markers are distinguished in two types, first non PCR based techniques such as RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) and second is PCR based techniques such as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats) and AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS), Sequence Characterized Amplified Region (SCAR), Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) and DNA barcoding. These techniques are well established and their advantages as well as limitations have been realized. The review details account of techniques used in identification of markers and their applicability in plant sciences.*

*Keywords: DNA Markers, Plant Genetics, Assessment Diversity, Polymerase Chain Reaction (PCR)*

### PENDAHULUAN

Keragaman tingkat genetik merupakan tingkat keragaman yang paling rendah dalam organisasi biologi. Keragaman genetik sangat penting bagi tanaman untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan yang terjadi disekitarnya. Informasi keragaman genetik tanaman pada tingkat, individu, spesies maupun populasi perlu diketahui, sebagai dasar pertimbangan dalam menyusun strategi konservasi, pemuliaan, pengelolaan dan pemanfaatan sumberdaya genetik tanaman secara berkelanjutan. Penilaian keragaman genetik tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan penanda morfologi, biokimia dan molekuler DNA.

Penilaian keragaman genetik tanaman secara morfologi dilakukan melalui uji progeni, uji provenan dan pengujian lainnya dengan mengamati penampilan fenotipik tanaman. Pengujian ini dilakukan pada lingkungan yang berbeda dengan fokus utama adalah ciri kualitatif dan kuantitatif yang bernilai ekonomi serta ciri yang secara biologi penting seperti kemampuan hidup (*survive*), sifat toleran terhadap stres lingkungan, sifat produksi dan resistensi terhadap hama dan penyakit. Sebagian diantara ciri-ciri tersebut bersifat poligenik dan ekspresinya dipengaruhi oleh

lingkungan. Studi secara tradisional dengan metode genetika kuantitatif, penilaian keragaman dan distribusi keragaman dikelompokkan ke dalam beberapa kelas pengaruh, seperti pengaruh fenotipik, genotipe, lingkungan dan interaksi antara lingkungan dan genotipe. Penentuan keragaman genetik tanaman secara konvensional ini membutuhkan waktu yang lama, relatif mahal, dipengaruhi oleh lingkungan dan keragaman yang diperoleh terbatas dan tidak konsisten.

Keterbatasan penanda morfologi ini mendorong perkembangan penanda lain yang dapat langsung mengakses ke bagian material yang mengendalikan karakter atau ciri suatu individu, yaitu yang dikenal dengan penanda molekuler DNA. Penanda molekuler didefinisikan sebagai segmen DNA tertentu yang mewakili perbedaan pada tingkat genom. DNA merupakan sumber informasi genetik yang potensial dan akurat. DNA ditemukan dalam hampir semua sel semua organisme, baik pada jaringan hidup maupun yang mati. Ditambah lagi, jaringan tersebut dapat secara mudah disimpan di bawah kondisi lapangan. Penanda molekuler ini memiliki keuntungan dibandingkan dengan penanda morfologi, yaitu stabil dan dapat dideteksi dalam semua jaringan tanaman, serta tidak dipengaruhi oleh lingkungan.

Penanda molekuler DNA yang ideal memiliki kriteria sebagai berikut: a) memiliki tingkat polimorfisme yang sedang sampai tinggi, b) terdistribusi merata diseluruh genom, c) memberikan resolusi perbedaan genetik yang cukup, d) pewarisan bersifat kodominan (dapat membedakan kondisi homozigot dan heterozigot dalam organisme diploid), e) berperilaku netral, f) secara teknik sederhana, cepat dan murah, g) butuh sedikit jaringan dan DNA sampel, h) berkaitan erat dengan fenotipe, i) tidak memerlukan informasi tentang genom organisme. j) data mudah dipertukarkan antar laboratorium (Mondini *et al.*, 2009; Agarwal *et al.*, 2008; Weising *et al.*, 2005). Tidak ada satu jenis penanda yang dapat memenuhi semua kriteria tersebut, bagaimana pun juga kita dapat memilih diantara berbagai penanda yang ada dan saling dikombinasikan untuk mencapai semua kriteria tersebut.

Tulisan ini akan membahas secara ringkas penanda molekuler DNA yang umum digunakan serta aplikasi mereka. Penanda molekuler DNA tersebut dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu, pertama, penanda DNA tanpa PCR (*non-PCR based techniques*) seperti RFLP, kedua, penanda DNA berdasarkan PCR yang meliputi RAPD, AFLP, SSR, CAPS, SCAR, SSCP dan DNA Barkoding.

### Penanda DNA Tanpa PCR

#### ***Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)***

RFLP (Botstein *et al.*, 1980) adalah penanda DNA pertama yang dihasilkan dari perbedaan sekuen nukleotida tanaman yang berbeda. Perbedaan tersebut muncul karena mutasi yang terjadi pada waktu lalu dan dideteksi sebagai variasi (polimorfisme pada perbedaan fragmen restriksi). Mutasi yang terjadi seperti substitusi, delesi, insersi pada sekuen DNA akan merubah tempat pemotongan (*restriction sites*) enzim endonuklease sehingga dapat merubah panjang fragmen DNA yang dihasilkan dan dideteksi sebagai penanda yang mewakili genotipe suatu individu. Variasi panjang fragmen DNA hasil pemotongan enzim restriksi dapat digunakan sebagai profil untuk identifikasi individu yang dikenal dengan sidik jari DNA (*DNA fingerprint*).

Analisis RFLP pada tanaman melibatkan beberapa tahapan, yaitu ekstraksi DNA dari tanaman, pemotongan DNA dengan enzim restriksi, fraksinasi ukuran fragmen pada gel melalui elektroporesis, transfer fragmen DNA ke nylon membrane, kloning fragmen ke dalam plasmid, pelabelan probe DNA dengan radioaktif (<sup>32</sup>P) dan hibridisasi probe DNA yang

dilabel ke filter, pencucian dan ekspos filter pada sinar x untuk memperoleh autoradiogram. Pola pita yang terlihat pada autoradiogram mewakili fragmen restriksi yang homolog dengan sekuen probe. Keuntungan penanda RFLP adalah polimorfisme yang relatif tinggi, bersifat kodominan, memiliki lokus penanda yang spesifik, dan hasilnya yang konsisten antar laboratorium, sedangkan kekurangan dari penanda RFLP adalah membutuhkan DNA dengan kualitas tinggi sehingga perlu melakukan ekstraksi DNA dalam skala besar, relatif mahal, prosedurnya panjang dan menggunakan radioaktif. Terkait dengan keterbatasan tersebut, penanda RFLP tidak banyak digunakan dalam skala luas.

Beberapa aplikasi RFLP antara lain untuk pemetaan genetik (Botstein *et al.*, 1980), studi filogenetik tanaman (Miller dan Tanskey, 1990), studi keragaman (Debreuil *et al.*, 1996), hibridisasi dan introgresi seperti aliran gen antar tanaman (Brubaker dan Wendel, 1994).

### Penanda DNA berdasarkan PCR

Sejak ditemukan teknologi PCR oleh Mullis dan Faloona (1987), penanda molekuler DNA berkembang pesat dan diaplikasikan pada berbagai bidang, baik yang menggunakan primer acak yang tidak memerlukan informasi sekuen DNA maupun yang memerlukan informasi sekuen DNA, hal ini karena kecepatan, efisiensi dan kesuksesan dalam mendeteksi berbagai tipe variasi DNA yang tinggi. Teknologi PCR terus disederhanakan dan dikembangkan, sehingga biaya relatif rendah, kecepatan tinggi, membutuhkan contoh uji sangat sedikit, metode ekstraksi dan amplifikasi yang sederhana sehingga membuat penanda berdasarkan PCR dapat diaplikasikan pada semua spesies.

PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA cetakan dengan bantuan enzim DNA Polymerase dan primer dalam suatu thermocycler (Mullis dan Faloona, 1987). Ada empat komponen utama yang dibutuhkan untuk melakukan proses PCR yaitu DNA template (cetakan), primer, DNA polymerase dan dNTPs. Menurut Newton dan Graham (1994) tahap-tahap dalam proses PCR meliputi: i) denaturasi DNA, pembukaan utas ganda DNA menjadi utas tunggal (biasanya pada suhu 92-94 °C), ii) tahap *annealing*, penempelan primer pada DNA cetakan biasanya tergantung pada *Melting Temperature* primer yang digunakan), serta iii) tahap *extension*, pemanjangan primer dengan melakukan reaksi polimerisasi nukleotida untuk membentuk rantai DNA (biasanya pada suhu

72 °C). Ketiga tahapan tersebut akan dilakukan secara berulang. Jumlah salinan (*copy*) DNA hasil amplifikasi adalah  $2n$ , dimana  $n$  adalah jumlah siklus (Newton dan Graham, 1994). Teknik penanda berdasarkan PCR dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu i) menggunakan primer acak atau tidak memerlukan sekuen spesifik dan ii) menggunakan primer spesifik atau ada sekuen target tertentu.

#### **Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**

Teknik RAPD menggunakan sekuen primer pendek untuk mengamplifikasi sekuen-sekuen DNA genom secara acak (William *et al.*, 1990). Panjang primer yang digunakan biasanya 10 basa dan tersedia dalam Kit yang dijual secara komersial dari berbagai perusahaan. Amplifikasi fragmen DNA dilakukan dengan menggunakan mesin PCR pada suhu *annealing* rendah (35-40°C). Dalam proses amplifikasi dengan PCR, jika suhu *annealing*nya tepat, primer akan menempel pada beberapa tempat dimana sekuennya berkomplemen dengan sekuen DNA cetakan dan menghasilkan fragmen DNA secara acak. Produk amplifikasi biasanya berukuran 0.5-5 kb, dipisahkan dengan gel agarose dan pola pitaanya dideteksi melalui pewarnaan dengan etidium bromide di bawah sinar ultraviolet (Jones *et al.*, 1997) dan “ada” atau “tidak ada” pita akan diamati. Menurut Weising *et al.*, (2005), secara teori, polimorfisme RAPD merupakan hasil dari beberapa peristiwa, yaitu i) insersi fragmen DNA yang besar diantara tempat penempelan primer yang melebihi kemampuan PCR sehingga tidak ada fragmen yang terdeteksi, ii) insersi atau delesi kecil utas DNA yang menyebabkan perubahan ukuran fragmen amplifikasi, (iii) delesi salah satu tempat penempelan primer sehingga mengakibatkan hilangnya fragmen atau meningkatnya ukuran fragmen, (iv) substitusi satu nukleotida pada satu atau dua tempat sasaran primer yang mempengaruhi proses *annealing*, yang berakibat pada ada atau tidaknya polimorfisme atau merubah ukuran fragmen.

Penanda RAPD bersifat dominan, fragmen DNA yang dihasilkan tidak dapat membedakan individu yang memiliki genotipe homozigot (AA) dengan heterozigot (Aa), sedangkan yang tidak ada pita secara jelas menunjukkan genotipe resesif (aa). Fragmen DNA hasil amplifikasi RAPD diskoring dengan ketentuan “1” untuk ada pita dan “0” untuk tidak ada pita, data tersebut kemudian digunakan untuk menghasilkan matrik biner untuk analisis statistik selanjutnya. Keuntungan utama

penanda RAPD adalah secara teknik lebih sederhana dan cepat dalam pengujiannya, tidak memerlukan informasi sekuen DNA sehingga penanda ini dapat digunakan secara luas, jumlah sampel DNA yang dibutuhkan sedikit, primer tersedia secara komersial, dan tidak menggunakan senyawa radioaktif (Cheng *et al.*, 1997; Karp *et al.*, 1997).

Untuk beberapa aplikasi, sifat dominan dari fragmen RAPD ini tidak menguntungkan dalam studi genetika populasi (Lynch dan Milligan, 1994) karena tidak dapat diaplikasi untuk menduga heterozigot secara langsung, sensitif terhadap perubahan kondisi reaksi dan intensitas pita yang dihasilkan bervariasi sehingga menyulitkan dalam skoring pola pita. Untuk mengatasi hal ini sebaiknya skoring pita dilakukan terhadap pita yang memiliki intensitas dan kecerahan yang kuat (Lynch dan Milligan, 1994). Penanda RAPD dapat digunakan untuk identifikasi kultivar dan klon tanaman (Palai dan Rout, 2007; Te-chato *et al.*, 2005; Karsinah *et al.*, 2002), genetika populasi (Medri *et al.*, 2011; Li dan Ge, 2006), pemetaan genetik (Sondur *et al.*, 1996), filogenetik, dan marker-assisted selection.

#### **Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

AFLP adalah teknik yang menggabungkan kekuatan RFLP (pemotongan DNA dengan enzim restriksi) dan fleksibilitas teknologi PCR (Vos *et al.*, 1995). Tahapan teknik AFLP terdiri dari ekstraksi DNA, pemotongan DNA dengan menggunakan enzim restriksi (biasanya menggunakan EcoR1 dan Mse1), meligasi fragmen restriksi dengan sekuen adapter, amplifikasi dengan PCR menggunakan dua primer yang berkomplemen dengan sekuen adapter, dan pemisahan ampikon dengan menggunakan gel poliakrimid atau elektroporesis kapiler. Metode AFLP dapat menghasilkan 50–100 fragmen DNA secara bersamaan dalam sekali pengujian. Jumlah ampikon dari setiap pengujian AFLP merupakan satu fungsi dari jumlah nukleotida selektif dalam kombinasi primer AFLP, motif nukleotide selektif, GC content, ukuran genome secara fisik dan kompleksitasnya.

Menurut Mondini *et al.* (2009) bahwa polimorfisme dalam analisis AFLP berasal dari tiga sumber, yaitu: (1) variasi sekuen pada satu atau kedua tempat restriksi fragmen flanking tertentu, (2) insersi dan delesi dalam amplifikasi fragmen, dan (3) perbedaan dalam sekuen-sekuen nukleotida yang berdekatan terhadap titik restriksi. AFLP memiliki tingkat polimorfisme yang lebih tinggi dibandingkan dengan RFLP. Keuntungan teknologi AFLP

adalah proses PCR yang cepat, menggunakan primer acak, dan tidak membutuhkan informasi sekuen. Keuntungan tersebut membuat AFLP dapat diaplikasikan untuk studi taksonomi secara molekuler, genetika populasi, identifikasi klon, kultivar, konstruksi peta genetik, dan lain-lain. Analisis AFLP juga mempunyai sejumlah keterbatasan, seperti, penanda dominan, terbatasnya tingkat polimorfisme dalam beberapa kultivar, membutuhkan kualitas dan jumlah DNA yang tinggi,

### Mikrosatelit

Mikrosatelit adalah sekuen DNA yang berulang, dimana satu motif mengandung satu sampai enam pasang basa yang diulang secara tandem dalam sejumlah waktu (Navascues dan Emerson, 2005). Jika ulangan tersebut cukup panjang dan tidak terpotong-potong (*uninterrupted*), mereka sangat baik digunakan sebagai penanda genetik karena tingkat polimorfisme mereka yang tinggi (Hancock, 1999; Powell *et al.*, 1996). Dalam literatur, mikrosatelit sering disebut sebagai *simple sequence repeats (SSRs)*, *short tandem repeat (STR)*, *variable number tandem repeat (VNTR)* dan *simple sequence length polymorphism (SSLP)*. Banyaknya istilah ini, cenderung membingungkan terutama ketika melakukan studi literatur, tetapi istilah mikrosatelit telah menjadi umum untuk menggambarkan motif DNA pendek yang berulang (Hancock, 1999).

Rata-rata kecepatan mutasi mikrosatelit berkisar dari 10<sup>-6</sup> sampai 10<sup>-2</sup> kejadian per lokus per generasi, lebih tinggi dibandingkan dengan rata-rata mutasi pada gen yang mengkodekan loci (Li *et al.*, 2002). Mutasi menghasilkan perubahan dalam jumlah unit ulangan dan itu diamati sebagai variasi panjang mikrosatelit. Ada dua mekanisme yang dapat menerangkan tingginya kecepatan mutasi mikrosatelit. Pertama, rekombinasi diantara kromosom DNA homolog melalui *unequal crossing over (UCO)* atau dengan konversi gen yang menghasilkan ketidaksempurnaan susunan dan menyebabkan adanya peningkatan ulangan dalam mikrosatelit. Kedua, *slippage strand mispairing (SSM)* yang terjadi selama replikasi DNA (Oliveira *et al.*, 2007; Ellegren 2004; Schlotterer, 2000; Schlotterer dan Tautz, 1992). Peristiwa ini dimulai dengan slipnya DNA polimerase selama replikasi yang menyebabkan template dan untai DNA yang baru menjadi tidak sejajar sementara waktu, ketika replikasi dilanjutkan, untai DNA harus disejajarkan kembali dan mutasi akan dihasilkan jika penjajaran ini tidak sempurna. Hilang atau majunya ulangan mikrosatelit dapat keluar dari loops DNA ganda (Schlotterer dan Tautz, 1992; Schlotterer, 1998; Eisen, 1999).

Dari dua jenis mekanisme mutasi yang disebutkan diatas, banyak peneliti menyatakan bahwa SSM selama replikasi DNA adalah penyebab utama ketidakstabilan mikrosatelit (Eisen, 1999). Rata-rata mutasi mikrosatelit dipengaruhi oleh sifat mikrosatelit, seperti: jumlah ulangan, motif ulangan sekuen, panjang unit ulangan, sekuen flanking, dan interruption dalam mikrosatelit, rata-rata transkripsi dan rata-rata rekombinasi (Schlotterer, 2000), *GC content*, suhu, metilasi dan siklus sel (Eisen, 1999), posisi kromosom, seks dan genotipe (Li *et al.*, 2002).

*Slippage strand mispairing* selama replikasi DNA dapat dikoreksi oleh *exonucleolytic proofreading* dan *mismatch repair*. *Exonucleolytic proofreading* adalah proses pengujian untaian DNA yang salah, yang dibuat oleh DNA polimerase selama sintesis DNA. Jika kesalahan ditemukan, exonuclease akan mendegradasi DNA tersebut dan kemudian akan mereplikasi kembali untaian DNA yang baru, dengan back-up DNA polimerase. Kesalahan yang dibuat oleh DNA polimerase tidak akan menjadi mutasi semuanya, sebab kesalahan itu akan diperbaiki (dihapus) oleh proofreading. *Exonucleolytic proofreading* mendeteksi kesalahan dengan memonitor DNA yang telah direplikasi, apakah membentuk struktur DNA *double helix* yang normal dengan untaian *template*-nya. Struktur DNA yang tidak normal akan merangsang (*trigger*) aktivitas *exonuclease*. *Proofreading* dipengaruhi oleh *GC content* dan sekuen DNA.

Mismatch repair berperan dalam mengenali dan memperbaiki kembali basa yang muncul karena salah dalam penggabungan. *Mismatch repairs* memainkan peranan kunci dalam meregulasi kestabilan mikrosatelit, perbedaan dalam perbaikan loops oleh mismatch repairs menyebabkan banyaknya variasi mikrosatelit di dalam dan diantara spesies (Eisen, 1999).

Ada beberapa permasalahan dalam menggunakan penanda mikrosatelit. Permasalahan ini dapat dikelompokkan ke dalam problem praktek dan problem data. Problem praktek meliputi: i) Pemilihan primer untuk mikrosatelit, banyak jenis primer yang telah didisain untuk analisis mikrosatelit pada tanaman. Primer-primer itu perlu di-*screening* dan dioptimasi sebelum diaplikasikan pada jenis tanaman tertentu, karena setiap tanaman mempunyai karakteristik spesifik yang berbeda satu sama lain. ii) *Slippage* selama proses amplifikasi, termopolimerase dapat slip sehingga menghasilkan produk yang berbeda dalam ukurannya. iii) Ukuran produk amplifikasi berbeda dari ukuran produk sebenarnya. Ketidakakuratan dalam identifikasi alel mungkin

juga disebabkan oleh Taq polimerase yang menambah nukleotida adenosin sampai ujung 3' produk amplifikasi. Ginot *et al.* (1996) menyatakan untuk mengatasi permasalahan ini adalah dengan menambah polimerase pfu selama atau setelah proses PCR, atau dengan menggunakan polimerase DNA T4 setelah PCR.

Homoplasi adalah salah satu problem data dalam analisis mikrosatelit. Homoplasi didefinisikan sebagai dua alel sama dalam keadaan, tetapi tidak sama secara keturunan. Homoplasi mungkin menyebabkan problem dalam analisis studi genetika populasi, dimana dapat mempengaruhi pengukuran keragaman genetik, aliran gen, jarak genetik, ukuran neighbourhood, metode penetapan dan analisis filogenetik (Estoup *et al.*, 2002). Homoplasi dalam analisis DNA kloroplas menggunakan mikrosatelit dianggap sebagai sebuah pembatas utama, ketika digunakan sebagai penanda genetik (Provan *et al.*, 2001). Para peneliti secara umum telah menganggap bahwa tingkat homoplasi cukup rendah pada mikrosatelit menggunakan DNA kloroplas (Cuenca *et al.*, 2003).

Mikrosatelit mempunyai karakteristik sebagai berikut: tingkat polimorfisme yang tinggi, bersifat kodominan, dan diwariskan mengikuti hukum mendel (Powell *et al.*, 1996; Hancock, 1999). Mikrosatelit telah diaplikasikan untuk: i) Identifikasi forensik (Balding, 1999), bertujuan untuk mengkaitkan sampel darah, sperma, jaringan rambut atau daging dari kasus kriminal, ii) Diagnosis dan identifikasi penyakit, seperti deteksi kanker (Moxon *et al.*, 1999), iii) Studi populasi genetika, untuk mengamati variasi dan membuat kesimpulan tentang struktur populasi, hanyutan genetik (*genetic drift*), dan *genetic bottlenecks*, iv) Konservasi biologi, untuk mengamati perubahan dalam populasi, pengaruh fragmentasi dan interaksi populasi yang berbeda serta untuk identifikasi populasi yang baru terbentuk.

### **Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)**

Penanda CAPS sering juga dikenal dengan penanda PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Konieczny dan Ausubel, 1993). Secara teknis, penanda CAPS dihasilkan dari dua tahapan kegiatan, pertama DNA template diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer spesifik. Primer spesifik didisain berdasarkan informasi sekuen DNA yang tersedia di bank genom, sekuen cDNA atau klon pita-pita RAPD; kedua, Produk PCR kemudian dipotong dengan enzim restriksi. Biasanya enzim restriksi yang digunakan

adalah empat basa yang memiliki tempat pemotongan (*restriction site*) spesifik. Hasil pemotongan dengan enzim restriksi kemudian dipisahkan dengan gel agarose atau poliakrilamid pada konsentrasi tertentu, sehingga akan diperoleh pola pita polimorfik atau pita monomorfik. Adanya variasi pola pita yang dihasilkan merupakan akibat insersi atau delesi satu nukleotida yang mengakibatkan berubah tempat pemotongan enzim restriksi.

Penanda CAPS memiliki beberapa kelebihan, yaitu: i) membutuhkan kuantitas DNA *template* yang rendah (50-100 ng per reaksi) untuk PCR, ii) bersifat kodominan (Matsumoto dan Tsumura, 2004) dan lokus spesifik sehingga dapat digunakan untuk membedakan individu homozigot dan heterozigot, iii) tidak memerlukan tahapan hibridisasi southern blot, dan iv) tidak menggunakan radioaktif. Kelemahan penanda ini adalah: i) dibutuhkan informasi sekuen DNA dalam mendisain primer spesifik untuk PCR; ii) sulit mendapatkan pola pita polimorfik karena ukuran fragmen hasil amplifikasi PCR yang pendek yaitu 300-1800 bp serta terbatasnya mutasi, sehingga memerlukan skrining dengan banyak enzim restriksi. Untuk mengatasi kelemahan ini para peneliti telah mengembangkan varian baru dari CAPS yang disebut dCAPS (*derived cleaved amplified polymorphic sequence*), dimana metode tersebut mengeleminasi permasalahan yang berkaitan dengan penanda CAPS dengan menghasilkan mismatches dalam primer PCR yang kemudian digunakan untuk menghasilkan polimorfisme berdasarkan target mutasi (Michaels dan Amasino, 1998; Neff *et al.*, 1998).

Penanda CAPS atau PCR-RFLP dapat diaplikasikan pada DNA nuklear atau organel. Pada tanaman, DNA kloroplas sering menjadi target untuk amplifikasi dengan penanda ini. Penanda ini diaplikasi untuk studi pemetaan gen (Akopyanz *et al.*, 1992; Konieczny dan Ausubel, 1993), distribusi geografi spesies seperti Oak (Petit *et al.*, 2002a), studi filogenetik (species dipterocarp, Indrioko *et al.*, 2006), identifikasi refugia dan rute rekolonisasi spesies (Petit *et al.*, 2002b).

### **Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)**

SCAR adalah fragmen DNA yang diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik yang didesain dari sekuen nukleotida dari klon fragmen RAPD yang terkait dengan ciri yang menjadi perhatian utama (Paran dan Michelmore, 1993). Variasi polimorfisme dapat dideteksi dengan elektroporesis pada gel agarose atau

poliakrilamid. Keuntungan penanda ini adalah cepat dan mudah digunakan, reproducibility yang tinggi, memiliki lokus spesifik, dan kuantitas DNA template yang diperlukan sedikit (10–100 ng per reaction), kurang sensitive terhadap kondisi reaksi, bersifat kodominan. Kelemahan adalah butuh informasi sekuen untuk mendisain primer untuk PCR. Penanda SCAR digunakan untuk identifikasi kultivar (Wang *et al.*, 2001; Busconi *et al.*, 2006; Warudee *et al.*, 2006; Theerakulpisut *et al.*, 2008), lokasi gen resisten penyakit (Paran dan Michelmore, 1993; Anandaraj *et al.*, 2008; Filho *et al.*, 2002), dan pemetaan genetik (Lahogue *et al.*, 1998; Hernandez *et al.*, 2001).

### **Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)**

*Single Strand Conformation Polymorphism* (utas tunggal konformasi polimorfime) adalah pergeseran mobilitas molekul DNA utas tunggal pada gel poliakrilamid netral, polimorfime dideteksi sebagai hasil pelipatan diferensial utas tunggal DNA karena adanya perbedaan sekuen (biasanya satu pasang basa) (Orita *et al.*, 1989).

Pengujian dengan menggunakan penanda SSCP terdiri dari beberapa tahapan, Pertama, satu atau lebih fragmen DNA diamplifikasi dengan PCR. Produk amplifikasi kemudian didenaturasi dengan pemanasan, dan selanjutnya dielektroporesis pada gel poliakrilamid. SSCP dideteksi sebagai perbedaan mobilitas individu fragmen DNA terhadap fragmen DNA yang lain. Teknik ini adalah memiliki sensitifitas yang tinggi dalam mendeteksi perbedaan fragmen DNA disebabkan oleh mutasi posisi satu nukleotida. Fragmen dapat dilabel dengan radioisotope atau pewarna fluorescen selama atau sesudah tahapan PCR dan pita-pita kemudian dideteksi dengan autoradiograph atau fluorometry. sedangkan fragmen yang tidak dilabel dapat divisualisasi dengan pewarnaan menggunakan etidium bromida. Keuntungan analisis SSCP adalah secara teknik sederhana dan cepat, serta memiliki sensitifitas yang tinggi dalam mendeteksi mutasi seperti substitusi, delesi atau insersi (Hayashi, 1993). Kelemahan SSCP adalah membutuhkan waktu dan tenaga untuk optimasi PCR dan elektroporesis, relatif mahal dan tidak otomatis. SSCP digunakan untuk pemetaan genetic (Plomion *et al.*, 1999; Shirasawa *et al.*, 2004), identifikasi spesies (Widyatmoko *et al.*, 2010; Lekawipat *et al.*, 2003), populasi genetik (Vijayan *et al.*, 2010).

### **DNA barkoding (*Barcoding DNA*)**

DNA barkoding adalah satu atau lebih sekuen gen pendek yang diambil dari bagian genom standar yang digunakan untuk mengidentifikasi species (Kress dan Erickson, 2008a; 2008b). Kriteria minimal sekuen DNA yang dapat dijadikan sebagai DNA barkoding adalah: 1) memiliki perbedaan dan variabilitas genetik yang tinggi pada tingkat spesies, 2) memiliki ukuran sekuen DNA pendek sehingga mudah untuk ekstraksi DNA dan amplifikasi, 3) menggunakan primer universal untuk amplifikasi PCR (Kress dan Erickson, 2008a; 2008b), sedangkan Taberlet *et al.* (2007) DNA barkoding yang ideal seharusnya memiliki kriteria sebagai berikut, yaitu Pertama, harus cukup bervariasi untuk membedakan semua spesies, tetapi cukup terkonservasi dan kurang bervariasi di dalam dan di antara spesies. Kedua, harus distandarkan, dengan daerah DNA yang sama seharusnya dapat membedakan golongan taksonomi spesies. Ketiga, sasaran daerah DNA harus mengandung informasi filogenetik yang cukup untuk memudahkan identifikasi spesies dan golongan taksonominya (spesies, familia, dsb). Keempat, harus cukup kuat, dengan lokasi primer yang terkonservasi, dan tingkat amplifikasi dan sekuensing DNA yang dapat dipercaya. Ini penting ketika menggunakan DNA yang tercampur dengan banyak species untuk diidentifikasi pada waktu yang sama. Kelima, sasaran daerah DNA harus cukup pendek untuk memudahkan amplifikasi DNA yang terdegradasi.

Beberapa kandidat gen yang disarankan untuk barkoding DNA tanaman kebanyakan berada pada DNA kloroplas, yang meliputi gen *accD*, *matK*, *ndhJ*, *rpoB2*, *rpoC1*, and *ycf5*, (Chase *et al.*, 2007, Lahaye *et al.*, 2008); *rbcl*, (Kress dan Erickson, 2007); *trnL* intron, (Taberlet *et al.*, 2006); dan *trnH-psbA* (Kress *et al.*, 2005; Kress dan Erickson, 2007). *The Internal Transcribed Spacer (ITS)*, di DNA *nuclear* tanaman juga menunjukkan bagian yang menjanjikan sebagai DNA barkoding tanaman (Kress *et al.*, 2005; Sass *et al.*, 2007). Dari sekian banyak gen kandidat yang dapat digunakan untuk barkoding DNA tanaman, *Consortium for the Barcoding of Life (CBOL) Plant Working Group* (2009) merekomendasikan tiga gen yang dapat digunakan untuk DNA barkoding tanaman, yaitu *rbcl*, *matK* dan *ITS*, sedangkan pada hewan, sekuen DNA yang dapat dijadikan untuk barkod adalah gen *cytokrom c* oksidasi (*COI*) di DNA mitokondria. Pada tanaman gen *COI* tidak dapat digunakan sebagai barkoding karena rendahnya tingkat perubahan sekuen, variabilitas yang rendah antar species. DNA

barkoding dapat digunakan untuk: i) bidang taksonomi dan filogenetik tanaman (Kress *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2009), untuk mengidentifikasi tanaman, yang selama ini dilakukan secara morfologi, dan dengan adanya penggunaan data DNA tentu akan menghasilkan identifikasi tanaman yang lebih akurat, ii) untuk mengidentifikasi kemurnian produk biologi (Valentini *et al.*, 2010).

#### DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, M., N. Shrivastava, and H. Padh. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reporter*, 27: 617–631. DOI 10.1007/s00299-008-0507-z
- Anandaraj, M., S. Chandran, R.S. George, A.I. Bhat, and R.S. Bhai. 2008. Development of SCAR marker for Phytophthora resistance in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of Spices and Aromatic Crops* 17(3): 215–222
- Akopyanz, N., N.O. Bukanov, T.U. Westblom, and D.E. Berg. 1992. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research*, 20: 6221-6225.
- Balding, D. 1999. Forensic applications of microsatellite markers. In: Golstein, DB. and Schlötterer, C. (Eds.). *Microsatellite: evolution and applications*. Oxford University Press. pp. 198-210.
- Botstein, D., R. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of genetic linkage map in human, using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Brubaker, C.L. And J.F. Wendel. 1994 Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*; Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *American Journal of Botany*, 81: 1309–1326
- Busconi, M.L., Sebastiani, and C. Fogher. 2006. Development of SCAR markers for germplasm characterisation in olive tree (*Olea europea* L.). *Molecular Breeding*, 17: 59–68, DOI 10.1007/s11032-005-1395-3
- Chase, M.W., R.S. Cowan, P.M. Hollingsworth, C. Van Den Berg, S. Madrin'an, G. Petersen, O. Seberg, T. Jorsensen, K.M. Cameron, M. Carine, N. Pedersen, T.A.J. Hedderson, F. Conrad, G.A. Salazar, J.E. Richardson, M.L. Hollingsworth, T.G. Barraclough, L. Kelly, and M. Wilkinson. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295–299.
- Cheng, K.T., H.C. Chang, C.H. Su, and F.L. Hsu. 1997. Identification of dried rhizomes of *Coptis* species using random amplified polymorphic DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 38: 241-244
- Dubreuil, P., P. Dufour, E. Krejci, M. Causse, D. De Vienne, A. Gallais, and A. Charcosset. 1996. Organization of RFLP diversity among inbred lines of maize representing the most significant heterotic groups. *Crop Science*, 36: 790–799
- Consortium for the Barcoding of Life (CBOL) Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106: 12794-12797.
- Cuenca, A., A.E. Escalante, and D. Pinero. 2003. Long distance colonization, isolation by distance and historical demography in a relictual Mexican Pinyon Pine (*Pinus nelsoii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). *Molecular Ecology*, 12: 2087-2097.
- Eisen, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Golstein, D. B. and Schlötterer, C. (Eds.). *Microsatellite: evolution and applications*. Oxford University Press. pp. 34-48.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews*, 5: 435-445
- Estoup, A., P. Jarne, and J.M. Cornent. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology*, 11: 1591-1604.
- Filho, S.M., C.S. Sedyama, M.A. Moreira, and E.G. de Barros. 2002. RAPD and SCAR markers linked to resistance to frog-eye leaf spot in soybean. *Genetics and Molecular Biology*, 25(3): 317-321

- Ginot, F., I. Bordelais, S. Nguyen, and G. Gyapay. 1996. Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of the base overhangs. *Nucleic Acids Research*, 24(3): 540-541.
- Gonzalez, M.A., C. Baraloto, J. Engel, S.A. Mori, P. Petronelli, B. Riera, A. Roger, C. Thebaud, and J. Chave. 2009. Identification of Amazonian Trees with DNA Barcodes. *PLoS ONE* 4(10): e7483. doi:10.1371/journal.pone.0007483
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanism. In: Golstein, D. B. and Schlötterer, C. (Eds.). *Microsatellite: evolution and applications*. Oxford University Press. pp. 1-9.
- Hayashi, K. 1992. PCR-SSCP—rapid and easy detection of DNA sequence changes. *Human Cell*, 5: 180–184
- Hernandez, P., R. Rosa, L. Rallo, G. Dorado, and A. Martin. 2001. Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 788–791.
- Indrioko, S., O. Gailing, and R. Finkeldey. 2006. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Indonesia based on chloroplast DNA. *Plant Systematics and Evolution*, 261: 99-115
- Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. Van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmiroli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rudea, R. Linacero, A. Vazquez, and A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381–390
- Karsinah, Sudarsono, L. Setyobudi, dan H. Aswidinnoor. 2002. Keragaman Genetik Plasma Nutfah Jeruk Berdasarkan Analisis Penanda RAPD. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, 7(1): 8-16.
- Konieczny, A. and F.M. Ausubel. 1993. Procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant Journal*, 4: 403–410
- Kress, W.J., D.L. Erickson, N.G. Swenson, J. Thompson, M. Uriarte, and J.K. Zimmerman. 2010. Advances in the Use of DNA Barcodes to Build a Community Phylogeny for Tropical Trees in a Puerto Rican Forest Dynamics Plot. *PLoS ONE* 5(11): e15409. doi:10.1371/journal.pone.0015409
- Kress, W.J. and D.L. Erickson. 2008a. DNA Barcoding—a Windfall for Tropical Biology? *Biotropica*, 40(4): 405–408 DOI: 10.1111/j.1744-7429.2008.00426.x
- Kress, W.J. and D.L. Erickson. 2008b. DNA barcoding: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 2761–2762.
- Kress, W.J. and D.L. Erickson. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcl* gene complements the noncoding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2: e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508.
- Kress, W.J., K.J. Wurdack, E.A. Zimmer, L.A. Weigt, and D.H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102: 8369–8374.
- Lahogue, F., P. This, and A. Bouquet. 1998. Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 950–959
- Lahaye, R., M. Van Der Bank, D. Bogarin, J. Warner, F. Pupulin, G. Gigot, O. Maurin, S. Duthoit, T.G. Barraclough, and V. Savolainen. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709936105
- Lekawipat, N., K. Teerawatanasuk, A. Vanavichit, T. Toojinda, and S. Tragoonrung. 2003. Evaluating the genetic relatedness of wild and cultivated *Hevea brasiliensis* accessions with SSCP



- markers. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 35(2): 123-134,
- Li, A., S. Ge. 2006. Genetic variation and conservation of *Changnienia amoena*, an endangered orchid endemic to China. *Plant Systematic and Evolution*, 258: 251–260. DOI 10.1007/s00606-006-0410-4
- Li, Y.C., A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, and E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.
- Lynch, M. and B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91–99.
- Matsumoto, A. and Y. Tsumura. 2004. Evaluation of cleaved amplified polymorphic sequence markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 80–91.
- Medri, C., E.A. Ruas, C.F. Ruas, P.S. Medri, M.E. Medri, and P.M. Ruas. 2011. Population genetic structure of the tropical tree species *Aegiphila sellowiana* (Lamiaceae). *Genetic Molecular Research*, 10(4): 3186-3198.
- Michaels, S.D., and R.M.A. Amasino. 1998. A robust method for detecting single nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *Plant Journal*, 14: 381–385
- Miller, J.C. and S.D. Tanksley. 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 437– 448
- Mondini, L., A. Noorani, and M.A. Pagnotta. 2009. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. *Diversity*, 1: 19-35; doi:10.3390/d1010019
- Moxon, E.R. and C. Wills. 1999. DNA Microsatellites: agents of evolution? *Scientific American*, 280(1): 94-99
- Mullis, K.B. and F. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymology*, 155: 350–355
- Navascues, M., B.C. Emerson 2005. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasmy. *Molecular Ecology*, 14: 1333 – 1341.
- Neff, M.M., J.D. Neff, J. Chory, and A.E. Pepper. 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant Journal*, 14: 387–392
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. *PCR: Basic Principles and Methods*. EngBios Scientific Publisher, Oxford.
- Oliveira, E.D., J.P. Padua, M.I. Zucchi, R. Vencovsky, and M.L.C. Vieira. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetic and Molecular Biology*, 29(2): 294-307.
- Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 985–999
- Palai, S.K. and G.R. Rout. 2007. Identification and genetic variation among eight varieties of ginger by using random amplified polymorphism DNA markers. *Plant Biotechnology*, 24: 417-420.
- Petit, R., S. Brewer, S. Bordács, K. Burg, R. Cheddadi, E. Coart, J. Cottrell, U. Csaikl, B. van Dam, D. Deans, S. Espinel, S. Fineschi, R. Finkeldey, I. Glaz, P.G. Goicoechea, J.S. Jensen, A.O. König, A.J. Lowe, S.F. Madsen, G. Mátyás, R.C. Munro, F. Popescu, D. Slade, H. Tabbener, S.G.M. de Vries, B. Ziegenhagen, J.L. de Beaulieu, and A. Kremer. 2002. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, 156: 49-74
- Petit, R., U. Csaikl, S. Bordács, K. Burg, E. Coart, J. Cottrell, B. van Dam, D. Deans, S. Dumolin-Lapègue, S. Fineschi, R. Finkeldey, A. Gillies, I. Glaz, P.G. Goicoechea, J.S. Jensen, A.O. König, A.J. Lowe, S.F. Madsen, G. Mátyás, R.C. Munro, M. Olalde, M.-H. Pemonge, F. Popescu, D. Slade, H. Tabbener, D.

- Taurchini, S.G.M. de Vries, B. Ziegenhagen, and A. Kremer. 2002. Chloroplast DNA variation in European white oaks. Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, 156: 5-26
- Plomion, C., P. Hurme, J.M. Frigerio, M. Ridolfi, D. Pot, C. Pionneau, C. Avila, F. Gallardo, H. David, G. Neutelings, M. Campbell, F.M. Canovas, O. Savolainen, C. Bodenes, and A. Kremer. 1999. Developing SSCP markers in two Pinus species. *Molecular Breeding*, 5: 21–31.
- Provan, J., W. Powell, and P.M. Hollingsworth. 2001. Chloroplast microsatellites : new tools for studies in plant ecology and evolution. *TREE*. 16 (3): 142 - 147.
- Powell, W., M. Morgante, R. McDevitt, G.G. Vendramin, and J.A. Rafalski. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: application to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 7759-7763.
- Powell, W., G.C. Machray, and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trend in Plant Science Reviews*, 1(7): 215 – 222.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 2766–2770
- Sass, C., D.P. Little, D.W. Stevenson, and C.D. Specht. 2007. DNA barcoding in the Cycadales: Testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. *PLoS ONE* 2: e1154.doi:10.1371/journal.pone.0001154
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-371.
- Schlötterer, C. 1998. Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences?. *Current Biology*, 8(4):132-134.
- Schlötterer, C. and D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20(2): 211-215.
- Shirasawa, K., L. Monna, S. Kishitani, and T. Nishio. 2004. Single nucleotide polymorphisms in randomly selected genes among japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties identified by PCR-RF-SSCP. *DNA Research*, 11: 275-283.
- Sondur, S.N., R.M. Manshardt, and J.I. Stiles. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 547-553
- Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, L. Gielly, C. Miquel, A. Valentini, T. Vermet, G. Corthier, C. Brochmann, and E. Willerslev. 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, e14.doi:10.1093/nar/gkl938
- Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, L. Gielly, C. Miquel, A. Valentini, T. Vermet, G. Corthier, C. Brochmann, and E. Willerslev. 2006. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, e1–8 doi:10.1093/nar/gkl938.
- Te-chato, S., M. Lim., and M. Masahiro. 2005. Comparison of cultivar identification methods of longkong, langsat and duku: Lansium spp. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 27(30): 465-471.
- Theerakulpisut, P., N. Kanawapee, D. Maensiri, S. Bunnag, and P. Chantaranothai. 2008. Development of species-specific SCAR markers for identification of three medicinal species of Phyllanthus. *Journal of Systematics and Evolution*, 46 (4): 614–621
- Valentini, A., C. Miquel, P. Taberlet. 2010. DNA Barcoding for Honey. *Biodiversity Diversity*, 2: 610-617; doi:10.3390/d2040610
- Vijayan, K., C.V. Nair, and S.R. Urs. 2010. Assessment of genetic diversity in the tropical mulberry Silkworm (*Bombyx mori* L.) with mtDNA-SSCP and SSR markers. *Emirate Journal of Food Agriculture*, 22 (2): 71-83

- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Vandeleer, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Wang, J., W.H. Ha, F.N. Ngan, P.P.H. But, and P.C. Shaw. 2001. Application of sequence characterized amplified region (SCAR) analysis to authenticate *Panax* species and their adulterants. *Planta Medica*, 67: 781–783.
- Warudee, D., P. Chavan, K. Joshi, and B. Patwardhan. 2006. Development and application of RAPD-SCAR marker for identification of *Phyllanthus emblica* Linn. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 2313–2316.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and G. Kahl. 2005. *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*. Second Edition. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Widyatmoko, A.Y.P.B.C., A. Watanabe, and S. Shiraishi. 2010. Study on genetic variation and relationships among four acacia species using rapd and SSCP marker. *Journal of Forestry Research*, 7(2) : 125-143
- William, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA Polymorphism Amplified by arbitrary Primers are useful as genetic marker. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.

