

**LAPORAN HASIL PENELITIAN
HIBAH BERSAING LANJUTAN
TAHUN ANGGARAN 2012**



**JUDUL PENELITIAN
INDUKSI MUTASI DENGAN IRADIASI SINAR GAMMA UNTUK
PENGEMBANGAN KLON UNGGUL DAN UNIK ANGGREK
Spathoglottis plicata Blume ASAL BENGKULU**

PENELITI :

- 1. Dr.Ir. Rustikawati, M.Si**
- 2. Ir. Atra Romeida, M.Si**
- 3. Dr. Dewi Sukma, SP, M.Si**

**DIBIYAI OLEH DANA DIPA UNIVERSITAS BENGKULU
NOMOR : 0824/023-04.2.16/08/2012, Tanggal 9 Desember 2011
SESUAI DENGAN SURAT PERJANJIAN PELAKSANAAN PENUGASAN
PENELITIAN HIBAH BERSAING LANJUTAN
NOMOR : 2011/UN30.10.06.01/HK/2012, Tanggal 2 Maret 2012**

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS BENGKULU
TAHUN ANGGARAN 2012**

**HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING LANJUTAN**

1. Judul Penelitian : **Induksi Mutasi Dengan Iradiasi Sinar Gamma Untuk Pengembangan Klon Unggul Anggrek *Spathoglottis plicata* Blume Asal Bengkulu**
2. Ketua Peneliti :
- a. Nama Lengkap : Dr. Ir. Rustikawati, M.Si.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. NIP : 19650508.199001.2.001
- d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- e. Jabatan Struktural : -
- f. Bidang Keahlian : Pemuliaan Tanaman
- g. Fakultas/Jurusan : Pertanian/Budidaya Pertanian
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Bengkulu
- i. Tim Peneliti :


No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Dr. Ir. Atra Romeida, M,Si	Pemuliaan Tanaman	Faperta/Budidaya Pertanian	UNIB
2.	Dr.Dewi Sukma, SP. MSi.	Kultur Jaringan/ Bioteknologi Tanaman	Peranian/Agronomi dan Hortikultura	IPB

3. Pembiayaan


- a. Jangka waktu Penelitian yang Diusulkan : 2 tahun
- b. Jumlah biaya tahun pertama yang disetujui : Rp 49.000.000,00
- b. Jumlah biaya tahun kedua yang disetujui : Rp 39.000.000,00

Bengkulu, Nopember 2012

Mengetahui,
Dekan Fakultas Peranian UNIB


Prof. Dr. Ir. Dwinardi Apriyanto, M.Sc.
NIP. 195804211984031002

Ketua Peneliti,


Dr. Ir. Rustikawati, M.Si.
NIP. 196505081990012001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian


Drs. Sarwit Sarwono, M.Hum.
NIP. 195811121986031002

RINGKASAN PENELITIAN

Anggrek *Spathoglottis plicata* merupakan salah satu tanaman anggrek teresterial yang dapat tumbuh dengan baik pada lingkungan yang marginal. Tahun pertama penelitian Hibah Bersaing telah mampu menghasilkan 9 mutan potensial hasil iradiasi sinar gamma. Mutan yang dihasilkan mempunyai perbedaan bentuk bunga dan warna bunga dibandingkan dengan tipe liarnya.

Tujuan utama penelitian ini adalah untuk **mengembangkan klon mutan unggul anggrek *S. plicata* asal Bengkulu melalui induksi mutasi dengan iradiasi sinar gamma.** Tujuan khusus penelitian lanjutan untuk Tahun II adalah (1) Mendapatkan mutan stabil sampai M1V3 melalui perbanyakan klonal berdasarkan karakter morfologi, (2) Mengkarakterisasi anggrek *S. plicata* dan mutan hasil iradiasi sinar gamma pada generasi M1V3 menggunakan karakter morfologi, (3) Menganalisis keragaman genetik secara molekuler menggunakan penanda ISSR, (4) Memproduksi massal mutan potensial dan unik secara *in vitro* menggunakan teknik meriklon.

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Laboratorium Kultur Jaringan Wing 8, lantai 6, Departemen AGH IPB Bogor. Bahan penelitian adalah lini meristem klonal anggrek *S. plicata* asal Bengkulu dan mutannya. Karakterisasi morfologi tanaman anggrek *S. plicata* dilakukan di rumah kawat dengan naungan 45% standar pemeliharaan anggrek tanah di Cibanteng Bogor. Karakter morfologi sebanyak 70 karakter yang diamati meliputi data akar, kormus, daun, bunga dan buah, menggunakan panduan karakterisasi anggrek (Balithi 2007). Karakterisasi molekuler menggunakan marka ISSR dilakukan di Pusat Kajian Buah-buahan Tropika LPPM IPB. Penelitian dilakukan mulai dari bulan November 2011 – Juni 2012. Perbanyakan tanaman mutan secara *in vitro* dilakukan mulai dari bulan Juni – Oktober 2012.

Data morfologi dan molekuler dianalisis menggunakan program NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis*) versi 2.02i. Metode pengelompokan menggunakan koefisien *dice* dari *Similarity for Qualitative Data* (SIMQUAL) dan *Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested* (SAHN) - *Unweighted pair-group*

method arithmetic average (UPGMA). Analisis komponen utama menggunakan metode *multivariate* program MINITAB.

Hasil analisis keragaman genetik berdasarkan marka morfologi dan marka molekuler menggunakan ISSR terhadap 9 tanaman mutan anggrek *S. plicata* hasil iradiasi sebelas taraf dosis sinar gamma dan 3 kultivar *S. plicata* sebagai pembandingnya, serta produksi massal meriklon dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Polimorfisme keragaman morfologi yang berasal dari 70 karakter yang dapat dirinci menjadi 177 sub karakter mutan anggrek *S. plicata* dan pembandingnya dikategorikan tinggi yaitu mencapai 89.27%.
2. Hasil analisis klustering karakter morfologi menggunakan metode UPGMA pada koefisien kemiripan 0.68 dan analisis komponen utama telah mampu mengelompokkan 9 mutan anggrek *S. plicata* dan 3 pembandingnya menjadi 5 kelompok utama, dengan nilai *goodness of fit* matriks korelasi (r) sebesar 0.89 (sesuai).
3. Total pita yang dihasilkan dari 10 primer ISSR sebanyak 360 pita, yang tersebar ke dalam 71 lokus ISSR. Polimorfisme pola pita DNA yang dihasilkan dari 10 primer ISSR menunjukkan keberagaman yang sangat tinggi hingga mencapai 91.14%.
4. Hasil analisis klustering pola pita ISSR menggunakan metode UPGMA pada koefisien kemiripan 0.68 dan analisis komponen utama terhadap 9 mutan anggrek *S. plicata* dan 3 pembandingnya mampu dibedakan dengan tegas menjadi 5 kelompok utama dengan nilai *goodness of fit* matrik korelasi (r) penanda molekuler mencapai 0.91 (sangat sesuai).
5. Perkembangan plb menjadi plantlet dan multiplikasi plantlet anggrek *S. plicata* yang terbaik dapat menggunakan medium MS vitamin B5 + 75 ml L⁻¹ air kelapa atau menggunakan medium MS + BA 20 µM + 2 % arang aktif dengan kriteria menghasilkan multiplikasi plb dan plantlet tertinggi dan penampilan visual plb dan plantlet yang prima pada hasil pengamatan pada 6 mst.

DAFTAR ISI

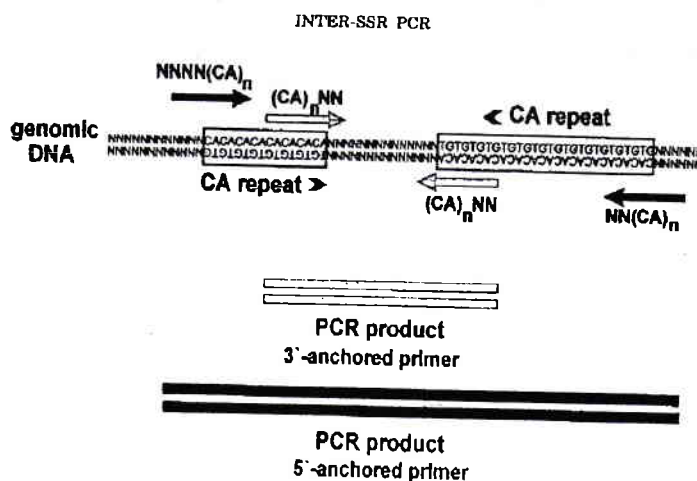
	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. STUDI PUSTAKA	3
2.1 Pemuliaaan Mutasi.....	3
2.2 Radiosensitivitas.....	6
2.3 Pemuliaan Mutasi pada Tanaman yang Berbiak secara Vegetatif.....	7
2.4 Pemuliaan Tanaman Hias dengan Mutasi Induksi.....	9
2.5 Analisis Keragaman Genetik Menggunakan <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> (ISSR).....	10
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	12
3.1 Tujuan Penelitian	12
3.2 Manfaat Penelitian	12
BAB IV. METODE PENELITIAN	15
4.1 Waktu dan Tempat.....	17
4.2 Bahan Tanaman.....	17
4.3 Analisis Penanda Morfologi.....	18
4.4 Analisis Penanda Molekuler menggunakan ISSR.....	21
4.5 Pengembangan Mutan Unggul dan Unik secara Massal melalui Teknik Meriklon secara <i>In vitro</i>	26

BAB V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	26
5.1	Analisis Penanda Morfologi.....	26
5.2	Analisis Kluster Berdasarkan Karakter Morfolologi.....	31
5.3	Analisis Komponen Utama Karakter Morfologi.....	33
5.4	Analisis Penanda Molekuler ISSR.....	37
5.5	Pengelompokan Mutan Anggrek <i>S. plicata</i> dan pembandingnya berdasarkan Profil ISSR.....	41
5.6	Pengelompokan Mutan Anggrek <i>S. plicata</i> dan pembandingnya Berdasarkan Nilai Analisis Komponen Utama Marka Molekuler (ISSR).....	42
5.7	Pengembangan Mutan Unggul dan Unik secara Massal melalui Teknik Meriklon secara <i>In vitro</i>	47
BAB VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	51
	DAFTAR PUSTAKA.....	53
	LAMPIRAN	57
B.	DRAFT ARTIKEL ILMIAH	69

BAB I. PENDAHULUAN

Karakterisasi tanaman dapat dilakukan menggunakan penanda morfologi maupun penanda molekuler. Karakterisasi berdasarkan penanda morfologi biasanya dipengaruhi oleh lingkungan makro dan mikro. Kesulitan dapat terjadi apabila dilakukan untuk karakter yang bersifat kuantitatif yang dikendalikan oleh banyak gen. Sebaiknya disamping melakukan karakterisasi morfologi untuk karakter kualitatif, juga dilakukan karakterisasi menggunakan penanda molekuler. Penanda molekuler dapat memberikan gambaran hubungan kekerabatan yang lebih akurat antara suatu spesies dengan kerabat dekat maupun kerabat jauhnya serta antara suatu spesies dengan mutannya, karena analisis DNA sebagai materi genetik tidak dipengaruhi oleh lingkungan (Liu *et al.* 2006). Pengambilan sampel DNA dapat dilakukan pada semua bagian tanaman (Trojanowska dan Bolibok 2004).

Penanda molekuler *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) merupakan salah satu penanda dengan motif sekuen berulang. Ada kalanya terdapat penambahan sekuen nukleotida baik bagian ujung 3' maupun ujung 5'. ISSR adalah fragmen DNA dengan ukuran 100-3 000 bp berlokasi diantara wilayah mikrosatelit, wilayah amplifikasi sekuen DNA yaitu ISSR bagian *flanked* genom secara berlawanan area yang dekat dengan sekuen berulang (Zietkiewicz *et al.* 1994). Area amplifikasi dapat dilihat Gambar 1.



Gambar 1. Wilayah amplifikasi ISSR (Zietkiewicz *et al.* 1994).

Keuntungan penggunaan marker molekuler, khususnya ISSR antara lain (1) tidak dipengaruhi musim dan lingkungan (Azrai 2005), (2) tidak diperlukannya data sekuen terlebih dahulu, (3) membutuhkan 5-50 ng templat DNA per reaksi, (4) ISSR tersebar diseluruh genom (5) dapat menghasilkan pola polimorfisme lebih tinggi dari RAPD pada beberapa tanaman (Liu *et al.* 2008), (6) menghasilkan polimorfisme tingkat inter species (Zietkiewicz *et al.* 1994), (7) bersifat dominan (Soltis *et al.* 1998, Kumar *et al.* 2009), (8) dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik dan analisis kekerabatan (Trojanowska dan Bolibok 2004).

Penggunaan zat pengatur tumbuh sitokinin alami maupun sintetik untuk memacu multiplikasi dan pertumbuhan tunas mikro sudah digunakan secara luas pada berbagai jenis tanaman, namun jenis dan konsentrasinya berbeda-beda untuk berbagai jenis tanaman. Penggunaan sitokinin tersebut juga sangat penting untuk perbanyak *in vitro* berbagai jenis anggrek, termasuk anggrek *S. plicata*. Umumnya anggrek sudah dapat tumbuh tanpa penambahan sitokinin pada medium tanamnya, namun dengan penambahan sitokinin dapat memacu multiplikasi plb dan planlet menjadi lebih cepat. Sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang sangat berperan dalam proses proliferasi sel (Ramirez-Parra 2005), menginduksi pembelahan sel serta pembentukan dan perkembangan tunas (Mok 1994), mengaktifkan pucuk tunas lateral yang dorman (Napoli *et al.* 1999) serta memperlambat *senescence* (Gan dan Amasino 1995).

BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

Hasil analisis keragaman genetik berdasarkan marka morfologi dan marka molekuler menggunakan ISSR terhadap 9 tanaman mutan anggrek *S. plicata* hasil iradiasi sebelas taraf dosis sinar gamma dan 3 kultivar *S. plicata* sebagai pembandingnya, dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Polimorfisme keragaman morfologi yang berasal dari 70 karakter yang dapat dirinci menjadi 177 sub karakter mutan anggrek *S. plicata* dan pembandingnya dikategorikan tinggi yaitu mencapai 89.27%.
2. Hasil analisis klustering karakter morfologi menggunakan metode UPGMA pada koefisien kemiripan 0.68 dan analisis komponen utama telah mampu mengelompokkan 9 mutan anggrek *S. plicata* dan 3 pembandingnya menjadi 5 kelompok utama, dengan nilai *goodness of fit* matriks korelasi (r) sebesar 0.89 (sesuai).
3. Total pita yang dihasilkan dari 10 primer ISSR sebanyak 360 pita, yang tersebar ke dalam 71 lokus ISSR. Polimorfisme pola pita DNA yang dihasilkan dari 10 primer ISSR menunjukkan keberagaman yang sangat tinggi hingga mencapai 91.14%.
4. Hasil analisis klustering pola pita ISSR menggunakan metode UPGMA pada koefisien kemiripan 0.68 dan analisis komponen utama terhadap 9 mutan anggrek *S. plicata* dan 3 pembandingnya mampu dibedakan dengan tegas menjadi 5 kelompok utama dengan nilai *goodness of fit* matrik korelasi (r) penanda molekuler mencapai 0.91 (sangat sesuai).
5. Perkembangan plb menjadi plantlet dan multiplikasi plantlet anggrek *S. plicata* yang terbaik dapat menggunakan medium MS vitamin B5 + 75 ml L⁻¹ air kelapa atau menggunakan medium MS + BA 20 µM + 2 % arang aktif dengan kriteria menghasilkan multiplikasi plb dan planlet tertinggi dan penampilan visual plb dan planlet yang prima pada hasil pengamatan pada 6 mst.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil pengamatan dilapang dan analisis data yang telah dilakukan maka dapat disarankan :

1. Untuk mempertahankan bahan tanam dalam bentuk plb maupun plantlet sebaiknya dilakukan sub kultur secara rutin 6 minggu sekali berselang seling antara medium yang menggunakan arang aktif dan tanpa arang aktif.
2. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui genotipe tanaman mutan perlu diuji menggunakan marka *co-dominant*.
3. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk memperbanyak klonal mutan-mutan yang sudah stabil menggunakan teknik memperbanyak lini klon plb, tapi menggunakan bahan tanam meristem tunas tanaman mutan.
4. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan uji *selfing* tanaman mutan (M1) untuk mengetahui apakah tanaman mutan sudah seragam atau masih terjadi segregasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah TL, J Endan, and M Nazir. 2009. Changes in Flower Development, Chlorophyll Mutation and Alteration in Plant Morphology of *Curcuma alismatifolia* by Gamma Irradiation. American Journal of Applied Sciences 6 (7): 1436-1439
- Ahloowalia BS. 1992. *In vitro* variation induced mutants in chrysanthemum. Mutation Breeding Newsletter 39:6
- Aisyah SI, H Aswidinnor, dan A Saefuddin. 2009. Induksi mutasi stek pucuk Anyelir (*Dianthus caryophyllus* Linn.) melalui iradiasi sinar gamma. J. Agron. Indonesia 37(1):62-70
- Albert B, D Bray, J Lewis, M Raff, K Robert, and JD Watson. 1994. Molecular Biology of Cell. Third Eddition. pp 341
- Azrai M. 2005. Pemanfaatan marka molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. Jurnal Agro Biogen 1(1):26-37.
- Balithi. 2007. Panduan Karakterisasi Tanaman Anggrek, Balithi-Segunung. Cipanas.
- Banerji BK, and SK Datta. 1992. Gamma Ray induced flower shape mutation in crisanthemum cv 'Java'. J. Nuclear Agric. Biol. 21(2):73-79
- Brock RD. 1979. Mutation of Plant Breeding for Seed Protein Improvement. p. 43-45. In Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes. Proc. Symp. IAEA/FAO/GSF, Neuherberg, BRD. 1978., IAEA, Vienna.
- Broertjes C, and AM van Harten. 1988. Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops. Elsevier, Amsterdam. 345 p.
- Busey P, and BK Banerji. 1993. Gamma ray induced somatic mutation in chrysanthemum cv. "Kalyani Mauve". J. Nuclear Agric. Biol. 22(1):19-27.
- Busey P. 1980. Gamma ray dosage and mutation breeding in St. Augustinegrass. Crop Sci. 20 : 181-184.
- Busey P. 2001. Mutation studies on garden chrysanthemum : A review. Scientific Horticulture 7:159-199.
- Chahal GS, and SS Gosal. 2003. Principles and Procedures of Plant Breeding. Biotechnological and Conventional Approaches. Narosa Publishing House.
- Donini B, and A Micke. 1984. Use of Induced mutations in improvement of vegetatively propagated crop. IAEA-TECDOK-305:79-96
- Gan S, Amasino RM. 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. Science 270:1986-1988
- Guo HB, Huang KY, Zhou TS, Wu QH, Zhang YJ, Liang ZS. 2009. DNA isolation, optimization of ISSR-PCR system and primers screening of *Scutellaria baicalensis*. Journal of Medicinal Plants Research 3(11): 898-901.
- Gupta PP, O Schieder, and M Gupta. 1984. Intergeneric nuclear gene transfer between somatically and sexually incompatible plants through asymmetric protoplas fusion. Molecular and General Genetic 197:30-35

- Hartatik. 2000. Studi Genetik Plasma Nutfah Tebu (*Saccharum spp.*) Berdasarkan penanda Morfologi, Agronomi dan Isozim. [Tesis] Program Pascasarjana IPB Bogor. 138pp.
- Hee KH, Loh CS, Yeoh HH. 2009. Early in vitro flowering and seed production in vitro culture in *Dendrobium Chao Praya Smile* (Orchidaceae). *Plant Cell Rep.* 26 : 2055-2062.
- Herison C, Rustikawati, SH Sutjahjo dan SI Aisyah. 2008. Induksi mutasi melalui iradiasi sinar gamma terhadap benih untuk meningkatkan keragaman populasi dasar jagung (*Zea mays L.*). *J. Akta Agrosia* 11(1):57-61
- Ho Y, Hung TY. 2011. Cladistic relationships within the genus *Cinnamomum* (Lauraceae) in Taiwan based on analysis of leaf morphology and inter-simple sequence repeat (ISSR) and internal transcribed spacer (ITS) molecular markers. *African Journal of Biotechnology* 10(24):4802-4815.
- Human S. 2003. Peran iptek nuklir dalam pemuliaan tanaman untuk mendukung industri pertanian. Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), Jakarta.
- International Atomic Energy Agency [IAEA]. 1977. Manual on Mutation Breeding, 2nd edition. Tech. Report Series No.119. Joint FAO/IAEA. Vienna: Div. of Atomic Energy in Food and Agriculture. 286 p.
- Ismachin M. 2007. Ilmu Pemuliaan Mutasi (Materi Diklat) BATAN. Jakarta
- Kumar, P. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. Review Article. *Plant Omics J.* 2(4):141-162.
- Lamseejan S, P Jompok A Wongpiyasatid, S Deeseepan, and P Kwanthammachart. 2000. Gamma-rays induced morphological change in *Crysanthemum* (*Crysanthemum morifolium*). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 34:417-422.
- Lapins KO. 1974. Compact Stella sweet cherry introduced. *Mutation Breeding News Letter.* IAEA, 4:8.
- Liu JJ, Ekramoddoullah AKM, Hunt R, Zainal A. 2006. Identification and characterization of RAPD markers linked to a major gene (Cr2) for resistant to *Cronartium ribicola* (Fish.) in *Pinus monticola* (D.Don.). *Phytopathology* 96:395-399.
- Liu LW, Zhao LP, Gong YQ, Wang MX, Chen LM, Yang JL, Wang Y, Yu FM, Wang LZ. 2008. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae.* 116(3): 240-247.
- Lu J, Hu X, Liu J, Wang H. 2011. Genetic diversity and population structure of 151 *Cymbidium sinense* cultivars. *Journal of Horticulture and Forestry* 3(4): 104-114.
- Micke A and B Donini. 1993. Induced mutation. Di dalam : Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I, ed. *Plant Breeding Principles and prospects.* Chapman & Hall. Hlm 52-77.
- Milad SI, Wahba LE, Barakat MN. 2011. Identification of RAPD and ISSR markers associated with flag leaf senescence under water stressed conditions in wheat (*Triticum aestivum L.*). *AJCS* 5(3):337-343.

- Mok MC. 1994. Cytokinin : chemistry, activity, and fuction. *In*. Mok M (ed) Cytokinin and plant development an overview. p.155-156. CRC. Boca raton.
- Muthusamy S, Kanagarajan S, Ponnusamy S. 2008. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. *Electronic Journal of Biotechnology* 11(3):1-10.
- Napoli CA, Beveridge CA, Snowden KC. 1999. Reevaluating concept of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth. *Curr. Top. Dev. Biol.* 44:127-169.
- Naumann CH, AG Underbrink, and AH Sparrow. 1975. Influence if radiation dose on somatic mutation indusion in *Tradescantia*. *Rad. Res.* 62:79-96
- Parab GV, Khrisnan S. 2008. Assessment of genetic variation among populations *Rynchostylis retusa*, an epiphitic orchid from Goa, India using ISSR and RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology* 7:313-319.
- Ramirez-Parra E, Desvoyes B, Gutierrez C. 2005. Balance between cell division and differentiation during plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49:467-477
- Romeida A, Hidayanti T. 2005. Multiplikasi planlet anggrek *Dendrobium* cv. *Thampomas* x cv. *Jaq*. Hawaii pada beberapa taraf konsentrasi BAP dan Arang Aktif secara *in vitro*. Laporan penelitian (tidak dipublikasi).
- Sá OJ, Pereira A, Baptista P. 2011. Optimization of DNA extraction for RAPD and ISSR analysis of *Arbutus unedo* L. Leaves. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 4156-4164.
- Sanjay LS, Mistry KN, Shah SD, Thaker R, Vaidya PB. 2011. Genetic diversity assessment in nine cultivars of *Catharanthus roseus* from Central Gujarat (India) through RAPD, ISSR and SSR markers. *Journal of research in Biology* 8: 667-675.
- Shaw RK, Acharya L, Mukherjee AK. 2009. Assessment of genetic diversity in a highly valuable medicinal plant *Catharanthus roseus* using molecular markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 9: 52-59.
- Shen J, Ding X, Liu D, Ding G, He J, Li X, Tang F, Chu B. 2006. Inter-simple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* KIMURA et MIGO. *Biol. Pharm. Bull.* 29(3):420-422 .
- Sim GE, Goh CJ, Loh CS. 2008. Induction of *in vitro* flowering in *Dendrobium Madame Thong-In* seedlings is associated with increase in endogenous N6-(Δ^2 -isopentenyl)-adenine (iP) dan N6-(Δ^2 -isopentenyl)-adenosine (iPA). *Plant Cell Rep* 27:1281-1289.
- Simmonds W. 1979. *Principles of Crop Improvement*. Longman, London. 408 p.
- Soltis ED, Soltis SP, Doyle JF. 1998. Contributions of PCR-Based Methods to Plant Systematics and Evolution Biology. *Molecular Systematics of Plants II DNA Sequencing*. Massachussets. Kluwer Academic Publishers.
- Sutjahjo SH, Rustikawati, and SI Aisyah. 2007. Perakitan kultivar unggul jagung toleran kemasaman: seleksi *in vitro* mutan iradiasi sinar gamma dan varian somaklon. Laporan penelitian. LPPM-IPB
- Tee CS, Maziah M, Tan CS. 2008. Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium* cv. *Sonia* 17. *Biologia Plantarum* 52(4):723-726.

- Trojanowska MR, Bolibok H. 2004. Characteristics and comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular and Mol. Biol. Letters* 9 : 221-238.
- Van Harten AM. 1998. *Mutation Breeding, Theory and Practical Application*. Press. Syndicate of the Univ. of Cambridge. UK. 353 p.
- _____. 2002. Mutation breeding of vegetatively propagated ornamentals. In A vainstein (*ed*). *Breeding for Ornamentals: classical and Molecular Approaches*. Kluwer Academic Press., Boston
- Waluyo R. 2001. Induksi mutasi krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) melalui iradiasi planlet. Skripsi Jurusan Budidaya Pertanian, Institut Pertanian Bogor. 38 hal. (tidak dipublikasikan).
- Wang HZ, Feng SG, Lu JJ, Shi NN, Liu JJ. 2009. Phylogenetic studi and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simpel sequent repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticultura* 122:440-447.
- Yam TW. 1994. Breeding with Paraphlaenopsis. *American Orchid Society Bulletin*. 63(12):1359-1365.
- Yasodha R, Kathirvel M, Sumathi R, Gurumurthi K, Archak S, Nagaraju J. 2004. Genetic analyses of Casuarinas using ISSR and FISSR markers. *Genetica* 122: 161-172.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* (20):176-183.