

OPTIMASI PROSES PCR PADA PLB TANAMAN ANGGREK ONCIDIUM HASIL PERLAKUAN PENETESAN MUTAGEN KIMIA COLCHICINE

Agus Zainudin¹

ABSTRACT

This research is aim to study the PCR optimization using primer of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) of *Oncidium sp.* PLB which have been treated with condensation of colchicine concentration 0%; 0,01%; 0,03%; 0,05%; 0,07% and 0,09%. Through process of PCR-RAPD DNA of *Oncidium* PLB that previously given treatment of drop of colchicine 0% until 0,09% have succeeded to be obtained the ribbons of DNA orchid genomic result of amplifikasi with primer 6 and reagen of Promega product. Nevertheless still needed further optimization to be obtained the ribbon pattern of DNA clearer.

Kata-kata kunci: PLB, *Oncidium*, PCR-RAPD

1. PENDAHULUAN

Selama ini pengembangan jenis-jenis tanaman anggrek di Indonesia banyak diusahakan melalui kegiatan persilangan. Padahal di negara-negara lain pengembangan jenis tanaman anggrek unggul tidak hanya melalui persilangan tetapi sudah menggunakan metode mutasi dan transgenik. Salah satu teknik mutasi yang dapat diterapkan pada tanaman adalah mutasi kimia menggunakan senyawa colchicine. Perlakuan mutasi dengan colchicine akan menyebabkan duplikasi kromosom yang diikuti oleh peningkatan ukuran sel dan jaringan tanaman termasuk perubahan bentuk dan warna.

Protocorm-like Bodies (PLB) dari hasil kultur meristem anggrek *Cymbidium* diploid yang telah diperlakukan dengan *colchicine* konsentrasi 0.01%, 0.05%, dan 0.1% selama satu, dua, dan tiga minggu menyebabkan penggandaan kromosom. Perlakuan *colchicine* 0.05% selama 7 hari menyebabkan sekitar 50% dari PLB mengalami kematian. Tingkat kematian yang tinggi dari PLB banyak ditemukan pada perlakuan konsentrasi *colchicine* 0.1%. Perlakuan yang paling efektif adalah konsentrasi *colchicine* 0.05% selama 7 hari. Perlakuan tersebut menghasilkan Tetraploids ($2n=4x=66\sim 80$) sebanyak 26.7% dan triploids 53.3%. Secara terpisah jangka waktu pemberian *colchicine* tidak berbeda nyata. Peningkatan ploidi dapat diketahui dengan adanya peningkatan ukuran stomata daun tanaman yang telah diperlakukan. Poliploidi yang dihasilkan juga dapat dideteksi melalui tingkatan DNA dengan *flow-*

cytometry. Hasil deteksi DNA tersebut sama dengan hitungan jumlah kromosom sel ujung akar. Poliploid pada plantlet anggrek yang ditumbuhkan secara *in-vitro* secara visual ditandai dengan perbedaan morfologi bentuk dan panjangnya daun dibandingkan dengan plantlet diploid (Mi-Seon Kim *et al.*, 2003).

Metode lain yang juga sering digunakan untuk membedakan ciri-ciri suatu individu secara molekuler adalah studi isozim, *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *random amplified polymorphism DNA* (RAPD), dan *simple sequence repeat* (SSR). Penerapan suatu metode harus diketahui terlebih dahulu optimasinya. Kemampuan membedakan genotip individu di dalam species maupun beberapa genotip secara tepat sangat diperlukan dalam program pemuliaan tanaman. Karakter morfologi dan fenotip telah banyak dipergunakan, namun sifat kuantitatif umumnya dikendalikan banyak gen dan sangat dipengaruhi lingkungan sehingga perbedaan antar species berkerabat dekat seringkali sulit diamati. Kebanyakan karakter sulit dianalisis karena tidak memiliki sistem pengendalian genetik yang sederhana. Penggunaan penanda molekuler seperti alozim, RFLP dan RAPD dapat dimanfaatkan untuk membantu mengatasi permasalahan tersebut. Pemakaian marka molekuler berdasarkan pola pita DNA telah banyak digunakan untuk menyusun kekerabatan beberapa individu dalam spesies maupun kekerabatan antar spesies. Penggunaan kekerabatan dapat dijadikan rujukan dalam pemuliaan persilangan untuk mendapatkan

¹ Agus Zainudin. Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Malang

keragaman yang tinggi dari hasil persilangan. Penggunaan marka DNA dapat membantu pelaksanaan pemilihan tetua persilangan yang memiliki perbedaan tinggi secara genetik (Correa, 1999). Perkembangan teknik PCR dalam bidang biologi molekuler terjadi dengan cepat setelah ditemukan teknik pelipat gandaan bagian genom tanaman pada beberapa lokus yang berbeda menggunakan primer arbitrari, yang dikenal dengan Random Amplified Polymorphic DNA (Welsh dan McClelland 1990). Pola pita DNA yang dihasilkan pada teknik RAPD sangat konsisten bagi kebanyakan primer dan teknik ini telah digunakan pada berbagai tanaman seperti padi, jagung, kopi serta pada tanaman anggrek (Orozco-Castillo *et al.* 1994 ; Hoon-Lim *et al.* 1999).

Salah satu keuntungan analisis keragaman menggunakan teknik molekuler yang memanfaatkan teknologi PCR adalah kuantitas DNA yang diperlukan hanya sedikit. Selain itu, dalam teknik RAPD tingkat kemurnian DNA yang dibutuhkan tidak perlu terlalu tinggi, atau dengan kata lain teknik ini toleran terhadap tingkat kemurnian DNA yang beragam. Walaupun demikian, dalam metode PCR tersebut tetap dibutuhkan prosedur untuk meminimalkan senyawa-senyawa kontaminan yang dapat mengganggu reaksi PCR seperti polisakarida dan metabolit sekunder. Dalam penelitian ini, DNA tanaman anggrek diisolasi dari PLB anggrek *Oncidium* yang telah dimutasikan dengan memberikan perlakuan berbagai konsentrasi *colchicine*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji optimasi PCR menggunakan penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) dari PLB anggrek *Oncidium sp.* yang telah diperlakukan dengan larutan *colchicine* konsentrasi 0,01%; 0,03%; 0,05%; 0,07% dan 0,09%.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Molekuler Tanaman Pusat Pengembangan Bioteknologi, Universitas Muhammadiyah Malang.

a. Persiapan dan Sterilisasi Alat

Semua peralatan gelas dan logam yang akan digunakan harus dicuci hingga bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus kertas atau ditutup dengan aluminium foil. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoclaf pada temperature lebih kurang 120°C dan tekanan 1 atmosfer selama 25 menit.

b. Pembuatan Media Kultur

Media kultur jaringan yang dipergunakan adalah media Vacin and Went modifikasi Lim. Keseluruhan bahan di atas dimasukkan ke dalam botol Duran kemudian ditambahkan air hingga mencapai volume 1 liter. Pengaturan pH media dilaksanakan dengan menggunakan pH meter dengan kriteria pH yang dipergunakan disesuaikan dengan masing masing jenis tanaman anggrek. Media dipanaskan dan diaduk hingga keseluruhan agar larut sempurna dan jika larutan sudah mendidih pemanasan dihentikan. Media dituang dalam botol kultur (dengan volume 10 ml/botol). Botol kultur yang telah berisi media disterilkan menggunakan autoclaf dengan tekanan 16 psi selama 25 menit

c. Persiapan dan Sterilisasi Larutan *Colchicine*

Serbuk/kristal *colchicine* ditimbang seberat masing-masing 0,1 g (100 mg); 0,3 g (300 mg); 0,5 g (500 mg); 0,7 g (700 mg); 0,9 g (900 mg) untuk masing-masing perlakuan, kemudian ditambah alkohol 90% sebanyak 10 tetes sampai larut dan ditambah aquades sampai 1 liter. Sterilisasi masing-masing larutan *colchicine* sesuai takaran konsentrasi dilaksanakan dengan menggunakan syringe yang dilengkapi dengan kertas penyaring steril berukuran 0,02 mikro. Larutan *colchicine* steril dimasukkan secara terpisah ke dalam botol steril sebagai stok. Botol yang berisi larutan stok ditutup aluminium foil agar tidak terkena cahaya. Pekerjaan tersebut dilaksanakan di dalam *laminar air flow cabinet*.

d. Pengadaan dan Penanaman Bibit Anggrek

Bibit anggrek *Oncidium* diperoleh dari hasil kultur embrio yang telah mencapai fase PLB. Bibit anggrek dalam botol yang sudah tersedia diseleksi untuk ditanam (disub-kultur) lagi pada media VW dalam botol kultur yang telah disiapkan. Proses pemindahan dan penanaman bibit anggrek dilakukan pada kondisi steril di dalam *laminar air flow cabinet*. Bibit yang telah di sub kultur tersebut selanjutnya diadaptasikan selama 14 hari pada tempat pemeliharaan yang bertemperatur 20°C dengan pencahayaan lampu neon..

e. Perlakuan Mutasi dengan *Colchicine*

Pemberian *colchicine* pada bibit anggrek dilaksanakan dalam kondisi steril di dalam *laminar air flow cabinet*. Karena itu, sebelum perlakuan bibit anggrek *Oncidium* dalam botol dan larutan *colchicine*

dimasukkan ke dalam enkas atau *laminat air flow cabinet*. Tutup botol anggrek dibuka di dekat nyala api bunsen, selanjutnya pada tiap titik tumbuh bibit anggrek segera ditetesi larutan *colchicine* dengan menggunakan pipet eppendorf yang dilengkapi tips steril berukuran 50 mikro. Konsentrasi larutan yang diberikan terdiri dari 0,01%; 0,03%; 0,05%; 0,07%; 0,09%; dengan volume penetesan 20 µl. Setelah titik tumbuh bibit anggrek dalam botol ditetesi larutan *colchicine*, botol segera ditutup dan dibungkus dengan aluminium *foil*. Semua botol diletakkan pada tempat yang gelap dan ber-AC selama 5 hari. Botol dikeluarkan dari tempat yang gelap dan pembungkus aluminium *foil* dibuka setelah 5 hari. Bibit anggrek dalam botol yang telah diperlakukan dengan larutan dikembalikan lagi ke rak tempat pemeliharaan yang bertemperatur 20°C dengan pencahayaan lampu neon.

f. Pemeliharaan Bibit

Bibit anggrek yang telah diperlakukan dengan *colchicine* dipelihara sampai berumur 1 bulan, kemudian bibit diambil dari dalam botol dan dibersihkan dengan air kemudian disimpan dalam almari pendingin untuk selanjutnya digunakan pada kegiatan isolasi DNA genom tanaman.

g. Isolasi DNA Genom Tanaman Anggrek

DNA genom tanaman anggrek diisolasi dari PLB anggrek *Oncidium* yang telah dimutasikan dengan menggunakan *colchicine* yang telah dipersiapkan sebelumnya. Prosedur ekstraksi DNA dari PLB tanaman anggrek dilaksanakan berdasarkan metode Zheng *et al* (1995). Sebelum berlangsungnya proses isolasi, dilakukan pembuatan bufer pengeksrak yang terdiri atas EDTA (pH 7,5) 25mM, TrisHCl (pH 8) 50 mM, NaCl 300mM, SDS 1% dan H₂O. Potongan PLB anggrek dimasukkan tabung 1,5 ml yang telah didinginkan dalam es, kemudian digerus menambahkan 400 ul buffer pengeksrak. Setelah cukup halus ditambahkan 100 ul buffer pengeksrak. Setelah itu diambil 400 ul larutan dan ditambah dengan 400 ul chloroform. Suspensi divortex sampai tercampur merata, kemudian dan setelah homogen larutan disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4°C. Lapisan atas diambil dan dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml, kemudian ditambahkan 800 µl Etanol absolut. Larutan disentrifugasi selama 3 menit, 13.000 rpm, pada suhu 4°C, kemudian supernatan dibuang. Pelet dicuci menggunakan 500 µl EtOH 70 %. Supernatan dibuang, kemudian endapan dicuci kembali dengan etanol 70%, dan disentrifugasi 13.000 rpm, pada suhu

4°C. Supernatan dibuang kembali, dan pelet dikeringkan dengan menggunakan vajuam. Setelah kering, pelet ditambah dengan 50 ul TE dan DNA disimpan pada suhu -20°C.

Setelah DNA hasil isolasi dimurnikan, kemudian dihitung konsentrasinya. Selanjutnya DNA disiapkan untuk dipergunakan sebagai cetakan (*template*) dalam reaksi *Polimerase Chain Reaction*.

h. Proses Polimerase Chain Reaction (PCR) DNA genom anggrek *Oncidium* dengan menggunakan primer RAPD.

Pada reaksi PCR, DNA anggrek digunakan sebagai cetakan. Beberapa jenis primer yang akan digunakan dalam reaksi PCR ini diuji dahulu, sehingga didapatkan primer yang tepat. Volume total reaksi PCR yang dipergunakan adalah sebanyak 25 µl, terdiri dari campuran larutan yang terdiri dari DNA *taq* polimerase dan 10X buffer *Taq* Polimerase; dNTP'S mix (dGTP, dATP, dTTP dan dCTP), dH₂O dan 30 ng DNA *template*.

Kondisi suhu untuk reaksi PCR DNA genom anggrek dirancang dengan suhu denaturasi 95°C, *annealing* 36°C, perpanjangan 72°C dan pasca PCR 4°C. Untuk perbanyakkan, siklus reaksi PCR diulang sebanyak 45 kali. Hasil amplifikasi PCR kemudian dielektroforesis pada 1,2 % gel agarosa dengan voltase 75 V selama 1 jam, deteksi dilakukan dengan UV transluminator dan dilakukan pemotretan *gell*.

i. Deteksi Polimorfisme Sidik Jari DNA Anggrek Mutan

Analisis sidik jari DNA dilaksanakan berdasarkan jumlah, frekuensi dan distribusi alel-alel DNA. Fragmen dideteksi dari pola pita DNA yang berbeda hasil elektroforesis gel agarose dari produk PCR. Data profil DNA merupakan data alel yang teramati dengan ketentuan ada dan tidaknya pita DNA berdasarkan ukuran produk PCR pada satu posisi yang sama dari beberapa individu / sampel yang dibandingkan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

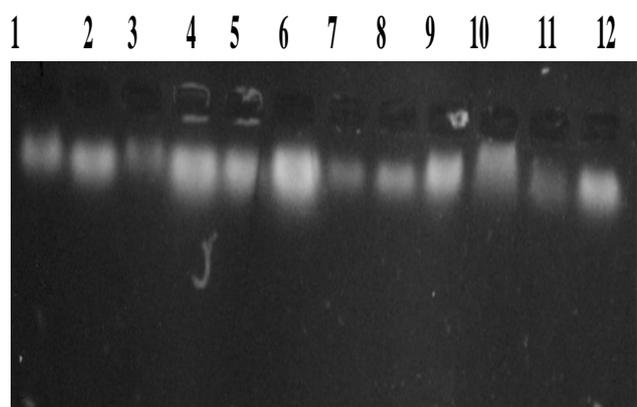
Hasil isolasi DNA anggrek pada tahap awal dilakukan dengan menggunakan prosedur ekstraksi DNA yang menggunakan bufer pengeksrak SDS. Komposisi bufer pengeksrak yang digunakan dalam proses isolasi tersebut adalah EDTA (pH 7,5) 25mM, TrisHCl (pH 8) 50 mM, NaCl 300mM, SDS 1%

dan H₂O. Melalui penerapan teknik tersebut telah berhasil diperoleh DNA tanaman anggrek namun dengan kualitas DNA yang kurang baik (Gambar 1).

Upaya untuk mendapatkan DNA dengan kualitas yang lebih baik dilakukan melalui kegiatan isolasi DNA kembali dengan menggunakan bufer pengestrak yang sama. Hasil isolasi tersebut seperti ditunjukkan Gambar 2. Dari proses isolasi tersebut telah berhasil diperoleh DNA tanaman anggrek *Oncidium* mutan dari perlakuan berbagai konsentrasi *colchicine* dengan kualitas DNA yang cukup baik.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Gambar 1. Hasil proses isolasi DNA dengan menggunakan bufer SDS pada tanaman anggrek mutan dengan berbagai konsentrasi *colchicine*: 0,01% (baris 1 & 2); 0,03% (baris 3 & 4); 0,05% (baris 5 & 6); 0,07% (baris 7 & 8); 0,09% (baris 9 & 10).



Gambar 2. Hasil proses isolasi DNA dengan menggunakan bufer SDS pada tanaman anggrek mutan dengan berbagai konsentrasi *colchicine* : C1 (baris 1 ; 2), C2 (baris 3 ; 4), C3 (baris 5 ; 6), C4 (baris 7 ; 8), C5 (baris 9 ; 10) dan C6 (baris 11 ; 12).

Analisis molekuler merupakan analisis yang dilakukan pada tingkat gen maupun ekspresinya yang bertujuan untuk mengkonfirmasi keberadaan gen melalui metode molekuler seperti PCR (Arheim dan Erlich 1992). Penggunaan RAPD selalu memperlihatkan keragaman lebih tinggi daripada alozim dan RFLP, sehingga sangat mendukung upaya analisis keragaman genetik terutama jika latar belakang genomnya belum diketahui. Teknik PCR memiliki kelebihan diantaranya sangat praktis, akan tetapi dapat terjadi positif semu jika reaksi yang dipergunakan mengandung kontaminan. Analisis PCR perlu menggunakan beberapa kontrol untuk menghindari terjadinya positif maupun negatif semu.

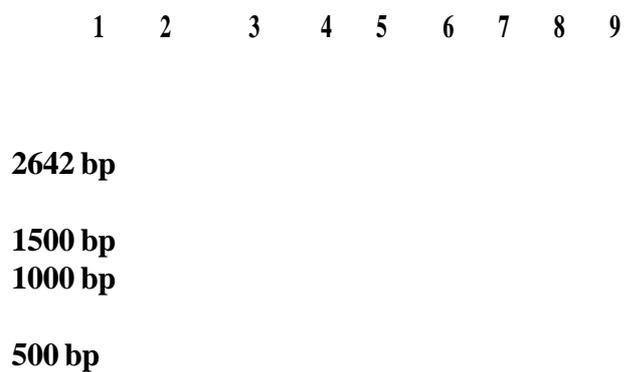
Analisis PCR untuk tanaman anggrek mutan dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan beberapa jenis primer RAPD 10 basa untuk mendapatkan jenis primer yang tepat. Dalam analisis keragaman menggunakan RAPD, tingkat konsistensi pemunculan suatu karakter pada kondisi PCR tertentu merupakan hal yang sangat penting sehingga kondisi reaksi optimum untuk setiap jenis organisme kemungkinan berbeda dan harus ditentukan dahulu. Oleh karena itu, selain diuji cobakan beberapa primer juga dicoba berbagai pemakaian suhu PCR.

Hasil optimasi PCR-RAPD DNA dari PLB anggrek *Oncidium* dengan menggunakan suhu annealing 40-42 °C tidak berhasil diperoleh pita-pita DNA. Dalam proses selanjutnya dicobakan penggunaan temperatur annealing yang lebih rendah. Kondisi suhu reaksi PCR yang terdiri atas suhu denaturasi 95°C, annealing 36°C, perpanjangan 72°C dan pasca PCR 4°C dengan siklus reaksi PCR diulang sebanyak 45 kali berhasil diperoleh pita-pita DNA genomik anggrek hasil amplifikasi dengan primer 6 dan reagen dari produk Promega (Gambar 3).

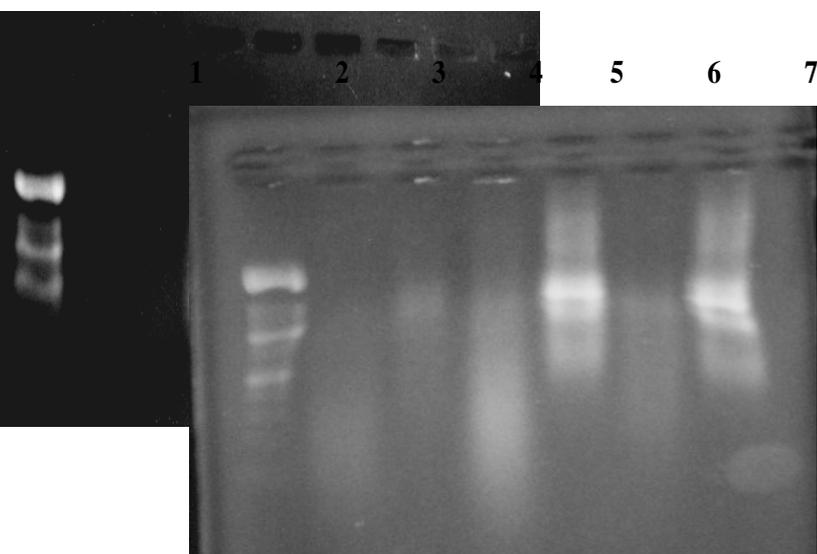
Gambar 3 menunjukkan bahwa pemakaian reagen produksi Promega dengan pemakaian primer 6 dari perlakuan C2 dan C3 dihasilkan 3 pita DNA dengan ukuran pita pertama antara 1500-2642 bp, pita kedua antara 1000 – 1500 bp, dan pita ketiga dengan ukuran antara 500-1000 bp. Pita-pita DNA tersebut belum tampak dengan tegas sehingga masih diperlukan optimasi untuk mendapatkan hasil yang lebih baik

Optimasi PCR-RAPD DNA dengan kondisi yang sama pada PLB anggrek *Oncidium* yang sebelumnya diberi perlakuan penetasan larutan *colchicine* konsentrasi 0,01%; 0,03%; 0,05%; 0,07%; dan 0,09% diperoleh hasil sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 4. Meskipun belum diperoleh pola pita yang jelas tetapi dapat diketahui

bahwa terdapat perbedaan pola pita antara PLB kontrol dan hasil perlakuan *colchicine* maupun antar perlakuan konsentrasi *colchicine*.



Gambar 3. Hasil PCR-RAPD DNA PLB Anggrek Mutan: Penanda 100 bp Ladder (baris 1), fastrart + C2 + primer 2 (baris 2), fastrart + C2 + primer 6 (baris 3), promega + C2 + primer 2 (baris 4), promega + C2 + primer 6 (baris 5), fastrart + C3 + primer 2 (baris 6), fastrart + C3 + primer 6 (baris 7), promega +



Gambar 4. Hasil PCR-RAPD DNA PLB Anggrek Mutan dengan menggunakan Primer 6 : Penanda 100 bp Ladder (baris 1); Kontrol (baris 2); *Colchicine* 0,01% (baris 3); 0,03% (baris 4); 0,05% (baris 5); 0,07% (baris 6); 0,09% (baris 7)

Belum jelasnya pola pita hasil PCR-RAPD DNA PLB Anggrek mutan tersebut menunjukkan bahwa masih diperlukannya suatu prosedur isolasi DNA untuk meminimalkan senyawa-senyawa kontaminan yang dapat mengganggu reaksi PCR seperti polisakarida dan metabolit sekunder. Keberadaan polisakarida dan metabolit sekunder dalam sel tanaman sering menyulitkan dalam isolasi asam nukleat (Wilkins and Smarts, 1996).

Struktur polisakarida yang mirip dengan asam nukleat akan menyebabkan polisakarida tersebut akan mengendap bersama dengan asam nukleat. Penambahan senyawa pereduksi seperti marchaptoetanol dan dithiothreitol dapat mencegah proses oksidasi senyawa fenolik sehingga menghambat aktivitas radikal bebas yang dihasilkan oleh oksidasi fenol terhadap asam nukleat (Wilkins dan Smart, 1996). Metabolit sekunder da polisakarida juga dapat menghambat kerja enzim Adanya polisakarida dalam tanaman ditandai dengan kekentalan pada hasil isolasi DNA yang menyebabkan kesulitan dalam reaksi PCR akibat penghambatan aktivitas Taq polymerase (Fang *et al.*, 1992 cit Porebski *et al.*, 1997).

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Melalui proses PCR-RAPD DNA dari PLB anggrek *Oncidium* yang sebelumnya diberi perlakuan penetesan *colchicine* 0% sampai 0,09% telah berhasil diperoleh pita-pita DNA genomik anggrek tersebut hasil amplifikasi dengan primer 6 dan reagen dari produk Promega. Meskipun demikian masih diperlukan optimasi lebih lanjut agar diperoleh pola pita DNA yang lebih jelas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Pimpinan Universitas Muhammadiyah Malang atas penyediaan dana untuk penelitian ini,
2. Kepala dan staf Pusbang Biotek UMM atas penyediaan sarana dan prasarana laboratorium,
3. Dr.Ir. Maftuchah, MP. dan Pipit Front S, SP. atas bantuannya menyiapkan materi dan analisis di laboratrorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Anthony J.F., Griffiths, Jeffrey H. Miller, David T. Suzuki, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart, 2000, An Introduction to Genetic Analysis, W.H. Freeman and Company, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowSection&rid=iga.section.3058>
- Arifin, 1994, Anggrek Dendrobium, Penebar Swadaya Jakarta.
- Arnheim N and Erlich H. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem* 61:131-156.
- Brown, A.H.D., dan Young, A.G., 2000, Genetic Diversity In Tetraploid Populations Of The Endangered Daisy *Rutidosis Leptorrhynchoides* And Implications For Its Conservation, *Journal Heredity*, August Edition 2000, Vol. 85, No. 2, Pages 122-129, <http://www.nature.com/hdy/journal/v85/n2/full/6887420a.html>
- Chase, M. W., 1987, Systematic Implications of Pollinarium Morphology in *Oncidium Sw.*, *Odontoglossum Kunth*, and Allied Genera (Orchidaceae), *Journal Lindleyana* 2: 8–28.
- Correa, R. X., Ricardo V. A., Fabio G. F. Cosme D. C., Maurilio A. M., dan Everaldo G. B., 1999. *Genetic Distance in Soybean Based on RAPD Markers*. (On line), <http://www.scielo.br/scielo.php> diakses 22 April 2004.
- Garay, L. A. and J. E. Stacy, 1974, A Revision of *Oncidium*, *Journal Bradea* 1: 393–428.
- Gunawan. 1999. Budidaya Anggrek. Penebar Swadaya. Jakarta
- Hendaryono, D. P. S., 2000. Pembibitan Anggrek Dalam Botol. Kanisius. Yogyakarta
- Hoon-Lim S, Peng Teng PC, Lee YH, and Goh CJ. 1999. RAPD analysis of some species in the genus *vanda* (orchidaceae). *Annals of Botany*. 83:193-196.
- Indah dan Fiyanti. 1991. Anggrek Dendrobium. Penebar Swadaya. Jakarta
- Meyer A, Zondag GB and Hengens LAM. 1991. A simple screening method for transgenic rice tissue based on PCR. *J. Rice Genetic. Newsl.* 8:161-165.
- Mi-Seon Kim, Jae-Yeong, Kim, Jong-Seon Eun, 2003, Chromosome Doubling of a Cymbidium Hybrid with *Colchicine* Treatment in Meristem Culture, National Horticultural Research Institute, R. D. A., Suwon 440-310, Korea Dept. of Horticultural Science, Chonbuk National Univ., Chonju 560-756, Korea <http://www.biolo.aichi-edu.ac.jp/NIOC2003poster/10KoreaCym.pdf>
- Ojiewo, C.O.; Agong, S. G.; Murakami K. dan Masuda, M., 2006, Chromosome Duplication And Ploidy Level Determination In African Nightshade *Solanum villosum* Miller, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Januari, Vol. 81 No:2 pp:183-188, http://www.jhortsci.com/show_abs.php?newid=991
- Orozco-Castillo C, Chalmers KJ, Waugh R, and Powell W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee sing RAPD markers. *Theor Appl Genet* 87:934-940.
- Osman dan Prasasti. 1991. Anggrek Dendrobium. Penebar Swadaya. Jakarta
- Rudhy, A. 2003. About Orchid. Dari <http://www.theos.org/orchids/culture.pdf>
- Sauleda, R. P. and R. M. Adams. 1989. The Orchid Genera *Oncidium Sw.* and *Tolumnia Raf.* in Florida. *Rhodora* 91: 188–200.
- Shigeki Nagatomo, Yukio Sudo, Masaki Shimabukuro, 2002, The Cultivation of New Chrysanthemum Varieties Using Ion Beam and Plant regeneration techniques, The Japan Atomic Energy Research Institute (JAERI), <http://www.jaeri.go.jp/english/press/2002/021112/>
- Sugeng, S.L. 1985. Mengenal dan Bertanam Anggrek. Aneka Ilmu. Semarang
- Wang Jing, Liu Luxiang, Zhao Shirong, 2002, Induced Mutations for Improvement of Fruit Trees and Ornamental Plants in China, http://www.fnca.jp/english/e_old/2_totuzenheni/3/2002ws/04/01china/main.html
- Welsh J and McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- Widiastoety, D. 2003. Menghasilkan Anggrek Silangan. Penebar Swadaya. Jakarta

Wikipedia, 2005, Oncidium Description, <http://en.wikipedia.org/wiki/Oncidium>, diakses pada 30 Januari 2005.

Zheng K, Huang N, Bennet P. and Khush GS. 1995. PCR-based marker assisted selection in rice breeding. IRRI news lett 2.