

## OPTIMASI SUHU ANNEALING UNTUK PRIMER g-SSR DAN EST-SSR PADA KACANG HIJAU (*Vigna radiata* L.)

### Optimization of Annealing Temperature for Primary g-Ssr And Est-Ssr in Mungbean (*Vigna radiata* L.)

Herman, Lambok Nia Natalya T., Suha Maudina Berampu, Dewi Indriyani Roslim

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Riau, Kampus Bina Widya Km 12,5 Simpang Baru-Pekanbaru-Riau 28293  
Email: hermansyahdan@gmail.com dan dewiindriyaniroslim@gmail.com  
[Diterima: Januari 2017; Disetujui: Februari 2017]

#### ABSTRACT

Mungbean (*Vigna radiata* L.) is one of important legume in Indonesia. G-SSR and EST-SSR markers had been widely used in mungbean genetic diversity research. DNA isolation and DNA amplification are required to obtain genetic information about mungbean to obtain accurate data on the genetic diversity of mungbean. This study aims to determine the Temperature of annealing (Ta) of the g-SSR and EST-SSR primer pairs. The total DNA was isolated from young leaves mungbean origin Pelalawan and the eight primer pairs of the g-SSR and EST-SSR were optimized. The optimal Ta for G2436, G3598, G2516, G7472, G0483, G1671, G3302, and G3427 were 50,55°C, 51,15°C, 51,25°C, 51,2°C, 51,6°C, 49,0°C, 49,8°C, and 52,8°C respectively. Meanwhile, the optimal Ta for E51985, E19823, E24080, E22860, E26637, E16266, E11659, and E10675 were 52,2°C, 54,4°C, 52,5°C, 51,25°C, 53,25°C, 54°C, 54,35°C, and 53,6°C respectively.

**Keywords:** EST-SSR, g-SSR, Genetic diversity, Mungbean, Temperature of annealing

#### ABSTRAK

Kacang hijau (*Vigna radiata* L.) merupakan salah satu tanaman kacang-kacangan yang cukup penting di Indonesia. Penanda g-SSR dan EST-SSR telah banyak digunakan dalam penelitian keanekaragaman genetik kacang hijau. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan suhu *annealing* dari primer g-SSR dan EST-SSR pada kacang hijau asal Pelalawan. DNA total diisolasi dari daun muda kacang hijau asal Pelalawan dengan metode CTAB. Optimasi suhu *annealing* dilakukan pada 8 pasang primer g-SSR dan 8 pasang primer EST-SSR. DNA total yang diisolasi terlihat utuh dan tebal. Suhu *annealing* yang optimal pada primer G2436, G3598, G2516, G7472, G0483, G1671, G3302, dan G3427 adalah 50,55°C, 51,15°C, 51,25°C, 51,2°C, 51,6°C, 49,0°C, 49,8°C, dan 52,8°C secara berturut-turut. Suhu *annealing* yang optimal untuk primer E51985, E19823, E24080, E22860, E26637, E16266, E11659, dan E10675 adalah 52,2°C, 54,4°C, 52,5°C, 51,25°C, 53,25°C, 54°C, 54,35°C, dan 53,6°C secara berturut-turut.

**Kata kunci:** EST-SSR, g-SSR, Kacang hijau, Keanekaragaman genetik, Suhu *annealing*

#### PENDAHULUAN

Penanda SSR telah banyak digunakan dalam berbagai spesies tanaman sebagai alat molekuler untuk mendeteksi keanekaragaman genetik (Somta *et al.* 2008). Terdapat dua tipe penanda SSR, yaitu *Simple Sequence Repeat* (SSR) yang terdistribusi di daerah bukan penyandi yang disebut *genomic* SSR, sedangkan SSR yang terdistribusi di daerah yang ditranskripsikan disebut *genic* SSR atau

*Expressed Sequence Tag* (EST)-SSR (Toth *et al.* 2000).

Teknik molekuler yang dapat digunakan untuk mengetahui keanekaragaman genotipe suatu tanaman adalah dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR merupakan teknik untuk mengamplifikasi sekuen DNA secara *in vitro*. Penggunaan teknik PCR telah diperluas dalam penelitian molekuler sebab, kemampuan untuk mengamplifikasi daerah target pada DNA cetakan membutuhkan waktu yang relatif singkat. Pengulangannya berkisar antara 30-50

siklus replikasi yang melipat gandakan molekul DNA target pada setiap siklusnya (Innis *et al.* 1990).

Optimasi suhu dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal, sehingga dihasilkan produk PCR. PCR dimulai dengan proses denaturasi yaitu pemisahan dua utas DNA yang saling bergabung (*double helix*) menjadi utas tunggal DNA dengan menggunakan suhu tinggi. Setelah proses denaturasi kemudian dilanjutkan dengan proses *annealing*, yaitu penempelan primer pada DNA cetakan. Setelah proses *annealing*, dilanjutkan dengan proses *extension* yaitu perpanjangan primer atau sintesis DNA (Wahyudi 2007).

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi adalah suhu *annealing*. Jika suhu *annealing* terlalu tinggi maka dapat menyebabkan gagalnya amplifikasi karena tidak terjadi penempelan primer dan jika suhu terlalu rendah maka dapat menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom akibatnya DNA yang terbentuk memiliki spesifisitas rendah. Oleh karena itu sangat penting untuk mencari suhu *annealing* yang optimum (Rybicky 2001).

Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk optimasi suhu *annealing* adalah dengan menggunakan suhu *annealing* yang berkisar hingga 5°C lebih rendah dari  $T_m$  (*Temperature of melting*) pasangan primer (Innis dan Gelfand 1990). Proses *annealing* memerlukan waktu yang singkat berkisar antara 30 detik atau kurang dari 30 detik jika  $T_a$  (*Temperature of annealing*) dekat dengan  $T_m$  atau kecuali primer tidak terlalu panjang seperti umumnya (Rybicky 2001). Optimasi PCR pada penelitian ini bertujuan untuk menentukan suhu *annealing* dari primer g-SSR dan EST-SSR.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2016 hingga bulan Desember 2016. Penanaman sampel kacang hijau telah dilaksanakan di kebun Jurusan Biologi. Isolasi DNA, elektroforesis dan PCR dilaksanakan di Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: *aluminium foil*, erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, *glove*, *hot plate*, kamera (*Olympus SP-500 UZ*), kertas parafilm, kulkas/*freezer*, masker, mesin elektroforesis (*Fison Mode FEC 360, Large Horizontal Gel*

*System*), mesin sentrifus, mesin *spindown*, mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*), mikropipet berukuran 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, dan 1000  $\mu$ l, pinset, rak tabung mikro, spatula, sisir dan cetakan gel *agarose*, tabung 1,5 ml, tabung 0,2 ml, tip mikro, UV transiluminator (*Wiseuv WUV-M20, Daihan Scientific*), dan *waterbath*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: daun muda kacang hijau berumur lima minggu yang berasal dari Kabupaten Pelalawan (Herman *et al.* 2015), *agarose*, akuabidestilasi ( $dH_2O$ ), akuades, *buffer* CTAB ( $dH_2O$  ; 1 M Tris-HCl pH 9 ; 5 M NaCl ; 0,5 M EDTA ; 14 M  $\beta$ -mercaptoetanol ; 2% CTAB), *buffer* TE (pH 8), 70% etanol, etidium bromida, fenol, isopropanol, kloroform, *loading dye* 6X, Mix PCR (10 X *buffer* PCR; 2 mM dNTPs; 10  $\mu$ M Primer R; 10  $\mu$ M Primer F; 5 unit/ $\mu$ l *Taq* DNA *Polymerase*;  $dH_2O$ ; 100 ng/ $\mu$ l DNA), dan 1X *buffer* TBE (Tris ; Boric acid ; EDTA).

**Isolasi DNA total** dilakukan setelah tanaman kacang hijau berumur lima minggu atau setelah tanaman menghasilkan minimal 5 helai daun. Isolasi DNA total dilakukan menggunakan metode CTAB (Saghai-Marooof *et al.* 1984) dengan sedikit modifikasi, yaitu dengan cara sampel yang diinkubasi dalam *waterbath* disentrifus terlebih dahulu kemudian ditambahkan kloroform.

**Elektroforesis DNA total** dilakukan pada 1,2% gel *agarose* dalam 1X *buffer* TBE (Tris-Boric acid-EDTA pH 8,0) yang mengandung 5  $\mu$ g/ml etidium bromida, setelah itu di-*running* pada mesin elektroforesis dengan tegangan 190 volt selama  $\pm$  20 menit, kemudian divisualisasikan di atas lampu UV *transiluminator* dan difoto menggunakan kamera berfilter merek *Olympus SP-500 UZ*.

**Optimasi suhu *annealing* pada primer g-SSR dan EST-SSR** pada 8 pasang primer dilakukan pada berbagai suhu *annealing* (Tabel 1 dan Tabel 2).

Total volume PCR yang digunakan adalah 25  $\mu$ l. Proses PCR diawali dengan tahapan Pra-PCR pada suhu 94°C selama 3 menit dan dilanjutkan sebanyak 35 siklus. Masing-masing siklus terdiri dari tiga tahap, yaitu: denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* disesuaikan dengan masing-masing primer (Tabel 3 dan Tabel 4) selama 45 detik, *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik. Proses PCR diakhiri dengan Pasca PCR pada suhu 72°C selama 10 menit. Optimasi suhu *annealing* dilakukan pada dua suhu, yaitu rata-rata  $T_m$  - 5°C dan -3°C (Tabel 3 dan Tabel 4).

**Elektroforesis produk PCR** dilakukan pada 2,5% gel *agarose* dalam 1X *buffer* TBE (Tris-Boric acid-EDTA pH 8,0) yang mengandung 5 µg/ml etidium bromida, setelah itu di-*running* pada mesin elektroforesis dengan

tegangan 70 volt selama ± 40 menit, kemudian divisualisasikan di atas lampu *UV transiluminator* dan difoto menggunakan kamera berfilter merek *Olympus SP-500 UZ*.

Tabel 1. Delapan pasang primer g-SSR yang digunakan (Chen *et al.* 2015)

Pasangan Primer	5'-----3'
G2436_F/ G2436_R	F: GACCATTGGTTCAACGAGAAA R: CCTCAGTCTGGTACCGTAACTACTTC
G3598_F/ G3598_R	F: GAGCCATGGGTATGTATAGATTTTT R: CCTCTCCCTCTTTTTTCAGCC
G2516_F/ G2516_R	F: GCTTCCACTTTATAACATATTACGCA R: TATGCTTGCAAGAGTGTGGG
G1671_F/ G1671_R	F: CCAGATCAAGAACCTACCACAA R: GGGACATTAGAGATTCCCCA
G3302_F/ G3302_R	F: AAAACTTGTCCAGACCACGG R: CCCTTTTGTGTGGCACTT
G3427_F/ G3427_R	F: GCTTCTGCACAACCCTCTTC R: CCCTACATTCAGCAACCGT
G7472_F/ G7472_R	F: GCGAGCGGAATCAGAATAAC R: CGTAACCGTAACCTTACCTACTTC
G0483_F/ G0483_R	F: TGTAGAAAAGCAAAAACCAACAAA R: AGGTAGATGACATGCTCGCC

Keterangan: F= primer *forward*, R= primer *reverse*

Tabel 2. Delapan pasang primer EST-SSR yang digunakan (Chen *et al.* 2015)

Pasangan Primer	5'-----3'
E22860_F/ E22860_R	F: AGCATGGTATAAGAATGAGAGGGT R: TTTCTTCAAGCTGGGGTGCT
E26637_F/ E26637_R	F: AAGCGTGGAAGTGGAGTGAG R: ACCGACTTAACGTTATTGAAAAGAGG
E24080_F/ E24080_R	F: GCTCCCATTACCATCCCAA R: TCCGGTTCCTTCCCACAATG
E51985_F/ E51985_R	F: GCGATCGAGTCACTCTACGG R: TCATCCGCCACAACCTCTTC
E19823_F/ E19823_R	F: ACAACAAGGATCACCGTCCC R: TCAGTCTCTCCAGCTCCGAA
E16266_F/ E16266_R	F: AGAACCATGCCACGTGACAT R: GTCCAACCACGCAAACCTCAC
E11659_F/ E11659_R	F: ACGCTCGAAATATCACCCCC R: GGGTCTCGAGTTTGTGAGGG
E10675_F/ E10675_R	F: GCAGAAGGAAGCTCAAGATCG R: GCTTCCCACAACCTCCAGAA

Keterangan: F= primer *forward*, R= primer *reverse*

Tabel 3. Kombinasi pasangan primer g-SSR dan suhu *annealing*

Pasangan Primer	Rata-rata Tm (°C)	Ta (°C)	
		Tm -5	Tm -3
G2436_F/ G2436_R	55,95	50,55	52,55
G3598_F/ G3598_R	54,15	49,15	51,15
G2516_F/ G2516_R	54,25	49,25	51,25
G1671_F/ G1671_R	54,0	49,0	51,0
G3302_F/ G3302_R	54,8	49,8	51,8
G3427_F/ G3427_R	55,8	50,8	52,8
G7472_F/ G7472_R	54,2	49,2	51,2
G0483_F/ G0483_R	54,6	49,6	51,6

Keterangan: F = primer *forward*, R = primer *reverse*, Tm = *Temperature of melting*, Ta = *Temperature of annealing*

Tabel 4. Kombinasi pasangan primer EST-SSR dan suhu *annealing*

Pasangan Primer	Rata-rata T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>a</sub> (°C)	
		T <sub>m</sub> -5	T <sub>m</sub> -3
E22860_F / E22860_R	56,25	51,25	53,25
E26637_F / E26637_R	56,25	51,25	53,25
E24080_F / E24080_R	57,5	52,5	54,5
E51985_F / E51985_R	57,2	52,2	54,2
E19823_F / E19823_R	57,4	52,4	54,4
E16266_F / E16266_R	57,0	52,0	54,0
E11659_F / E11659_R	57,35	52,35	54,35
E10675_F / E10675_R	56,6	51,6	53,6

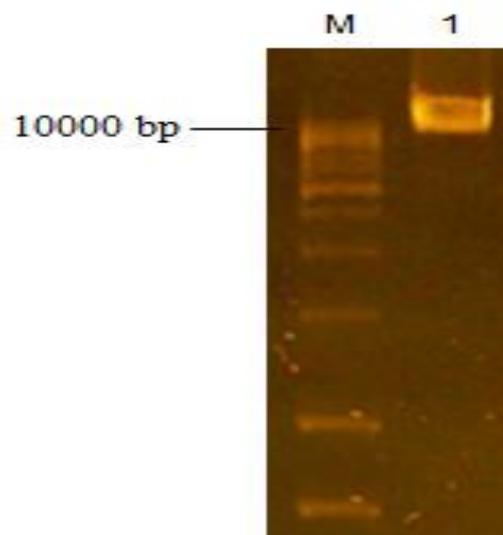
Keterangan: F= primer *forward*, R= primer *reverse*, T<sub>m</sub>= *Temperature of melting*, T<sub>a</sub>= *Temperature of annealing*

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Molekul DNA Total Kacang Hijau

Molekul DNA total yang diperoleh dari isolasi menggunakan metode CTAB (Saghai-Marooif *et al.* 1984) memiliki pita DNA yang baik dan bagus, yaitu pita yang terlihat jelas, terang dan utuh atau tidak *smear* (Gambar 1).

Menurut Indriyani (2017), ketebalan suatu pita DNA berbanding lurus dengan konsentrasi DNA, semakin tebal pita DNA yang diperoleh maka semakin tinggi pula konsentrasi DNA. Ukuran pita DNA total yang diperoleh adalah di atas 10.000 bp. Ketebalan pita dapat mempengaruhi amplifikasi DNA, sehingga untuk pita DNA yang tebal perlu dilakukan pengenceran.



Gambar 1. Molekul DNA total kacang hijau (Keterangan: M= Marker 1 kb DNA ladder (ThermoScientific), 1= DNA total kacang hijau asal Kabupaten Pelalawan)

### 2. Suhu *annealing* untuk primer g-SSR

Optimasi suhu *annealing* dilakukan pada delapan pasang primer g-SSR (Gambar 2). Visualisasi hasil optimasi primer menggunakan primer G3598 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C diperoleh satu fragmen DNA yang utuh dan tidak *smear* berukuran 190 bp, sedangkan dengan menggunakan penurunan suhu *melting* sebesar 3°C diperoleh satu fragmen DNA yang utuh dan tidak *smear* berukuran 180 bp. Pada primer G7472 dengan menggunakan suhu

*annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C diperoleh sebelas fragmen DNA, yaitu satu fragmen di bawah 100 bp, tujuh fragmen berukuran 168 bp, 170 bp, 300 bp, 400 bp, 480 bp, 510 bp, 1000 bp dan tiga fragmen di atas 1000 bp, sedangkan dengan menggunakan penurunan suhu *melting* sebesar 3°C diperoleh sepuluh fragmen DNA, yaitu tujuh fragmen berukuran 170 bp, 300 bp, 400 bp, 480 bp, 510 bp, 600 bp, 710 bp dan tiga fragmen di atas 1000 bp. Primer G1671 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C dan 3°C masing-masing memperoleh satu fragmen DNA yang utuh dan tidak *smear*

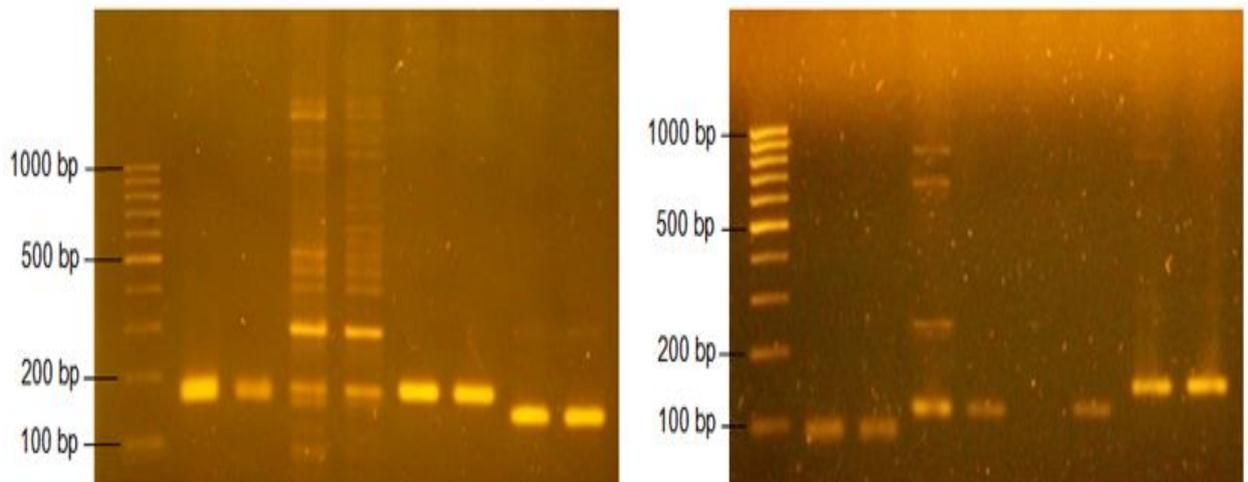
berukuran 174 bp. Pada primer G3427 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C dan 3°C masing-masing memperoleh satu fragmen DNA yang utuh dan tidak *smear* berukuran 160 bp.

Primer G2436 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C dan 3°C masing-masing memperoleh satu fragmen DNA yang utuh dan tidak *smear* berukuran 100 bp. Primer G0483 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C diperoleh empat fragmen DNA berukuran 120 bp, 220 bp, 690 bp, 890 bp, sedangkan dengan menggunakan penurunan suhu *melting* sebesar 3°C diperoleh

satu fragmen DNA yang utuh dan tidak *smear* berukuran 120 bp. Primer G2516 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C tidak terjadi amplifikasi, sedangkan dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 3°C diperoleh satu fragmen DNA yang utuh dan tidak *smear* berukuran 120 bp.

Primer G3302 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C dan 3°C masing-masing memperoleh satu fragmen DNA yang utuh dan tidak *smear* berukuran 150 bp.

Primer	G3598		G7472		G1671		G3427		G2436		G0483		G2516		G3302	
Tm-x	Tm-5	Tm-3	Tm-5	Tm-3	Tm-5	Tm-3	Tm-5	Tm-3	Tm-5	Tm-3	Tm-5	Tm-3	Tm-5	Tm-3	Tm-5	Tm-3
Ta (°C)	49,15	51,15	49,2	51,2	49,0	51,0	50,8	52,8	50,55	52,55	49,6	51,6	49,25	51,25	49,8	51,8



Gambar 2. Profil pita DNA hasil optimasi suhu *annealing* 8 pasang primer *g-SSR* pada kacang hijau. Keterangan: (Tm)= suhu *melting*, (Ta)= suhu *annealing*.

Berdasarkan hasil di atas, maka suhu *annealing* yang optimal dari setiap primer

*g-SSR* untuk mengamplifikasi DNA kacang hijau disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Suhu *annealing* yang optimal untuk 8 primer *g-SSR*

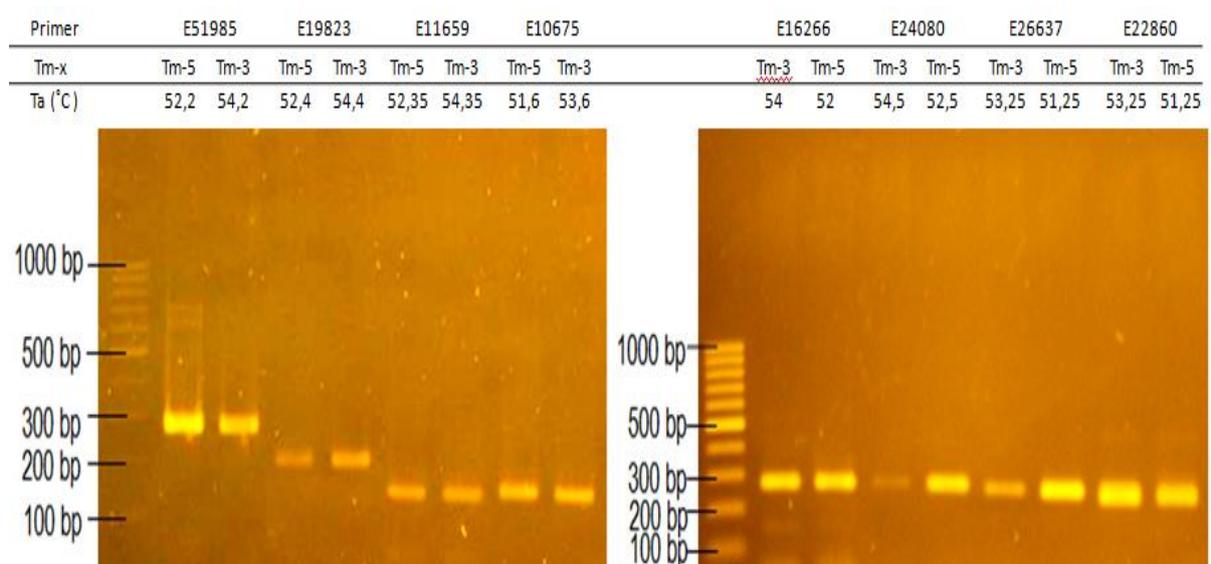
No.	Primer	Suhu <i>annealing</i> yang optimal (°C)
1.	G2436	50,55
2.	G3598	51,15
3.	G2516	51,25
4.	G7472	51,2
5.	G0483	51,6
6.	G1671	49,0
7.	G3302	49,8
8.	G3427	52,8

### 3. Suhu *annealing* untuk primer EST-SSR

Hasil optimasi suhu *annealing* pada 8 pasang primer EST-SSR disajikan pada Gambar 3. Visualisasi hasil optimasi primer menggunakan primer E51985 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C menghasilkan 3 pita yang berukuran 300 bp, 600 bp dan 700 bp, sedangkan dengan menggunakan penurunan suhu *melting* sebesar 3°C hanya menghasilkan 1 pita yang berukuran 300 bp. Pita yang berukuran 300 bp pada penurunan suhu *melting* sebesar 5°C lebih tebal daripada pita pada penurunan suhu *melting* sebesar 3°C. Pada primer E19823 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C dan 3°C menghasilkan sebuah pita yang berukuran 200 bp. Pita pada penurunan suhu *melting* sebesar 3°C lebih tebal daripada pita pada penurunan suhu *melting* sebesar 5°C. Pada primer E11659 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C dan 3°C menghasilkan sebuah pita yang utuh dan tidak *smear* berukuran 150 bp. Pada primer E10675 dengan menggunakan suhu *annealing*

dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C dan 3°C menghasilkan sebuah pita yang utuh dan tidak *smear* berukuran 150 bp.

Visualisasi hasil optimasi primer menggunakan primer E16266 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu sebesar 5°C dan 3°C menghasilkan pita berukuran 290 bp. Pada primer E24080 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C dan 3°C menghasilkan pita berukuran 290 bp. Pita yang berukuran 290 bp pada penurunan suhu *melting* sebesar 3°C lebih tebal daripada pita pada penurunan suhu *melting* sebesar 5°C. Pada primer E26637 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C dan 3°C menghasilkan pita berukuran 250 bp. Pita pada penurunan suhu *melting* sebesar 5°C lebih tebal daripada pita pada penurunan suhu *melting* sebesar 3°C. Pada primer E22860 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* sebesar 5°C dan 3°C menghasilkan pita berukuran 250 bp. Pita pada penurunan suhu *melting* sebesar 3°C lebih tebal daripada pita pada penurunan suhu *melting* sebesar 5°C.



Gambar 3. Profil pita DNA hasil optimasi suhu *annealing* 8 pasang primer EST-SSR pada kacang hijau. Keterangan: (Tm)= suhu *melting*, (Ta)= suhu *annealing*.

Berdasarkan hasil di atas, maka suhu *annealing* yang optimal dari setiap primer EST-

SSR untuk mengamplifikasi DNA kacang hijau disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Suhu *annealing* yang optimal untuk 8 primer EST-SSR

No.	Primer	Suhu <i>annealing</i> yang optimal (°C)
1.	E519885	52,2
2.	E19823	54,4
3.	E24080	52,5
4.	E22860	51,25
5.	E26637	53,25
6.	E16266	54
7.	E11659	54,35
8.	E10675	53,6

## KESIMPULAN

Suhu *annealing* yang optimal untuk primer G2436, G3598, G2516, G7472, G0483, G1671, G3302, dan G3427 adalah 50,55°C, 51,15°C, 51,25°C, 51,2°C, dan 51,6°C, 49,0°C, 49,8°C, dan 52,8°C secara berturut-turut. Suhu *annealing* yang optimal untuk primer E51985, E19823, E24080, E22860, E26637, E16266, E11659, dan E10675 adalah 52,2°C, 54,4°C, 52,5°C, 51,25°C, 53,25°C, 54°C, 54,35°C, dan 53,6°C secara berturut-turut. Suhu *annealing* yang tepat dapat menghasilkan pita yang baik dalam visualisasi hasil optimasi primer sehingga dapat digunakan untuk mendapatkan fragmen DNA target dengan menggunakan teknik PCR.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat - Dirjen Penguatan Riset dan Pengembangan - Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan dukungan dana penelitian Hibah Unggulan Perguruan Tinggi atas nama Herman, M.Sc, Ph.D.

## DAFTAR PUSTAKA

Chen H, Qiao L, Wang L, Wang S, Blair MW, Cheng X. 2015. Assesment of Genetic Diversity and Population Structure of Mungbean (*Vigna radiata* L.) Germplasm using EST-Based and Genomic SSR Markers. *Gene*.566: 175-183.

Herman, Dewi R, Roslim DI, Rasyad A. 2015. Genetic Diversity Analysis of Mungbean (*Vigna radiata* L.) from Riau Province based on Morphological and Agronomic

Characters. Di dalam: Proceedings SABRAO 13<sup>th</sup> Congress and International Conference; Bogor, 14-16 September 2015. Bogor: SABRAO.

- Indriyani R. 2017. Keanekaragaman Genetik Padi (*Oryza Sativa* L.) Lokal Sumatera Utara dengan Menggunakan Penanda *Simple Sequence Repeat* (SSR) [skripsi]. Medan: Departemen Biologi FMIPA USU.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. 1990. *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press Inc.
- Rybicky EP. 2001. PCR Primer Design and Reaction Optimisation In Molecular Biology Techniques Manual. South Africa: Departement of Microbiology University Cape Town.
- Saghai-Maroo MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. 1984. Ribosomal DNA Spacer-Length Polymorphisms in Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location, and Population Dynamics. *PNAS*. 81:8014-8018.
- Somta P, Musch W, Kongsamai B, Chanprame S, Nakasathien S, Toojinda T, Sorajjapinun W, Seehalak W, Tragoonrun S, Srinives P. 2008. New Microsatellite Markers Isolated From Mungbean (*Vigna radiata*L.) Wilczek). *Mol. Ecol. Resour*. 8, 1155–1157.
- Toth G, Gapsari Z, Jurka J. 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genome, Survey and Analysis. *Genome Res*10:1967–1981.
- Wahyudi TH. 2007. Pengaruh Suhu *Annealing* dan Jumlah Siklus yang Berbeda Pada Program PCR Terhadap Keberhasilan Isolasi dan Amplifikasi mtDNA Ikan Patin (*Pangasius hypothalamus*) [Skripsi]. Bogor: ITB.

