

SKRINING ISSR PRIMER STUDI PENDAHULUAN KEKERABATAN ANTAR JAHE MERAH, JAHE EMPRIT DAN JAHE BESAR

Sri Wahyuni, D. H. Xu², N. Bermawie¹, H. Tsunematsu², dan T. Ban²

¹) Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat;

²) Japan International Research Centre Agricultural System

ABSTRAK

Metode untuk mempelajari kekerabatan tanaman secara molekuler telah banyak berkembang, diantaranya adalah ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Pada penelitian ini dilakukan skrining terhadap 28 ISSR primer sebagai studi pendahuluan mengenai primer yang cocok untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar jahe merah, jahe besar dan jahe kecil. Genomik DNA diisolasi dari bahan rimpang dengan CTAB. Untuk amplifikasi ISSR digunakan 20 µl total volume yang terdiri atas 30 – 100 ng genomik DNA, 10 pmol primer, 1x PCR buffer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ dan 0,5 rTaq polymerase yang kemudian diamplifikasi pada thermocycle. Produk amplifikasi dielektroforesis pada 1,5% agarose gel, direndam dalam ethidium bromide dan pola pita yang dihasilkan diamati pada UV transiluminator. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kisaran pola pita yang teramplifikasi adalah 3 – 14 buah. Dari 28 primer yang diskriminasi 10 primer menghasilkan pola pita polimorfik, tetapi hanya 3 primer yang menampilkan pita polimorfik lebih dari 25% yaitu ISSR 18, ISSR 19, dan ISSR 15. Diantara ketiga kultivar jahe, jahe merah mempunyai kekerabatan lebih jauh dibanding antar jahe besar dan jahe kecil. Masih diperlukan skrining lebih banyak primer untuk mendapatkan primer dengan tingkat polimorfisme tinggi yang sesuai dan dapat digunakan sebagai marka molekuler untuk membedakan antar kultivar jahe tersebut.

Kata kunci : *Zingiber officinale*, ISSR

ABSTRACT

Screening ISSR primer preliminary study of the relationship between small, big and red ginger

Screening ISSR Primer as preliminary study the relationships of small, big and red ginger. A PCR- based method for genetic diversity analysis such as ISSR has been well developed recently. In this research, 28 ISSR primer were screened aiming to study the relationships of red, small and big ginger. Genomic DNA was isolated from rhizome using CTAB based method. The DNA were then amplified in a thermocycler with a total volume of 20 µl consisted of 30 – 100 ng genomic DNA, 10 pmol primer, 1x PCR buffer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ dan 0,5 rTaq polymerase. Electroforesis of the amplification product was carried out on 1,5% agarose gel, stained with ethidium bromide and viewing on UV transiluminator light to see the banding pattern. Results showed that amplified banding pattern of ISSR range from 3 – 14. Among the 28 primers screened, 10 primers showed polymorphic banding pattern but only 3 primers showed polymorphic bands more than 25%, i. e. ISSR 18, ISSR 19, and ISSR 15 respectively. Based on the ISSR data, small and big ginger has closer relationships compared to the red ginger. To find the suitable primers that can be used to distinguished the ginger cultivar and find suitable molecular markers, more primers need to be screened.

Keyword : *Zingiber officinale*, ISSR

PENDAHULUAN

Metode yang berbasis PCR (*polymerase chain reaction*) untuk mempelajari keragaman genetik atau kekerabatan antar aksesori tanaman telah banyak berkembang seperti RAPD (random amplified polymorphisme DNA), RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphisme dan ISSR/SSRs (inter simple sequence repeats/simple sequence repeats). Tiap tehnik tidak hanya berbeda dalam metode amplifikasinya tetapi juga berbeda dalam jumlah pola pita yang dihasilkan (teramplifikasi). Jumlah pola pita yang dihasilkan dengan tehnik RAPD atau ISSR/SSRs lebih sedikit bila dibanding dengan RFLP atau AFLP. Biasanya sebanyak 50 - 100 pola pita teramplifikasi pada AFLP yang hasilnya divisualisasikan pada denaturing polyacrylamide gel (Vos *et al.*, 1995), sedangkan pada RAPD atau ISSR jumlah pita yang teramplifikasi hanya sedikit (kurang dari 20 pola pita), dan visualisasi dapat dilakukan pada agarose gel.

ISSR merupakan marker yang berkembang lebih akhir dibanding RAPD dan RFLP dan dapat pula digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada tanaman. ISSR/SSRs dikenal juga dengan istilah mikrosatelit yaitu berupa pengulangan mono, di, atau trinucleotida yang biasanya terdiri atas 4 - 10 unit pengulangan, membentang pada utas DNA. Susunan basa yang demikian merupakan karakteristik dari nuklear

genom dan bervariasi antar spesies atau populasi. Pada ISSR pendeteksian genetik polymorphisme tanpa perlu lebih dahulu mengetahui susunan basa (*sequence*) dari genomik tanaman diantara susunan basa yang berulang, asal susunan basa berulang tersebut mewakili secara luas dan menyebar di seluruh genom. Terdapat beberapa type ISSR primer yaitu : (1) Un-anchored primer (primer tak berjangkar). Amplifikasi dengan primer tak berjangkar terjadi bila susunan basa yang berulang jaraknya dekat dengan template (2 - 3 kb) serta orientasinya terbalik. Bersifat multipel produk sehingga jumlah pola pita yang dihasilkan dapat lebih dari satu. (2) Anchored primer (primer berjangkar) yaitu primer dengan penambahan beberapa basa tidak berulang pada posisi '3 atau '5 di awal atau akhir susunan basa pada primer yang digunakan yang fungsinya adalah untuk memastikan target amplifikasi.

Tehnik ISSR digunakan untuk mempelajari keragaman genetik diantaranya pada tanaman teh (Mondal, 2002; Lai *et al.*, 2001) dan *Botrycum pumicola* (Camacho dan Liston, 2001). Pada dasarnya pada ISSR untuk menginisiasi bagian tertentu utas DNA pada daerah dekat diantara pengulangan mikrosatelit menggunakan primer berjangkar pada posisi 5' atau '3 diawal/akhir primer dengan 2 sampai 4 tambahan basa tidak berulang (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Jahe telah lama dikenal dan diusahakan di Indonesia. Prediksi areal pengusahaan jahe pada tahun 2002

adalah 25.139 hektar (Anon, 2002a) dan ekspor jahe segar pada tahun sebelumnya sebesar 6.826 ton, setara dengan US\$ 3577,5 dengan negara tujuan utama Jepang, Hongkong, Korea, China, Singapura, Malaysia, Eropa, Timur tengah dan Amerika (Anon, 2002b). Berdasar penampakan morfologi tanaman, Rostiana *et al.*, (1991) mengelompokan jahe menjadi tiga tipe yaitu jahe merah, jahe gajah (jahe besar) dan jahe emprit. Penggunaan ketiga tipe jahe tersebut utamanya berbeda. Jahe merah dan jahe emprit biasa digunakan untuk obat, selain dapat digunakan pula untuk bumbu masak. Jahe gajah digunakan untuk makanan (pickel), bahan minuman (*beverage*) dan bumbu masak. De Guzman dan Siemonsma (1999) juga mencatat dikenal tiga type jahe yaitu (1) jahe badak = jahe gajah = jahe putih besar, (2) jahe merah = jahe sunti and (3) jahe putih kecil = jahe emprit. Rimpang ketiga tipe tersebut berbeda dalam ukuran, warna, aroma serta komposisi kimianya dan dapat dipertimbangkan sebagai kultivar. Jahe besar mempunyai ukuran rimpang besar, aroma kurang menyengat dan kurang berserat. Jahe merah mempunyai ukuran rimpang kecil, warna kulit rimpang merah, aroma menyengat dan banyak seratnya. Jahe putih mempunyai ukuran rimpang kecil, warna kulit rimpang krem, aroma menyengat dan daging rimpang berserat.

Kekerabatan diantara ketiga kultivar jahe tersebut secara molekuler belum banyak dipelajari. Berdasarkan

data AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) pada 22 aksesori plasma nutfah jahe yang terdiri atas jahe merah, jahe kecil dan jahe besar diperoleh bahwa jahe merah mempunyai kekerabatan yang lebih jauh dengan jahe besar, namun demikian belum diperoleh marka yang dapat membedakan ketiga tipe jahe tersebut dengan jelas (Wahyuni *et al.*, 2003). Pada penelitian ini dilakukan skrining terhadap ISSR primer untuk mengetahui dan menentukan primer yang sesuai sebagai studi pendahuluan untuk mempelajari kekerabatan antar ketiga tipe jahe (jahe merah, jahe emprit dan jahe gajah).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biological Resources Division, Japan International Research Centre Agricultural System, Tsukuba, Jepang, Januari – Maret 2003. Genomic DNA diisolasi dari rimpang jahe dengan CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) berdasar metode Doyle dan Doyle (1990). Untuk memudahkan dalam penggerusan rimpang, sebelum ditambahkan nitrogen cair daging rimpang dibersihkan kulitnya kemudian diiris tipis/halus. DNA yang diperoleh kemudian dimurnikan dengan cara diekstraksi ulang menggunakan magnet silika (*silica beads*) dari paket ekstraksi DNA MagExtractor Plant Genome Kit, Toyobo. Co. agar diperoleh kualitas DNA yang dapat diamplifikasi dengan ISSR. Konsentrasi DNA dalam larutan kemudian diperkirakan dengan

mengelektroforesis sejumlah sampel (2 µl) dicampur larutan pewarna (loading buffer yang terdiri dari xylene, xyanol dan glycerol) pada agarose gel pada konsentrasi 0,8%. Sebagai pembanding digunakan λ DNA dengan konsentrasi berbeda yang telah diketahui diikutkan pada saat elektroforesis pada sumur tersendiri. Hasil elektroforesis kemudian diamati dibawah direndam dalam 1% ethidium bromide selama 30 menit dan diamati dibawah lampu UV transiluminator sehingga dapat dihitung konsentrasi DNA setiap sampel hasil ekstraksi yang diperoleh.

Untuk amplifikasi ISSR, total campuran yang digunakan adalah sebanyak 20 µl terdiri dari 30 - 100 ng genomic DNA, 10 pmol primer, 1x PCR buffer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, and 0,5 Unit *rTaq* polymerase. Diusahakan pencampuran larutan homogen dan kegiatan dilakukan pada kondisi dingin (diatas es). Amplifikasi dilakukan menggunakan thermocycle dengan tahapan program sebagai berikut: Denaturasi awal pada kondisi 94° C selama 2 min, dilanjutkan dengan 40 putaran yang terdiri dari denaturasi pada 94° C selama 30 s, amplifikasi 52° C selama 45 s, dan extension pada 72° C of 2 min. Setelah selesai 40 putaran selanjutnya diakhiri dengan final extension pada 72° C selama 7 min. Hasil dari reaksi kemudian dielektroforesis pada garose gel pada konsentrasi 1,5%. Gel kemudian diwarnai dengan Ethidium bromide dan diamati dibawah UV transiluminator

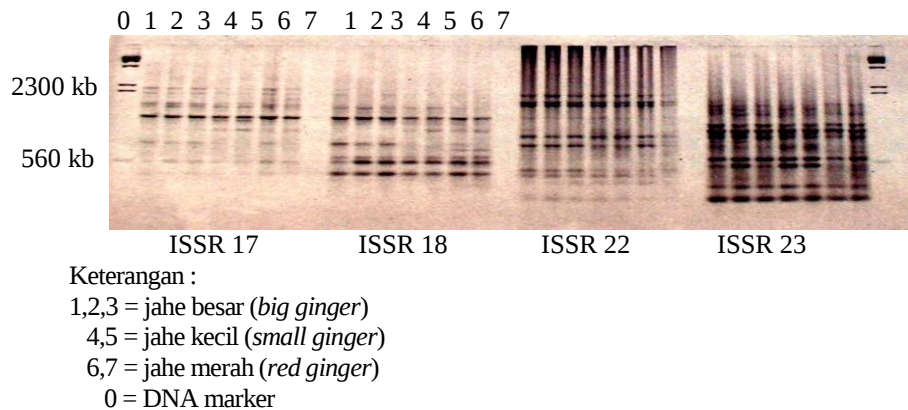
untuk melihat pola pita yang dihasilkan.

Sebanyak 28 primer diskriming untuk melihat jumlah pola pita yang teramplifikasi pada setiap primer, demikian pula tingkat polymorphis-nya. Primer yang menampilkan polimorphisme kemudian dihitung ada tidaknya pola pita pada kultivar yang berdeda. Berdasar pola pita tersebut kemudian dihitung matrik kesamaan antar kultivar yang dihitung berdasarkan Dice algoritme yang terdapat dalam paket program NTSYSpc (*Exeter software*).

HASIL PENELITIAN

Pada umumnya kedua puluh delapan primer yang diskriming dapat menghasilkan pola pita yang teramplifikasi dengan jumlah berkisar antara 4 - 14 buah dan umumnya pada kisaran ukuran 500 – 2300 kb. (Gambar 1). Pola pita yang teramplifikasi tersebut terdiri dari pola pita utama (*major bands*) yang ditandai oleh penampakan pita yang lebih jelas dan tebal serta pola tidak utama pita (*minor bands*) yang penampakan pitanya lebih tipis dan kadang kurang jelas. Pita utama biasanya merupakan ekspresi dari gen utama yang mengendalikan sifat-sifat tertentu.

Sequence (susunan basa) dari primer yang terdiri dari pasangan basa berulang dua (dimer), berulang tiga (trimer) dan berulang empat (tetra mer) serta jumlah pola pita yang teramplifikasi pada setiap primer tersebut (Tabel 1). Polymorphisme yang terjadi antara jahe merah, jahe



Gambar 1. Pola pita yang teramplifikasi dengan ISSR.
 Figure 1. ISSR amplified banding patterns

empurit dan jahe besar dari 28 primer yang diskriminasi terjadi hanya pada 10 primer dengan rata-rata tingkat polimorfisme rendah.

Primer yang memberikan polimorfisme diatas 30 % hanyalah tiga primer yaitu ISSR 15, ISSR 18 dan ISSR 19 yang mempunyai susunan basa berulang AAC. Umumnya penggunaan ISSR memberikan tingkat polimorfisme yang tinggi. Pada *Botrychium pumicula* (*Ophioglossaceae*) dari 6 primer terpilih rata-rata polimorfismenya sebesar 51,72%, dan tertinggi adalah 73,33% (Camacho dan Liston, 2001), pada barley dari 13 primer yang digunakan dihasilkan 70 pola pita yang 100% polimorphic (Russel *et al.*, 1997), sementara pada teh pola pita polimorphic sebesar 84% (Mondal, 2002). Bila dikelompokkan lebih lanjut berdasar jumlah susunan basa berulang maka kisaran pola pita yang teramplifikasi antar penggunaan tiga atau empat pasangan basa berulang memberikan hasil yang sama, tetapi

tingkat polimorfisme yang terjadi lebih besar pada penggunaan tiga pasangan basa berulang (Tabel 2).

Sementara penggunaan dua pasangan basa berulang pada primer memberikan hasil yaitu, baik jumlah pita yang teramplifikasi maupun persen polimorfisme yang diperoleh paling rendah. Disini tidak ada hubungan dengan semakin panjang susunan basa berulang dengan jumlah pita yang teramplifikasi dengan tingkat polimorfismenya. Hal ini sesuai dengan penggunaan ISSR pada tanaman the yang menunjukkan bahwa tidak ada hubungan yang jelas antara panjang susunan basa berulang dengan tingkat polimorfisme yang dihasilkan (Mondal, 2002). Sebaliknya studi pada manusia menunjukkan bahwa semakin panjang susunan basa berulang pada primer menghasilkan tingkat polimorfisme yang lebih tinggi (Weber, 1990).

Table 1. Susunan basa, pola pita yang teramplifikasi serta polymorphismnya dari 28 primer yang diskriminasi

Table 1. Sequence, numbers of amplified banding pattern and the persen of polymorphism of 28 primers

Kode primer/ Primer code	Susunan basa/Sequence	Σ basa berulang/ Number of repeated base unit	Σ pola pita yang dihasilkan/ Number of bands	Σ pola pita polymorphic/ Number of polymorphic bands	% pita polymorphik/ % of polymorphic bands
ISSR 1	AGA GAG AGA GAG AGA GC	2	5	1	20
ISSR 2	TGT GTG TGT GTG TGT GG	2	3	0	0
ISSR 3	GTG ACA CAC ACA CAC AC	2	4	0	0
ISSR 4	ACC GTG TGT GTG TGT GT	2	4	0	0
ISSR 5	AGA GAG AGA GAG AGA GG	2	5	0	0
ISSR 6	AGA GAG AGA GAG AGA GT	2	6	0	0
ISSR 7	AGA GAG AGA GAG AGA GAA	2	7	0	0
ISSR 8	AGA GAG AGA GAG AGA GAC	2	5	0	0
ISSR 9	AGA GAG AGA GAG AGA GAT	2	7	0	0
ISSR 10	AAG AGA GAG AGA GAG AG	2	4	0	0
ISSR 11	CAG AGA GAG AGA GAG AG	2	8	1	12,5
ISSR 12	CCA GAG AGA GAG AGA GAG	2	7	0	0
ISSR 13	CTA GAG AGA GAG AGA GAG	2	11	0	0
ISSR 14	AAC AAC AAC AAC AAC AAC C	3	9	1	11,11
ISSR 15	AAC AAC AAC AAC AAC AAC G	3	13	4	30,77
ISSR 16	CAA CAA CAA CAA CAA CAA C	3	5	0	0
ISSR 17	GAA CAA CAA CAA CAA CAA C	3	9	1	11,11
ISSR 18	CTA ACA ACA ACA ACA ACA AC	3	8	3	37,5
ISSR 19	TTA ACA ACA ACA ACA ACA AC	3	10	3	30,00
ISSR 20	ACA CAC ACA CAC ACA CAA	2	7	0	0
ISSR 21	ACA CAC ACA CAC ACA CC	2	5	0	0
ISSR 22	ACA CAC ACA CAC ACA CAT	2	10	0	0
ISSR 23	AAC ACA CAC ACA CAC AC	2	10	1	10
ISSR 24	AGA CAC ACA CAC ACA CAC	2	11	0	0
SP65	CGA ACG AAC GAA CGA A	4	5	0	0
SP42	CTG ACT GAC TGA CTG A	4	4	0	0
SP18	CTC ACT CAC TCA CTC A	4	14	1	7,14
SP05	ATC CAT CCA TCC ATC C	4	13	2	15,38

Tabel 2. Jumlah pasangan basa berulang pada primer yang digunakan dan jumlah pola pita yang teramplifikasi

Table 2. Repeated base units of primer and average numbers of banding patterns

Pasangan basa ber- ulang pada primer/ Repeated base units of primer	Pola pita yang teramplifikasi/ Banding pattern amplified		% Polymorphism
	rata-rata/ Average	Kisaran/ Range	
Di	6,61	3 - 11	0,167
Tri	9,00	8 - 13	2,17
Tetra	9,00	5 - 14	0,75

Susunan basa berbeda disetiap individu, namun demikian biasanya individu yang mempunyai kekerabatan dekat secara genetic mempunyai kesamaan susunan basa lebih banyak bila dibanding dengan individu yang kekerabatannya lebih jauh. Berdasar DNA sequence dari daerah nuclear ITS (*internal transcribe spacer*) dan plasmid *matK* data, *Alpinia galanga* dan *Alpinia conchigera* berada dalam satu sub cluster, dan berbeda sub cluster dengan *Renealmia battenbergiana*, walaupun dalam cluster yang sama dalam famili zingiberaceae (Kress *et al.*, 2002). Sequence (susunan basa) dari kloroplast DNA pada tanaman *Alpinia galanga* dan *Alpinia conchigera* pada daerah antara *trnL* (UAA) 3' dan *trnF* (GAA) yang terdiri dari 310 susunan basa hanya berbeda satu basa, sedang dengan *Renealmia battenbergiana* berbeda sebanyak 16 basa (Rangsiruji, 1999).

Berdasar ISSR polymorphisme, antar jahe besar, jahe merah dan jahe kecil, kesamaan diantara ketiganya berdasarkan rata-rata perbedaan jarak terdekat (Average taxonomic distance), yang paling besar adalah antara jahe besar dengan jahe kecil yaitu sebesar 0,5263, sebaliknya kesamaan terkecil adalah antara jahe besar dengan jahe merah 0,2105 (Tabel 3).

Hasil penelitian Wahyuni, *et al.* (2003), penggunaan tehnik AFLP untuk mempelajari keragaman genetik pada jahe mengindikasikan bahwa dari 22 aksesi plasma nutfah jahe yang digunakan yang terdiri dari jahe besar, jahe merah dan jahe kecil, pada dasarnya dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok utama, namun belum diperoleh marka yang dapat digunakan untuk membedakan antar ketiga tipe jahe tersebut. Jahe merah mempunyai kekerabatan lebih jauh dengan jahe besar bila dibandingkan antara jahe besar dan jahe kecil. Berdasarkan pola pita yang dihasilkan, ISSR 18 dan 19 mengindikasikan dapat digunakan sebagai marka molekuler untuk identifikasi jahe merah, jahe kecil atau jahe besar, namun masih perlu dikaji lebih lanjut karena pola pita yang dihasilkan tidak merupakan pola pita utama (minor bands), sehingga kurang begitu jelas. Selain itu masih diperlukan skrining lebih banyak primer lagi sehingga diperoleh primer yang dapat digunakan sebagai pembeda antar ketiga kultivar jahe tersebut.

Tabel 3. Koefisien kemiripan antar ketiga kultivar jahe
 Table 3. Similarities among three types of ginger

	Jahe besar/ <i>Big ginger</i>	Jahe merah/ <i>Red ginger</i>	Jahe kecil/ <i>Small</i> <i>ginger</i>
Jahe besar/ <i>Big ginger</i>	1,0000		
Jahe merah/ <i>Red ginger</i>	0,2105	1,0000	
Jahe kecil/ <i>Small ginger</i>	0,5263	0,2632	1,0000

Secara morfologi dan dengan jelas dapat dilihat, jahe besar, jahe kecil dan jahe merah dibedakan terutama oleh ukuran rimpang dan warna kulit rimpang. Rostiana *et al.*, (1991) menyebutkan perbedaan karakteristik ketiga tipe jahe antara lain adalah ukuran rimpang, warna rimpang, kandungan serat, dan warna daun. Lebih lanjut Bermawie, *et al.*, (2003) menyebutkan ketiga tipe jahe tersebut berbeda dalam hal penampakan rimpang (struktur, warna, bobot rimpang/rumpun, diameter, tinggi dan panjang), panjang akar, batang (tinggi, jumlah, warna dan bentuk) dan daun (panjang, lebar dan warna) serta mutu rimpangnya (kadar atsiri, pati, dan serat). Jahe merah umumnya mempunyai kadar atsiri tinggi, sedangkan kadar pati dan kadar serat ketiga tipe jahe tersebut bervariasi, baik antar tipe maupun di dalam tipe yang sama. Secara umum, jumlah perbedaan antara jahe merah dan jahe besar secara morfologi lebih banyak dibanding antara jahe besar dan jahe kecil. Sementara kesamaan berdasar data molekuler, jahe merah mempunyai kesamaan yang lebih kecil ke jahe besar dibanding antar jahe kecil dengan jahe besar, dapat dikatakan bahwa

kemiripan secara morfologi sejalan dengan secara molekuler.

KESIMPULAN

Kisaran pola pita yang teramplifikasi dari 28 primer yang diskriminasi adalah 3 – 14 pola pita dan tingkat polymorfisme hanya terjadi pada sepuluh primer dengan persen polymorfisme yang masih tergolong rendah yaitu berkisar antara 7,14 – 37,5%. ISSR 15 memberikan tingkat polymorfisme tertinggi. Tidak ada hubungan yang jelas antara jumlah susunan basa berulang dengan jumlah pola pita yang teramplifikasi dengan tingkat polymorfismenya. Diantara ketiga kultivar jahe, jahe merah mempunyai kekerabatan jauh, dibanding antar jahe besar dan jahe kecil. Masih diperlukan skrining banyak primer lagi untuk mendapatkan primer dengan tingkat polymorfisme tinggi yang sesuai dan dapat digunakan sebagai marka molekuler untuk membedakan antar kultivar jahe tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

Anonimous, 2002a. Statistik perkebunan Indonesia 2000 – 2002 : Jahe. Direktorat Bina Produksi

- Perkebunan. Dept. Pertanian. Jakarta. 20 h.
- Anonimous, 2002b. Statistik perdagangan luar negeri Indonesia (Indonesian Foreign Trade Statistic) : Ekspor/Exports. Jilid I. BPS. Jakarta. h. 77 - 78.
- Bermawie, N., B. Martono, N. Ajijah, S.F. Syahid dan Hadad, E.A., 2003. Status pemuliaan tanaman jahe. Perkembangan Teknologi Tanaman Rempah dan Obat. 15 (2) : 39-56.
- Camacho F.J. and A. Liston, 2001. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicula* (*Ophioglossaceae*) based on Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). American Journal of Botany 88 (6) : 1065 – 1070.
- De Guzman C.C. and J.S. Siemonsma, 1999. Plant resources of south east Asia 13 : Spices. Prosea. Bogor. Indonesia. 400 pp.
- Doyle J.J. and Doyle J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12 (1) : 13 - 15.
- Kress, W. J., L. M. Prince and K. J. Williams, 2002. The phylogeny and new classification of the ginger (*Zingiberaceae*) : evidence from molecular data. American Journal of Botany 89 (11) : 1682 – 1696.
- Lai, J.A., W.C Yang and J.Y Hsiao, 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 42 : 93-100.
- Mondal, T.K., 2002. Assessment of genetic diversity of tea (*Camelia sinensis*(L.) O. Kuntze) by inter-sequence repeate polymerase reaction. Euphytica 128 : 307-315.
- Rostiana O., A. Abdullah, Taryono dan Hadad E.A., 1991. Jenis jenis tanaman jahe. Edisi khusus Littro VII (1) : 7 - 10.
- Rangsiruji, A., 1999. Sequence data matrix of alignned spacer between trnL (UAA) 3' exon and trnF (GAA) of cloroplast DNA for 22 taxa of Zingiberaceae. http://www.icmb.ed.ac.uk/research/cronk/2_kaist.html. 4 p.
- Russel J.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh, 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theoretical Applied Genetic 95 : 714 - 722.
- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, Theo Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau, 1995. AFLP: a new tehniue for DNA finger printing. Nucleic Acids Research 23 (21) : 4407 - 4404.
- Weber, J.L., 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG.dT)_n polymorphism. Genomics 7 : 524-530.

- Wahyuni, S., D.H. Xu, N. Bermawie, H. Tsunematsu and T. Ban, 2003. Genetic relationships among ginger accessions based on AFLP marker. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 8 (2) : 60-68.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda, 1994. Genome finger printing by Simple Sequence Repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20 : 176 – 183.