ISOLASI MOTIF SSR DARI PUSTAKA GENOM DURIAN (*DURIO ZIBETHINUS* MURR. VAR. MATAHARI)

Panca J. Santoso[1], Adi Pancoro[2], Sony Suhandono[2], and I Nyoman P. Aryantha[2]
[1]*Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika, Badan Litbang Kementrian Pertanian*
Jl. Raya Solok-Singkarak Km 8, Solok 27301, Sumatera Barat. Email: jarot305@yahoo.com
[2]*Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung*
Jl. Ganeca 10, Bandung 40132. Email: adi@sith.itb.ac.id

ABSTRACT

Simple sequence repeats were isolated and characterized from genomic library of durian (Durio zibethinus Murr. var. Matahari) based on modified enrichment method. A total of 366 microsatellite motifs are found from 286 DNA inserts, consisted of 137 mononucleotide, 21 dinucleotide, 71 trinucleotide, and 137 tetranucleotide. A number of 5 motifs, namely A_n/T_n, G_n/C_n, AC_n, AG_n, and TAG_n, match with oligonucleotide enrichment motifs. Short motifs (7-10 nt long) dominate the motif found with the number of 328 (89,6%) loci. Longer sequences, which length of 11 to 89 nt, are found 38 (10,4%) loci. Two hundred fourty two motifs grouped into perfect type, 140 into imperfect type, and 2 into compound type. The highest number of motif obtained is $(C)_7$ which as many 75 loci, followed by (CTTT)2CT, $(CGCT)_2CG$, $(AG)(AAAG)_2$, $(TGC)_3$, $(A)_7$, $(G)_7$, and $(A)_8$ each of 46, 36, 28, 16, 11, 11 and 5 loci respectively, whilst the rests consist of 1 to 8 loci. Further activities are motif selecting and primer generating to make it ready to be used as functional marker.

Key words: SSR, genomic library, durian.

ABSTRAK

Simple sequence repeat telah diisolasi dan dikarakterisasi dari pustaka genom durian (*Durio zibethinus* Murr. var. Matahari) berdasarkan metode pengayaan yang telah dimodifikasi. Sebanyak 366 motif mikrosatelit telah ditemukan dari 286 DNA insert, yang terdiri atas 137 mononukleotida, 21 dinukleotida, 71 trinukleotida, dan 137 tetranukleotida. Sebanyak 5 motif, yaitu A_n/T_n, G_n/C_n, AC_n, AG_n, dan TAG_n sesuai dengan motif oligonukleotida pengayaan. Motif sekuens pendek (7-10 nt) mendominasi motif yang ditemukan dengan jumlah sebanyak 328 (89,6%) lokus. Sekuens yang lebih panjang berukuran 11 sampai 89 nt diperoleh sebanyak 38 (10,4%) lokus. Dua ratus empat puluh dua motif dikelompokkan dalam tipe sempurna, 140 tidak sempurna, dan 2 campuran. Motif yang paling banyak ditemukan adalah $(C)_7$ sebanyak 75 lokus, diikuti oleh (CTTT)2CT, $(CGCT)_2CG$, $(AG)(AAAG)_2$, $(TGC)_3$, $(A)_7$, (G)7, dan $(A)_8$ masing-masing sebanyak 46, 36, 28, 16, 11, dan 5 lokus, sisanya bervariasi dari 1 sampai 8 lokus. Kegiatan selanjutnya adalah seleksi motif dan merancang primer spesifik agar dapat digunakan sebagai marka fungsional.

Kata kunci: SSR, pustaka genom, durian.

PENDAHULUAN

Durian (*Durio zibethinus* Murr.) merupakan salah satu tanaman buah tropika asli Indonesia. Komoditas yang diberi julukan *Si Raja Buah* ini telah berkembang di kawasan ASEAN dan menempatkan Indonesia sebagai produsen ke-3 terbesar setelah Thailand dan Malaysia (Brown, 1997; Lim, 1990; Nanthachai, 1984). Luas areal pertanaman durian di Indonesia sampai tahun 2010 tercatat mencapai 61,849 ha, dengan produksi sebanyak 797,798 ton (Kemtan 2012). Namun demikian, produksi sebanyak itu belum mampu memenuhi kebutuhan konsumsi nasional, sehingga harus dipenuhi melalui impor yang nilainya mencapai 23,149 ton di tahun 2007. Kebutuhan impor ini dipicu oleh permintaan konsumen untuk memperoleh jaminan kulitas, yang cukup sulit ditemui pada produksi lokal.

Tersedianya varietas unggul menjadi salah satu jalan keluar untuk meningkatkan produksi dan kualitas durian nasional. Konsumen umumnya menghendaki durian ukuran buah sedang, aroma kuat, daging tebal bertekstur lembut kering (pulen) dan rasanya manis legit (Santoso *et al.,* 2008).

Pedagang menginginkan durian yang tahan simpan dan tidak mudah pecah, sedangkan pekebun menginginkan varietas durian yang produktif, tahan penyakit, dan genjah (Santoso dan Nasution, 2009).

Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika sejak tahun 2009 telah melakukan program pemuliaan (*breeding program*) durian yang bertujuan untuk memperoleh varietas unggul guna memenuhi keinginan konsumen dan para pelaku usaha durian. Kegiatan pemuliaan yang dilaksanakan berupa persilangan secara *inter* dan *intra-spesies* (Indriyani *et al.,* 2012). Pemuliaan secara konvensional ini perlu dibantu dengan perangkat (*tools*) molekuler untuk membantu mempercepat siklus pemuliaan, yang lebih umum dikenal dengan istilah *molecular assisted selection* (*MAS*).

Aplikasi penanda molekuler telah berkembang sangat pesat. Dalam persilangan konvensional, penanda molekul terbukti cukup membantu di dalam mendeteksi alel-alel yang diharapkan sedini mungkin. Selain itu, pengembangan aplikasi penanda molekul dapat digunakan untuk melihat tingkat keragaman genetika suatu populasi atau turunan hasil persilangan. Yang cukup menarik penanda ini dapat digunakan untuk paternity analysis dan studi quantitatif trait locus (QTL). Salah satu penanda molekuler yang dapat memenuhi kebutuhan ini adalah mikrosatelit atau *simple sequence repeat* (SSR). SSR berupa urutan pendek yang tiap ulangannya terdiri atas satu sampai enam nukleotida (Liu, 2000).

Marka ini sangat populer digunakan karena memiliki kelebihan karakter lokus co-dominan dan tingkat polymorphic yang tinggi, mudah diulang dan stabil (Ritschel *et al.*, 2003) serta di dalam menganalisisnya dapat diotomatisasi (Schuelke, 2000). Variabilitas yang tinggi memungkinkan penghitungan secara akurat pada setiap individu, terutama untuk mendeteksi kontribusi paternal dan studi sistem persilangan (Ottewell *et al*., 2005). Pada tanaman perkebunan, SSR telah banyak digunakan untuk program MAS kelapa sawit (Billotte *et al.,* 2005; Singh *et al.,* 2007). Marka ini juga telah digunakan pada tanaman mangga (Pancoro *et al*., 2009).

Tahap awal aplikasi marka SSR adalah menyediakan motif dan primer. Motif dapat diperoleh melalui isolasi dari genom untuk tanaman yang belum tersedia data base, atau secara *in silico* untuk yang sudah tersedia data base-nya (Sharma *et al.,* 2007).

Makalah ini memaparkan kegiatan isolasi dan karakterisasi motif SSR dari pustaka genom durian menggunakan teknik pengkayaan oligonukleotida bermotif SSR.

BAHAN DAN METODE

Isolasi motif SSR secara umum dilaksanakan berdasarkan metode pengkayaan yang dikembangkan oleh Edwards (1996) yang telah dimodifikasi, sbb:

DNA genom durian diisolasi dari daun muda varietas Matahari yang telah disimpan dalam kantong plastik berisi silica gel biru. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan protokol *Genomic DNA Mini Kit* dari Geneaid yang telah dimodifikasi. DNA hasil isolasi kemudian dipotong menggunakan enzim restriksi *Hinc*II, *Alu*I, dan *Rsa*I.

Fragmen DNA diligasi dengan adaptor *Mlu*I 21-mer dan 25-mer yang saling berkomplemen. Untuk mengetahui keberhasilan proses ligasi, maka dilakukan PCR terhadap ligan dengan langkah sbb: 10 ul ligan, 100 ng primer 21-mer, buffer PCR 1x, 1 unit *Taq* polymerase, 1,5 mM MgCl, 200

uM dNTPs mix, dan air deion hingga volume 30 ul. Selanjutnya dipilih dan dipurifikasi ligan yang panjangnya antara 300 sampai 700 bp.

Membran untuk hibridisasi disiapkan sbb: 18 macam oligonukleotida bermotif SSR produk *IDT®* dikelompokkan berdasarkan *melting temperature*-nya. Selanjutnya dilakukan penetesan larutan oligonukleotida ke membrane Nylon Hybond N^+ berukuran 0,5 cm^2. Membran kemudian dikeringkan dalam suhu kamar selama 1 jam, dilanjutkan dengan dioven pada suhu 65°C selama 1 jam. Kemudian didedahkan pada UV crosslinker dengan panjang gelombang 254 nm energy 0,070 joule selama 15 detik. Selanjutnya membrane dicuci dengan buffer hibridisasi pada suhu 45°C selama 48 jam sebanyak 2x, dilanjutkan 1x SSC selama 3 jam, kemudian disimpan dalam cawan petri steril pada suhu -20°C.

Hibridisasi dimulai dengan mendenaturasi sampel DNA (ligan) ke dalam air mendidih selama 10 menit, kemudian dituangkan ke dalam 500 ul buffer hibridisasi yang mengandung 1 ug 21-mer bersamaan dengan membran. Hibridisasi dilakukan pada suhu 45°C selama 48 jam. Selanjutnya membran dicuci di dalam oven hibridisasi pada suhu 65°C sebanyak 5x dalam 2x SSC, 0,01% SDS, dan 3x dalam 0,5x SSC, 0,01% SDS, 5 menit setiap kali pencucian. DNA yang terikat membran kemudian dielusi dalam 200 ul air mendidih selama 10 menit.

DNA hasil ilusi diamplifikasi dengan komposisi reaksi sbb.: 100 ng DNA ilusi, 1 unit *Taq* polymerase, 1x buffer PCR, 1,5 mM MgCl, 100 ng primer 21-mer, dan 200 uM dNTPs mix. PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan tahapan sbb.: denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, annealing pada suhu 59°C selama 1 menit dan elongasi pada suhu 72°C selama 2 menit. Amplikon kemudian diligasi ke vector pGEM®-T easy (Promega). Proses ligasi dilakukan pada suhu 4°C selama satu malam dengan komposisi reaksi sbb: 20 ng amplikon DNA ilusi, 1 ul pGEM®-T easy 50 ng, 1 ul T4 DNA ligase, 2 ul buffer ligasi 10x, dan deionized water.

Transformasi dilaksanakan menggunakan metode 'heat shock'. DNA hasil ligasi sebanyak 14,29 ul dimasukkan ke dalam tabung polypropilen dingin dan dicampur dengan 100 ul sel kompeten. Tabung kemudian dijentik-jentik perlahan agar tercampur, selanjutnya diinkubasi dalam es selama 20 menit. Tabung diberi kejutan panas dengan cara memasukkan ke dalam penangas air suhu 42°C selama 90 detik, kemudian secara cepat tabung dipindahkan ke dalam es selama 2 menit. Kemudian larutan ligan-sel kompeten di tambah 400 ul larutan SOB dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan agitasi 210 rpm selama 45 menit.

Sebanyak 100 ul kultur sel transforman di tuang ke dalam medium LB padat yang mengandung 1 ul ampicilin 100 mM/ml media, 2 ul IPTG 100 mM/15 ml media, dan 4 ul X-gal 50 mg/15 ml media. Permukaan medium kultur diratakan menggunakan bola-bola kaca steril, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Warna koloni biru diperjelas dengan menginkubasi kembali kultur pada suhu 4°C.

Koloni transforman tunggal warna putih diperbanyak dengan cara menginokulasikan ke dalam 5 ml LB cair yang ditambah 100 ug/ml ampisilin. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam dengan agitasi 210 rpm. Kultur koloni kemudian dipanen dengan centrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Isolasi plasmid selanjutnya mengikuti protokol *High Speed Plasmid Isolation Kit* dari *Geneaid*.

Sampel plasmid murni dengan konsentrasi 100 ng/ul di kirim untuk disekuensing ke penyedia jasa sekuensing (Macrogen-Korea dan 1st Base-Singapore). Sekuensing dilakukan satu arah (forward) dengan menggunakan primer T7 Promoter. Anotasi motif mikrosatelit dilaksanakan menggunakan program *Geneious ver 5.5.8.*(trial) dan *Phobos*. Motif mikrosatelit yang dipilih hanya yang memiliki panjang minimal 7 nukleotida.

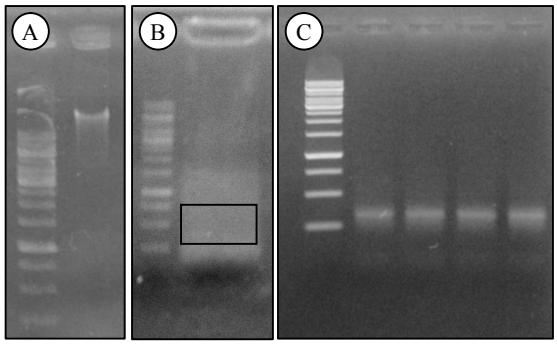
HASIL DAN PEMBAHASAN

Modifikasi protokol *Genomic DNA Mini Kit* dari Geneaid™ dapat menghasilkan DNA durian varietas Matahari dengan konsentrasi DNA 120 ng/ul dan rasio 1,84. Modifikasi dilakukan terhadap lama waktu inkubasi pada suhu 65°C dari 10 menit menjadi 180 menit dan pemberian PVP-40 sebanyak 10% dari bobot sampel kering. Durian merupakan jenis tanaman *mucilaginous,* berlendir karena banyak mengandung polisakarida. Hasil gerusan sampel daun durian berciri fisik kental dan sulit dilakukan pipeting. Pada isolasi menggunakan kit yang berbasis filter-column menyebabkan supernatan tidak dapat lolos melalui filter. Perpanjangan waktu inkubasi 180 menit mampu mendegradasi lendir sehinga supernatan menjadi encer dan memudahkan proses pipeting dan penyaringan menggunakan filter. Visualisasi hasil isolasi DNA dapat dilihat pada Gambar 1A.

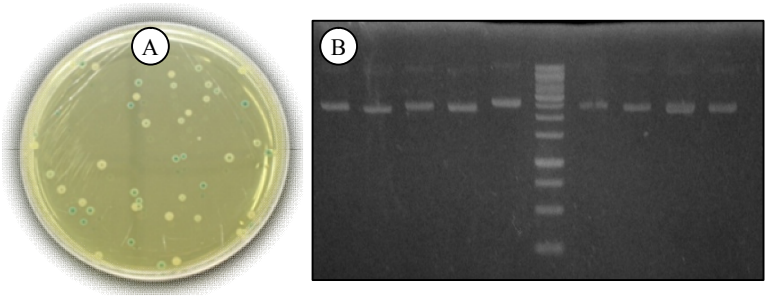
Pemotongan DNA genom menggunakan enzim restriksi *Hinc*II, *Alu*I dan *Rsa*I, menghasilkan fragmen yang panjangnya berkisar 100-1500 bp. Hasil diisolasi fragmen pada panjang 300-700 bp (Gambar 1B.) kemudian diligasi dengan adaptor *Mlu*I (21-/25-mer). Fragmen kemudian dihibridisasi dengan membran-oligo berbermotif mikrosatelit. Hasil PCR fragmen DNA hibridan ditampilkan pada Gambar 1C.

Amplikon kemudian diligasi ke vector pGEM®-T easy dan ditransformasi ke sel kompeten DH5α menggunakan metode '*heat shock*'. Koloni tunggal dipilih secara acak dari kultur transforman berwarna putih (Gambar 2A), setelah diperbanyak dalam LB cair kemudian dilakukan isolasi plasmid mengikuti protokol *High Speed Plasmid Isolation Kit* dari *Geneaid*™ (Gambar 2B). Sampel plasmid murni selanjutnya dilakukan sekuensing dan anotasi.

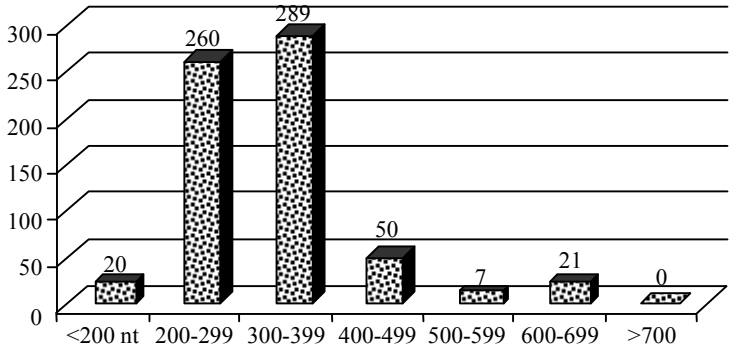
Sekuensing terhadap klon transforman positif diperoleh 647 DNA insert yang panjangnya bervariasi dari 151 sampai 669 nukleotida. Sebanyak 286 (44,2%) DNA insert berisi 366 motif SSR,



Gambar 1. Visualisasi elektroforesis. A = DNA genom durian var. Matahari, B = fragmen DNA hasil pemotongan menggunakan enzim restriksi *Hinc*II, *Alu*I dan *Rsa*I, dan C = hasil PCR hibridan.



Gambar 2. A = Kultur transforman untuk seleksi koloni tunggal, B = visualisasi elektroforesis hasil isolasi plasmid dari kultur koloni tunggal.



Gambar 3. Jumlah insert DNA berdasarkan panjang nukleotida.

yang berarti bahwa sebagian insert berisi lebih dari satu motif.

Hasil anotasi motif (Tabel 1.) menunjukkan bahwa dari 18 motif oligonukleotida yang digunakan dalam pengkayaan, diketahui ada 5 yang sesuai dengan motif yang berhasil diisolasi, yaitu A_n/T_n, G_n/C_n, AC_n, AG_n, dan TAG_n.

Diantara 366 motif yang ditemukan, 137 merupakan motif mononukleotida, 21 dinukleotida, 71 trinukleotida, dan 137 tetranukleotida. Secara umum motif yang ditemukan dari pustaka genom durian memiliki ukuran rangkaian nukleotida pendek (7-10 nt) yang mencapai 328 (89,6%). Ukuran yang lebih panjang bervariasi dari 11 sampai 89 nt sebanyak 38 motif (10,4%).

Pengelompokan tipe motif berdasarkan Sharma *et al.* (2007) diperoleh 242 motif berurutan sempurna, 140 motif tidak sempurna dan 2 motif campuran, serta tidak ditemukan motif campuran sempurna.

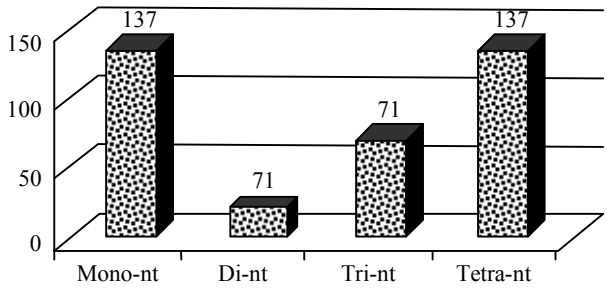
Motif yang paling banyak ditemukan adalah $(C)_7$, yaitu sebanyak 75 lokus, diikuti oleh (CTTT)2CT, $(CGCT)_2CG$, (AG) $(AAAG)_2$, $(TGC)_3$, $(A)_7$, $(G)_7$, dan $(A)_8$, masing-masing sebanyak 46, 36, 28, 16, 11, dan 11 motif. Sebagian besar motif ini diduga merupakan lokus sama yang berulang karena memiliki posisi potong yang umunya sama. Kegiatan lanjutan diperlukan untuk seleksi motif-motif yang berulang sehingga diperoleh motif yang spesifik dan merancang primer spesifik.

Tabel 1. Anotasi motif mikrosatelit yang diisolasi dari pustaka genom durian var. Matahari.

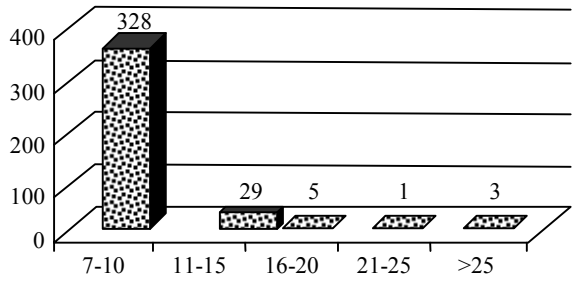
Motif	Panjang	Σ Lokus	Tipe	Motif	Panjang	Σ Lokus	Tipe

$(A)_7$	7	11	S	$(CGG)_2GG(CGG)_2$	14		TS
$(A)_8$	8	8	S	$(CGGG)_2(CG)_2(CGGG)CG$	18	1	TS
$(A)_9$	9	1	S	$(CT)_4$	8	3	S
$(A)_{10}$	10	1	S	$(CTG)_3C$	10	2	TS
$(A)_{12}$	12	2	S	$(CTTT)_2CT$	10	46	TS
$(ACA)_3$	9	3	S	$(GAA)_3G$	10	4	TS
$(AC)_4$	8	2	S	$(GAGT)_2GA$	10	2	TS
$(ACC)_3$	9	3	S	$(GCA)_3$	9	1	S
$(ACT)_3$	9	5	S	$(GCAT)_2GCA$	11	1	TS
$(AG)(AAAG)_2$	10	28	TS	$GCG(GC)_2(CGG)_4CG$	21	1	TS
$(AG)_4$	8	3	S	$G(CGG)_4$	13	1	TS
$(AG)_4(A)$	9	4	TS	$(GGAT)_2GGA$	11	1	TS
$(AG)_5$	10	1	S	$(GGC)_3GG$	11	2	TS
$(AGT)_3$	9	2	S	$(GGCT)_2GG$	10	1	TS
$(AGT)_3(A)$	10	1	TS	$(G)_7$	7	11	S
$(ATAC)_2(AT)$	10	1	TS	$(G)_7C(G)_5$	13	1	TS
$(ATG)_3$	9	2	S	$(G)_8$	8	5	S
$(ATT)_3$	9	1	S	$(G)_9$	9	2	S
$(CAA)_3$	9	1	S	$(G)_{10}$	10	1	S
$(CAAT)_2(CA)$	10	1	TS	$(GGGT)_2GG$	10	1	TS
$(CA)_4$	8	2	S	$(GGTC)_2GG$	10	1	TS
$(CA)_4(C)$	9	1	TS	$(GTA)_3GT$	11	2	TS
$(CAC)_3C$	13	1	TS	$(GTTA)_2GT$	10	1	TS
$C(ACCC)_2CCC(ACCC)$	16	1	TS	$(TAG)_4$	12	1	S
$(CAG)_3CAA(CAG)CAA(CAG)_9(CAA)_3$	89	2	CTS	$(TAG)_4T$	13	1	TS
$(CAG)_5(CAA)_2(CAG)_2CAA(CAG)CA$				$(TA)_4$	8	3	S
$C(AGCC)_2AG$	11	1	TS	$(TCTA)_2TC$	10	1	TS
$C(ATCC)_2A$	10	1	TS	$(TCT)_3$	9	1	S
$(CCA)_3$	9	1	S	$T(CTT)_3$	10	1	TS
$(CCAT)_2CC$	10	1	TS	$(TCTT)_2TC$	10	1	TS
$(C)_7$	7	75	S	$(TGC)_3$	9	16	S
$(C)_8$	8	5	S	$(TGC)_3TG$	11	1	TS
$(C)_{11}$	11	1	S	$(TGG)_3$	9	3	S
$(C)_{13}$	13	1	S	$(TGG)_4TG$	14	3	TS
$(CCGA)_2CC$	10	1	TS	$(TGG)_5$	15	1	S
$(CCG)_3$	9	1	S	$(TGG)_6$	18	2	S
$(CCGG)_2CCG$	11	1	TS	$(TG)_5CG(TG)_5CG(TG)_7$	38	1	TS
$(CCGG)_3$	8	1	S	$(TTG)_3$	9	1	S
$(CCT)_3$	9	1	S	$(TTTC)_2TT$	10	1	TS
$(CCTT)_3$	12	2	S	$(T)_7$	7	5	S
$(CGAG)_2CG$	10	4	TS	$(T)_8$	8	3	S
$(CG)_4C$	9	1	TS	$(T)_{12}$	12	4	S
$(CGCT)_2CG$	10	36	TS	$(T)_{16}$	16	1	S
$(CGG)_3CG$	11	1	TS	Jumlah		366	

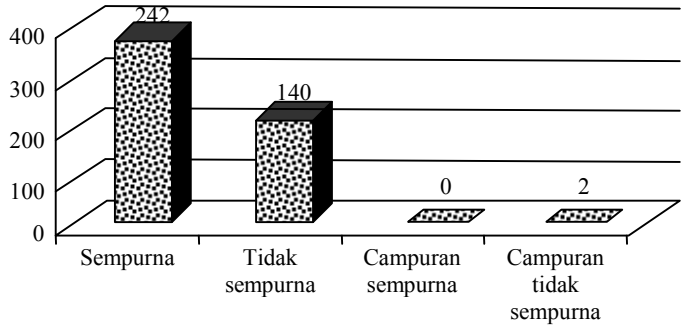
S = sempurna, TS = tidak sempurna, CTS = campuran tidak sempurna.



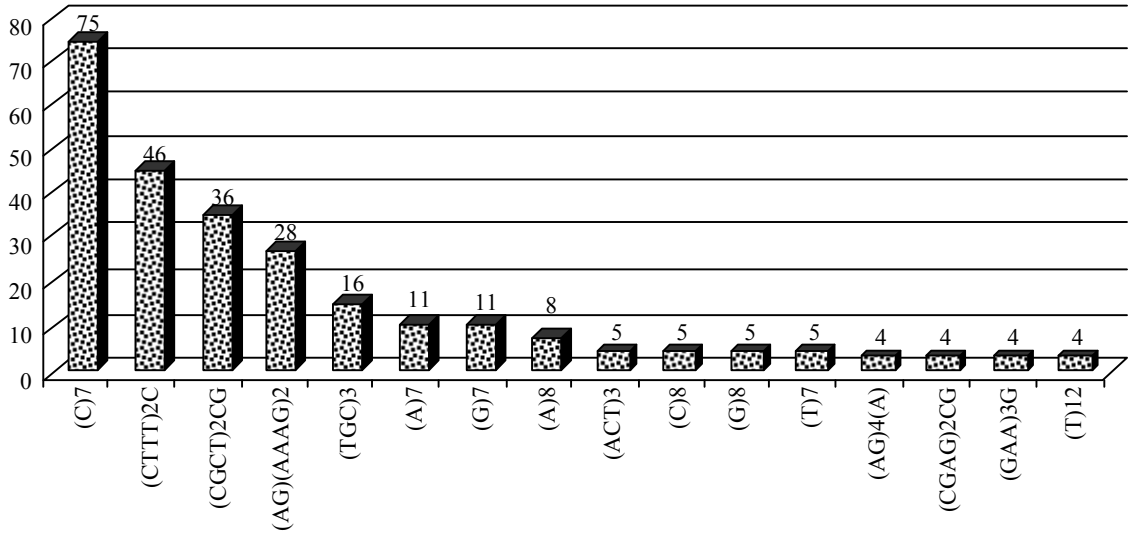
Gambar 4. Frekuensi motif berdasarkan tipe pengulangan.



Gambar 5. Frekuensi motif berdasarkan panjang nukleotida pengulangan.



Gambar 6. Pengelompokan motif berdasarkan kesempurnaan pengulangan.



Gambar 7. Motif SSR yang banyak ditemukan di pustaka genom durian.

KESIMPULAN

Telah diperoleh 366 motif SSR dari 286 DNA insert, yang terdiri atas 137 motif mononukleotida, 21 dinukleotida, 71 trinukleotida, dan 137 tetranukleotida. Sebanyak 5 motif yaitu A_n/T_n, G_n/C_n, AC_n, AG_n, dan TAG_n sesuai dengan oligonukleotida pengkayaan. Secara umum motif yang ditemukan berukuran pendek (7-10 nt) yang mencapai 328 (89,6%), yang lebih panjang berukuran 11 sampai 89 nt sebanyak 38 motif (10,4%). Motif yang bertipe sempurna sebanyak 242 motif, tidak sempurna 140 motif, dan campuran sebanyak 2 motif. Motif yang paling banyak diperoleh adalah $(C)_7$ sebanyak 75 lokus diikuti oleh (CTTT)2CT, $(CGCT)_2CG$, $(AG)(AAAG)_2$, $(TGC)_3$, $(A)_7$, $(G)_7$,

dan $(A)_8$ masing-masing sebanyak 46, 36, 28, 16, 11, dan 5 lokus, sisanya bervariasi dari 1 sampai 5 lokus. Kegiatan lanjutan diperlukan untuk seleksi motif dan merancang primer spesifik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Tati Kristianti, MSi atas bantuan teknis yang telah diberikan. Penelitian ini dibiayai oleh KKP3T Badan Litbang Kementrian Pertanian TA 2012 Nomor: 1159/LB.620/I.1/3/2012 dan Riset Inovatif KK-ITB TA 2012 Nomor: 262/I1.C02/PL/2012.

DAFTAR PUSTAKA

Billotte, N., N. Marseillac, A.M. Risterucci, B. Adon, P. Brottier, F.C. Baurens, R. Singh, A. Herra´n, H. Asmady, C. Billot, P. Amblard, T. Durand-Gasselin, B. Courtois, D. Asmono, S.C. Cheah, W. Rohde, E. Ritter, and A. Charrier. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theor Appl Genet. 110:754-765.

Brown, M.J. 1997. Durio-A Bibliographic Review. (R.K. Arora, V.R. Rao and A.N. Rao, eds.). IPGRI office for South Asia, New Delhi. 188 hal.

Edwards, K.J., J.H.A. Baker, A. Daly, C. Jones, and A. KaRp 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellites sequences in plant. BioTechniques. 20:759-760.

Indriyani, N.L.P., P.J. Santoso, dan C. Hermanto. 2012. Pembentukan populasi pemuliaan durian (*Durio* sp.) melalui persilangan *intra* dan *inter-species*. Seminar Nasional PERIPI, 6-7 November 2012 di IPB International Convention Center, Bogor (Submitted).

Kementerian Pertanian. 2012. Basis Data Statistik Pertanian http://aplikasi.deptan.go.id/bdsp/hasil_kom.asp. Diakses tanggal 31 Juli 2012.

Lim, T.K. 1990. Durian diseases and disorders. Art Printing Works Sdn. Bhd. Malaysia. 95 p.

Liu, S., R.G. Cantrell, J.C. McCarty Jr, and J. McD Stewart. 2000. Simple sequence repeat based assessment of genetic diversity in cotton race stock accession. *Crop Sc*i. 40:1459-1469.

Nanthachai, S. 1994. Durian: fruit development, post-harvest physiology, handling and marketing in ASEAN. ASEAN Food Handling Bureau. 156 hal.

Ottewell, K.M., Donnellan, S.C., Moran, G.F.,Paton, D.C. 2005. " Multiplexed microsatellite markers for the genetic analysis of Eucalyptus leucoxylon (Myrtaceae) and their utility for ecological and breeding studies in other Eucalyptus species". Journal of Heredity. 96: 445-451

Pancoro, A., T. Hidayat, P.J. Santoso, dan Rebin. 2009. Identifikasi Zuriat F1 Hasil Persilangan Ar 143 X Varietas Mangga Merah Menggunakan Penanda Molekuler Mikrosatelit. Laporan Hasil Kegiatan Penelitian Kerjasama KKP3T. 48 hal.

Ritschel, P.S., T.C.L. Lins, R.L. Tristan, G.S.C. Buso, J.A. Buso, and M.E. Ferreira. 2004. "Development of m,icrosatellite markers from an anchored genomics library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.)". BMC Plant Biology 4:9.

Santoso, P.J., M. Novaril, A.S. Jawal, T. Wahyudi, dan A. Hasyim. 2008. Idiotipe Durian Nasional Berdasarkan Preferensi Konsumen. Jurnal Hortikultura. 18(4):395-401.

Santoso, P.J., F. Nasution. 2009. Current status and expectation of grower and vendor to durian type.(unpublish).

Schuelke. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology. 18:233-234.

Sharma, P.C., A. Grover, and G. Kahl. 2007. Mining microsatellites in eucariotic genomes. Trends in Biotechnology. 25(11): 490-498.

Singh, R., J. Nagappan, S.G. Tan, J.M. Panandam, and S.C. Cheah. 2007. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for oil palm and their application in genetic mapping and fingerprinting of tissue culture clones. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 15(3):121-131.