

Analisis Pola DNA Planlet Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz.) Hasil *Induced Resistance* Terhadap *Fusarium Oxysporum*

Endang Nurcahyani*, Bambang Irawan, Sumardi, Evi Yunita Sari, Tika Lidia Sari

Program Pascasarjana, Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, Bandar Lampung 35145

*email korespondensi: endang_nurcahyani@yahoo.com

Abstract. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) is one source of carbohydrates, and is widely used for food, as well as industrial raw materials. In Indonesia, cassava is the second largest food crop production after rice. Lampung is the largest cassava producing province in Indonesia. *Fusarium oxysporum* (Fo) fungi cause wilt disease in plants, one of them is cassava, so it is necessary to control biological disease by using superior varieties that are resistant to Fo. Fusaric acid (AF) is a toxin produced by Fo fungi and is widely used in *in vitro* selection of plants. Disease resistance can be obtained by *Induced Resistance*. The objectives of this study were (1) to know and analyze the specific expression characteristics of plantlets including analysis of total dissolved carbohydrate content, (2) to analyze the pattern of DNA bands of cassava plantlets produced by induced resistance to *Fusarium oxysporum* compared to controls. This study used a completely randomized design (CRD) of one factor, namely the concentration of AF, consisting of 5 levels: 0 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, and 80 ppm in the Murashige and Skoog (MS) medium. Quantitative data from each parameter was analyzed using Analysis of Variance, with a real level of 5%. The results showed (1) an increase in total dissolved carbohydrate content with increasing concentration of AF, (2) The presence of new (specific) DNA bands in cassava plantlets which were resistant to Fo, with sizes of 550 bp (OPA_1) it can be predicted as a Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) marker candidate for the resistance of a cassava plant against Fo.

Keywords: carbohydrates, cassava, DNA pattern, *Fusarium oxysporum*, *in vitro*

Abstrak. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) merupakan salah satu sumber karbohidrat, dan banyak dimanfaatkan untuk bahan pangan, serta bahan baku industri. Di Indonesia, cassava merupakan produksi hasil pertanian pangan terbesar kedua setelah padi. Lampung merupakan provinsi penghasil Cassava (Ubi kayu) terbesar di Indonesia. Jamur *Fusarium oxysporum* (Fo) menyebabkan penyakit layu pada tanaman, salah satunya pada cassava, sehingga perlu adanya pengendalian penyakit secara hayati dengan menggunakan varietas unggul yang tahan terhadap Fo. Asam fusarat (AF) adalah toksin yang dihasilkan oleh jamur Fo dan banyak digunakan pada seleksi *in vitro* pada tanaman. Ketahanan terhadap penyakit dapat diperoleh dengan cara pengimbasan ketahanan. Tujuan penelitian ini adalah (1) mengetahui dan menganalisis karakter ekspresi spesifik planlet meliputi analisis kandungan karbohidrat terlarut total, (2) menganalisis pola pita DNA planlet cassava hasil *induced resistance* terhadap *Fusarium oxysporum* dibandingkan kontrol. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor, yaitu konsentrasi AF, terdiri dari 5 taraf: 0 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm pada medium *Murashige and Skoog* (MS). Data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance*, dengan taraf nyata 5%. Hasil penelitian menunjukkan (1) terdapat peningkatan kandungan karbohidrat terlarut total seiring dengan peningkatan konsentrasi AF, (2) terdapat pita DNA baru (spesifik) pada planlet cassava yang tahan terhadap Fo, dengan ukuran 550 bp (OPA_1) dapat diprediksi sebagai kandidat marker *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) untuk ketahanan planlet cassava terhadap Fo.

Kata kunci: cassava, *Fusarium oxysporum*, *in vitro*, karbohidrat, pola DNA

1. Pendahuluan

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) merupakan tanaman terpenting ketiga di dunia dan sumber makanan pokok yang penting, serta sumber pendapatan di seluruh daerah tropis. Budidaya Cassava bisa menjadi mata pencaharian bagi lebih dari 500 juta petani [1]. Cassava merupakan komoditas pangan penting di Indonesia, dan ke depan komoditas ini akan semakin strategis peranannya bagi kehidupan masyarakat dan perekonomian negara. Berdasarkan areal panen komoditas pangan, cassava menduduki urutan ke tiga setelah padi dan jagung, yang ketiganya sebagai sumber karbohidrat utama masyarakat [2].

Badan Pusat Statistik (BPS) mencatat bahwa produksi cassava sejak tahun 1993 sampai dengan tahun 2015, Provinsi Lampung, merupakan yang paling besar pada tiap tahunnya dibandingkan dengan Provinsi lain di Indonesia. Tercatat bahwa produksi cassava di Provinsi Lampung pada tahun 2015 sebanyak 7.387.084 ton [3], namun demikian masih banyak kendala produksi dalam pembudidayaan cassava yang sering dialami oleh petani, antara lain penyakit layu *Fusarium*, yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) yang sampai saat ini masih belum dapat diatasi secara efektif. Sejauh ini dalam pengendaliannya petani masih menggunakan fungisida, sedangkan fungisida itu sendiri memiliki dampak negatif yaitu dapat merusak lingkungan, sehingga perlu adanya pengendalian secara hayati [4]. Cara alternatif yang dapat dilakukan dalam pengendalian penyakit dan tidak menimbulkan dampak negatif, seperti halnya dalam penggunaan fungisida yaitu dengan menggunakan varietas unggul yang

tahan terhadap *Fusarium oxysporum* [5]. Penggunaan komponen penyeleksi pada medium kultur *in vitro* seperti asam fusarat dapat menyebabkan tanaman memiliki sifat yang lebih terarah sesuai dengan yang diinginkan, sehingga lebih efektif dan efisien dalam menangani penyakit, seperti penyakit layu *Fusarium* [6].

Asam fusarat merupakan metabolit yang dihasilkan oleh beberapa spesies jamur dari genus *Fusarium* [7]. Ketahanan terhadap penyakit dapat diperoleh dengan cara pengimbasan ketahanan, yaitu perlakuan sebelum infeksi patogen dengan senyawa kimia maupun dengan inokulasi mikroorganisme nonpatogenik. Perlakuan ini dinamakan ketahanan terimbas atau *induced resistance* [8].

Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan *mutant* yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen [9]. Identifikasi mutan atau varian yang insensitif terhadap AF dengan seleksi *in vitro* pernah dilakukan pada tanaman Vanili [5], [10]–[12] dan anggrek tanah *Sphatoglottis plicata* [13,14]. Hasil penelitian para peneliti tersebut menunjukkan bahwa somaklonal dari hasil regenerasi *massa* sel yang tahan terhadap asam fusarat tersebut juga tahan terhadap patogen.

Tiga tipe marka DNA adalah: (1) marka yang berdasarkan pada hibridisasi DNA seperti *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP); (2) marka yang berdasarkan pada reaksi rantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) dengan menggunakan sekuen-sekuen nukleotida sebagai primer, seperti *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), dan *Amplified Fragment*

Length Polymorphism (AFLP); dan (3) marka yang berdasarkan pada PCR dengan menggunakan primer yang menggabungkan sekuen komplementer spesifik dalam DNA sasaran, seperti *Sequence Tagged Sites* (STS), *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCARs), *Simple Sequence Repets* (SSRs) atau mikrosatelit (*microsatellites*), dan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) [15, 16].

Prinsip kerja marka RAPD adalah berdasarkan perbedaan amplifikasi PCR pada sampel DNA dari sekuen oligonukleotida pendek yang secara genetik merupakan kelompok marka dominan [17,18]. Primer RAPD bersifat random dengan ukuran panjang biasanya 10 nukleotida. Jumlah produk amplifikasi PCR berhubungan langsung dengan jumlah dan orientasi sekuen yang komplementer terhadap primer di dalam genom tanaman [16, 19].

2. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai Oktober 2018 di Laboratorium Botani (ruang penelitian **Kultur Jaringan Tumbuhan**), Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF), cawan petri berdiameter 10 cm, botol kultur berukuran 250 ml, gelas ukur bervolume 100 ml dan 500 ml, pinset, alumunium foil, *autoclave*, *scalpel*, mata pisau *scalpel*, mikropipet, pipet tip, spektrofotometri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, timbangan analitik Ohaus, *waterbath*, *microwave*, *hot plate*, *petridish*, tissue, kertas label, dan kamera. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu planlet Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) kultivar adira-1, asam fusarat

murni yang diproduksi oleh *Sigma chemical Co.* {*Fusaric acid* (5-*butylpicolinic acid*) from *Giberella fujikuroi*}, alkohol 70%, sukrosa, Kalium Hidroksida (KOH), akuades, *Benzine Amino Purine* (BAP), *Indole-3-Acetic Acid* (IAA), Asam Chlorida (HCl), asam sulfat (H₂SO₄), serta bahan kimia medium *Murashige & Skoog* (MS) padat, *buffer* TBE, agarose, akuabides, kloroform, *buffer* TE.

Isolasi DNA planlet cassava

Tahapan isolasi DNA meliputi penggerusan sampel, ekstraksi, pengendapan, pencucian, dan pelarutan DNA. Jenis reagen yang digunakan dengan kit *Nucleon Phytopure* RPN-8511 [20] terdiri dari *Phytopure* I, *Phytopure* II dan resin *Phytopure*.

Daun planlet Cassava dipotong menjadi bagian-bagian kecil dengan *scalpel* steril, lalu ditimbang seberat 0,1 g. Sampel daun kemudian digerus dengan mortal dan *pestle*, ditambahkan 500 µL reagen *Phytopure* I sambil digerus sampai lembut, kemudian dimasukkan di dalam *tube* 1,5 mL. Setelah itu ditambahkan reagen *phytopure* II sebanyak 150 µL ke dalam sampel dan dikocok perlahan-lahan (digoyang dengan tangan). Sampel lalu diinkubasi pada suhu 65 °C di atas *waterbath* selama 10 menit, selanjutnya diletakkan di dalam *ice box* selama 20 menit, kemudian dimasukkan 400 µL kloroform dingin dan 20 µL resin *Phytopure* ke dalam sampel. Sampel lalu di *sentrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, supernatan dipindah ke *tube* ukuran 1,5 mL. *Isopropanol* dingin ditambahkan dengan volume yang sama dengan volume supernatan dan dihomogenkan perlahan-lahan. Kemudian sampel di *sentrifuge* kembali dengan kecepatan

10.000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan pelet DNA yang berwarna putih selanjutnya dicuci dengan menambahkan 50 µL alkohol 70% dan di *sentrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Pencucian dengan alkohol 70% tersebut diulang 3 kali. Sisa-sisa alkohol 70% dibuang, kemudian pelet DNA dibiarkan mengering. Pelet DNA setelah kering kemudian ditambahkan *buffer* TE 50 µL sampai larut lalu disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C.

Pengujian kualitas dan kuantitas DNA hasil isolasi

Sampel DNA sebelum digunakan dalam reaksi PCR, dilakukan pengujian kualitas dan konsentrasinya dengan menggunakan *GeneQuant* (*Life Science, Ltd., UK*). Sebanyak 2 µL sampel DNA hasil isolasi, dimasukkan ke dalam kuvet berisi 1998 µL akuabides steril dan dikocok dengan perlahan-lahan hingga homogen. Konsentrasi DNA sampel dibaca pada spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Rasio konsentrasi DNA sampel pada masing-masing panjang gelombang digunakan sebagai ukuran kualitas DNA. Menurut [21], DNA berkualitas baik bila memiliki nilai rasio $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$.

Analisis pola DNA planlet Cassava dengan metode RAPD

Untuk analisis PCR, disiapkan DNA *template* yang telah dilarutkan dalam TE, *ice box*, dan primer OPA_1, lalu dibuat premix PCR dengan komposisi: kit KAPPA2G *Fast Ready Mix* sebanyak 12,5 µL, primer 2,5 µL pada konsentrasi 100 µM, DNA *template* 1,0 µL pada konsentrasi 40 ng/µL, dan H₂O sebanyak 9,0 µL, sehingga volume totalnya adalah 25,00 µL, selanjutnya premix diamplifikasi dengan mesin PCR (*GeneAmp 2400*). Kondisi reaksi untuk pelaksanaan proses PCR-RAPD mengikuti metode [15] yang dimodifikasi (**Tabel 1**).

Elektroforesis

Dibuat 500 mL *buffer* TBE1x dengan cara diambil 50 mL larutan *buffer* TBE10x, kemudian diencerkan pada gelas ukur 500 mL dengan ditambahkan akuades sampai tanda 500 mL lalu dihomogenkan. Minigel agarose 1,5 % (g/v) dibuat dengan cara 1,5 g *agarose* dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan 100 mL TBE1x lalu dihomogenkan, kemudian dipanaskan menggunakan *microwave* ($t = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$; ± 2 menit) sampai semua larut, ditandai dengan larutan tampak jernih. Larutan selanjutnya didinginkan sampai suhu lebih kurang 50-55 °C, lalu ditambahkan *good view* sebanyak 5 µL.

Tabel 1. Kondisi Reaksi PCR-RAPD

Reaksi	Temperatur (°C)	Waktu (detik)	} Siklus : 45 x
Pre-denaturasi	95	180	
Denaturasi	95	15	
<i>Annealing</i>	36	15	
Elongasi	72	30	
Post-elongasi	72	420	

Agarose cair tersebut dituangkan ke dalam *glassplate* dengan sisir tegak lurus. Gel ditunggu sampai menjendal selama \pm 30 menit dan setelah dingin sisir diangkat, selanjutnya, sampel DNA sebanyak 25 μ L (hasil *running PCR*) dipipet dan dimasukkan ke dalam sumuran yang terdapat dalam gel tersebut dengan menggunakan mikropipet. Sebanyak 10 μ L DNA *marker* selanjutnya dimasukkan pada sumuran di ujung kiri gel. Gel kemudian dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi *buffer* TBE 1% (v/v), selanjutnya *dirunning* pada tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor, yaitu asam fusarut yang dibagi atas 5 taraf konsentrasi, yaitu 0 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm. Masing-masing dari konsentrasi tersebut dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali, dan pada setiap ulangan terdiri atas 2 planlet cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) dalam setiap botol kultur. Data yang diperoleh dari pertumbuhan planlet *P. amabilis* selama seleksi dengan AF berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan di dukung foto. Data kuantitatif ditabulasi dengan faktor konsentrasi yang berbeda dan ulangan 5 eksplan per perlakuan.

3. Hasil dan Pembahasan

Untuk analisis pola DNA, secara acak diambil masing-masing 1 sampel planlet cassava perlakuan AF 20, 40, 60 dan 80 ppm, serta kontrol sehingga diperoleh 5 sampel, selanjutnya,

masing-masing sampel diamplifikasi dengan RAPD-PCR dan hasilnya dianalisis secara visual.

Kualitas dan kuantitas DNA Cassava

Isolasi total genom DNA daun planlet cassava hasil pengimbasan AF pada konsentrasi 20, 40, 60, 80 ppm dan tidak diimbas dengan AF (kontrol) telah dilakukan untuk sejumlah sampel acak, dengan menggunakan kit *Nucleon Phytopure* RPN-8511. Kuantitas dan kualitas DNA diukur dengan menggunakan spektrofotometer *Beckman DU-65*.

Metode RAPD dikembangkan berdasarkan PCR, yang mempunyai kelebihan antara lain membutuhkan kuantitas DNA yang relatif lebih sedikit 0,5-50,0 ng menurut [20]. Minoo *et. al.* [21], Nurcahyani dkk. [10] [12] menggunakan konsentrasi DNA *template* sebesar 20, dan 40 ng/ μ L dalam amplifikasi PCR tanaman vanili. Pada penelitian ini, konsentrasi DNA dari semua sampel planlet cassava untuk *template* dalam reaksi PCR diseragamkan kira-kira sebesar 40 ng/ μ L dengan pengenceran.

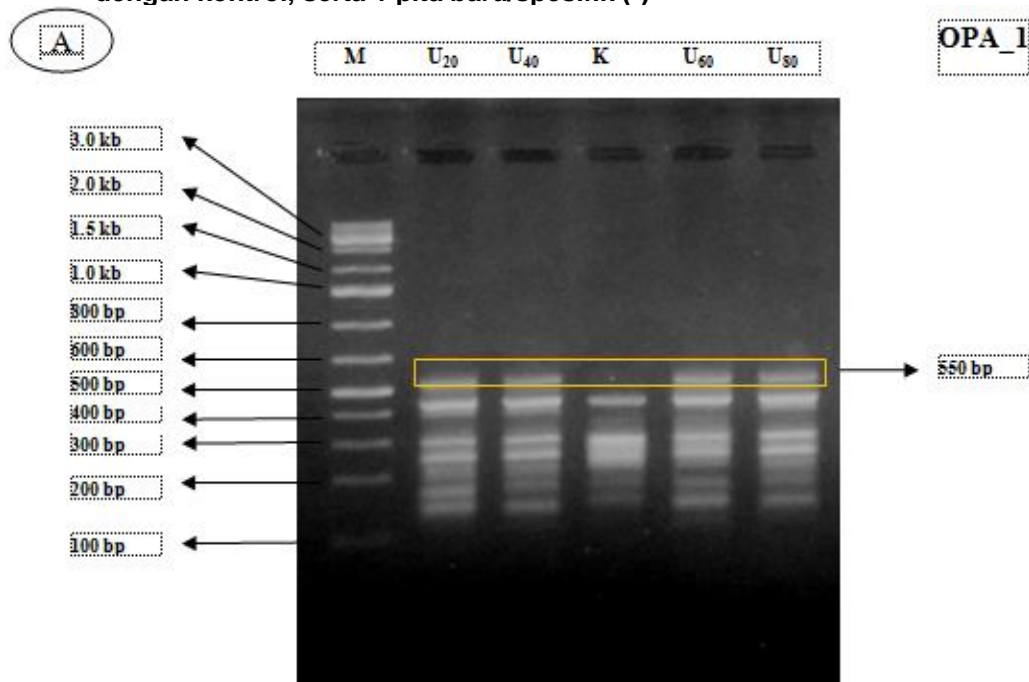
Analisis pita RAPD

Elektroforesis hasil amplifikasi PCR-RAPD dengan Primer OPA_1 menghasilkan 2 pola pita DNA. Pola pita DNA planlet cassava yang tidak diimbas (kontrol) maupun diimbas AF (konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm) pada masing-masing primer disajikan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Pola pita DNA planlet cassava yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas asam fusarat (20, 40, 60, dan 80 ppm) dengan primer OPA_1

Pola pita DNA-1		Pola pita DNA-2	
Sampel	Ukuran DNA (bp)	Sampel	Ukuran DNA (bp)
K	120	U ₂₀ , U ₄₀ , U ₆₀ , dan U ₈₀	120
	140		140
	180		180
	200		200
	230		230
	250		250
	300		300
	400		400
			550*

Keterangan: Pola pita DNA-1: K (kontrol) menghasilkan 8 pita yang identik; Pola pita DNA-2: U₂₀, U₄₀, U₆₀, dan U₈₀ menghasilkan 10 pita yang identik, dan 9 diantaranya sama dengan kontrol, serta 1 pita baru/spesifik (*)



Gambar 1. Pola pita DNA cassava. Pola pita DNA planlet cassava dengan primer OPA_1, menghasilkan pita baru (spesifik) 550 bp.

Pada Tabel 2. menunjukkan bahwa pita DNA ukuran 120, 140, 180, 200, 230, 20, 300, dan 400 bp terbentuk pada semua sampel, baik pada planlet kontrol maupun yang diimbas AF. Pada planlet yang diimbas AF (konsentrasi 20,40, 60, dan 80 bp) terdapat pita DNA baru (spesifik) dengan ukuran 550 bp. Jadi terdapat pita baru yang muncul

pada planlet cassava yang diimbas AF semua konsentrasi.

Penner [22] menyatakan bahwa RAPD pada dasarnya memanfaatkan perbedaan pola amplifikasi PCR yang disebabkan oleh perbedaan posisi menempelnya primer pada genom dari individu yang berbeda. Terjadinya perbedaan pola pita tersebut karena

adanya proses amplifikasi untai DNA pada posisi tertentu. Berdasarkan 2 pola pita DNA yang terbentuk, didapatkan 1 pita DNA baru (spesifik) yaitu 550 bp (primer OPA_1). Pita DNA spesifik tersebut dapat dijadikan sebagai karakter untuk mengelompokkan dan memisahkan planlet cassava yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas AF (konsentrasi 20, 40, 60, 80 ppm). Tampilan pola pita DNA dan pita baru spesifik disajikan pada **Gambar 1**.

Hasil amplifikasi DNA planlet cassava dengan menggunakan primer OPA_1, menunjukkan bahwa pola pita DNA planlet cassava yang tidak diimbas AF (kontrol) berbeda dengan pola pita DNA planlet yang diimbas AF (konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm) (Gambar 1). Planlet cassava yang diimbas AF baik konsentrasi 20, 40, 60, maupun 80 ppm menghasilkan 1 pita DNA yang berbeda ukurannya dengan planlet kontrol, yaitu pita DNA berukuran 550 bp (OPA_1) sehingga pita DNA ini dapat dijadikan sebagai pembeda antara planlet cassava kontrol dan planlet cassava yang diimbas AF (konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm). Pita DNA ini dinamakan sebagai penanda RAPD OPA_1₅₅₀.

Penelitian yang dilakukan oleh Esmail *et. al.* [23], menyatakan bahwa penanda RAPD dapat digunakan untuk membedakan planlet Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* dan planlet yang sensitif terhadap jamur tersebut secara *in vitro*.

Berdasarkan uraian di atas, dapat dinyatakan bahwa planlet cassava kontrol (rentan) secara genetik berbeda dengan planlet cassava yang diimbas AF pada konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm (moderat dan tahan) terhadap *Fo*, penyebab penyakit layu fusarium.

Semua *template* DNA cassava yang diuji, ternyata dapat diamplifikasi dengan primer OPA_1. Hasil amplifikasi DNA PCR menunjukkan bahwa planlet cassava yang moderat dan tahan pada AF 40, 60, dan 80 ppm terbentuk pita DNA baru, yang artinya telah terjadi variasi genetik, dan adanya mutasi gen. Pita-pita spesifik ini sebagai indikasi identifikasi kultivar baru planlet cassava tahan *Fo*, dengan demikian, pita DNA dengan ukuran 550 bp (OPA_1), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet cassava terhadap *Fo*, sehingga dapat dikatakan munculnya pola pita DNA baru menandakan bahwa planlet cassava yang telah diimbas dengan asam fusarat dengan berbagai konsentrasi sebagai planlet yang tahan terhadap penyakit layu *fusarium* yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum*.

4. Kesimpulan

Pita DNA spesifik dengan ukuran 550 bp (OPA_1), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet cassava terhadap *Fusarium oxysporum*. Pita DNA ini dinamakan sebagai penanda RAPD OPA_1₅₅₀.

5. Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada LPPM Universitas Lampung, yang telah memberikan dana dalam Skim: Hibah "Penelitian Pascasarjana Universitas Lampung, Tahun anggaran 2018, berdasarkan Surat Penugasan Penelitian Pascasarjana Nomor Kontrak: 1344/UN26.21/PN/2018 Tanggal 25 Juni 2018.

6. Daftar Pustaka

- [1] S. K. Amponsah *et al.*, "Mechanical Cassava Harvesting As Influenced by Seedbed Preparation and Cassava Variety," *Am. Soc. Agric. Biol. Eng.*, vol. 30, no. 3, pp. 391–403, 2014.
- [2] M. Fauzi, E. H. Kardhinata, and L. A. Putri, "Identifikasi dan Inventarisasi Genotip Tanaman Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) di Kabupaten Serdang Bedagai Sumatera Utara," *J. Online Agroteknologi*, vol. 3, no. 3, pp. 1082–1088, 2015.
- [3] Anonymous, "Produksi Ubi Kayu," <https://www.bps.go.id/>, 2015. .
- [4] Soelistijono, "Kajian Efektifitas Rhizoctonia sp Mikoriza Dataran Rendah dan Sedang pada Tingkat Keparahan Penyakit (Dsi) Anggrek Phalaenopsis Amabilis Terhadap *Fusarium* sp.," *Biosaintifika*, vol. 7, no. 2, 2015.
- [5] E. Nurcahyani, I. Sumardi, B. Hadisutrisno, and E. Suharyanto, "Penekanan Perkembangan Penyakit Busuk Batang Vanili (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) Melalui Seleksi Asam Fusarat Secara In Vitro," *J. Hama dan Penyakit Tumbuh. Trop.*, vol. 12, no. 1, pp. 12–22, 2012.
- [6] F. Damayanti, "Peningkatan Ketahanan Pisang Kepok (*Musa Paradisiaca* L) Hasil Kultur Jaringan Terhadap Penyakit Layu *Fusarium* Melalui Seleksi Asam Fusarat," *J. Ilm. Fakor Exacta*, vol. 3, no. 4, pp. 310–319, 2010.
- [7] B. Landa, J. . Cachinero-Diaz, P. Lemanceu, R. Jimenez-Diaz, and C. Alabouvette, "Effect of Fusaric Acid and Phytoanticipins on Growth of Rhizobacteria and *Fusarium Oxysporum*," *Can. J. Microbiol.*, vol. 48, pp. 971–985, 2002.
- [8] C. Sumardiyono, S. Suharyanto, and C. Rositasari, "Deteksi Pengimbasan Ketahanan Pisang Terhadap Penyakit Layu *Fusarium* Dengan Asam Fusarat," *J. Perlindungan Tanam. Indones.*, vol. 19, no. 1, pp. 40–44, 2015.
- [9] M. Arai and M. Takeuchi, "Influence Of *Fusarium* With Toxin(S) On Camation Cell," *Plant Cells, Tissue, Organ Cult.*, vol. 34, pp. 287–293, 1993.
- [10] E. Nurcahyani, "Karakterisasi Planlet Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Hasil Seleksi Asam Fusarat Secara In Vitro Terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vanillae*," Universitas Gadjah Mada, 2013.
- [11] E. Nurcahyani, B. Hadisutrisno, I. Sumardi, and E. Suharyanto, "Identifikasi Galur Planlet Vanili (*Vanilla Planifolia* Andrews) Resisten Terhadap Infeksi *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Vanillae* Hasil Seleksi In Vitro Dengan Asam Fusarat," *Pros. Semin. Nas. "Pengendalian Penyakit Pada Tanam. Pertan. Ramah Lingkungan*," pp. 272–279, 2014.
- [12] E. Nurcahyani, I. Sumardi, B. Hadisutrisno, and E. Suharyanto, "DNA Pattern Analysis Of *Vanilla Planifolia* Andrews Plantlet Which Resistant To *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Vanillae*," *WJPLS*, vol. 3, no. 4, pp. 27–34, 2017.
- [13] E. Nurcahyani, R. Agustrina, and T. T. Handayani, "The Protein Profile of the Plantlets of *Spathoglottis plicata* Bl. Induced Resistance to *Fusarium Oxysporum*," *J. Plant Sci.*, vol. 4,

- no. 5, pp. 102–105, 2016.
- [14] E. Nurcahyani, R. Agustina, E. Suroso, and G. Andari, "Analysis of Peroxidase Enzyme and Total Phenol from Ground Orchid (*Spathoglottis plicata* Bl) as Result of the In Vitro Fusaric Acid Selection Toward To *Fusarium oxysporum*," *Int. J. Applied Agric. Sci.*, vol. 2, no. 6, pp. 79–82, 2016.
- [15] M. Azrai, "Pemanfaatan Markah Molekular dalam Proses Seleksi Pemuliaan Tanaman," *Agro Biog.*, vol. 1, no. 1, pp. 26–37, 2005.
- [16] K. Semagn, A. Bjornstad, and M. Ndjioudjop, "An Overview of Molecular Marker Methods for Plants," *African J. Biotechnol.*, vol. 5, pp. 2540–2568, 2006.
- [17] J. Williams, A. Kubelik, K. Livak, J. Rafalski, and S. Tingey, "DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers Useful as Genetic Markers," *Nucl. Acids. Res.*, vol. 18, pp. 6531–6535, 1990.
- [18] J. Welsh and M. McClelland, "Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers," *Nucl. Acids. Res.*, vol. 18, pp. 7213–7218, 1990.
- [19] F. Bardakci, "Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers," *Turk. J Biol.*, vol. 25, pp. 185–196, 2001.
- [20] T. Demeke and R. Adams, "The Use of PCR-RAPD Analysis in Plant Taxonomy and Evolution," in *Griffin HG & Griffin AM (Ed.) PCR Technology Current Innovations*, London: CRC. Press. Inc., 1994, pp. 179–191.
- [21] D. Minoo *et al.*, "Genetic Variations and Interrelationships in *Vanilla planifolia* and Few Related Species as Expressed by RAPD Polymorphism," *Genet. Resour Crop.*, vol. 55, pp. 459–470, 2008.
- [22] G. Penner, "RAPD Analysis of Plant genomes.," in *Jauhar PP (Ed.) Methodes of Genome Analysis in Plant (1)*, Tokyo: CFC Press, 1996, pp. 251–267.
- [23] N. Esmail, A. Al-Doss, and M. Barakat, "In Vitro Selection For Resistance To *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Dianthi* And Detection Of Genetic Polymorphism Via RAPD Analysis In Carnation," *J. Med. Plants Res.*, vol. 6, no. 23, pp. 3997–4004, 2012.

