

**EKSTRAKSI DNA DARI HERBARIUM ANGGREK
(DNA EXTRACTION FROM ORCHID HERBARIUM MATERIALS)**

UUL SHOVI NURKAMILA, MADE PHARMAWATI*

Jurusan Biologi F.MIPA Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran – Bali

**Email: pharmawati@hotmail.com*

INTISARI

Ekstraksi DNA merupakan langkah awal dalam penelitian analisis biodiversitas maupun sistematika tumbuhan dengan penanda molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan ekstraksi DNA dari bahan herbarium dengan metode ekstraksi berbeda. Sebanyak 0,05 gram serbuk herbarium daun anggrek tanah *Calanthe emarginata* (Blume) Lindl. dan *Goodyera procera* (Ker-Gawl) Hook. digunakan untuk ekstraksi DNA dengan tiga metode berbeda. Metode tersebut adalah metode Doyle and Doyle dengan modifikasi waktu inkubasi selama 1,5 jam pada suhu 65° C dan peningkatan konsentrasi EDTA (50 mM), metode Dellaporta *et al.* dengan modifikasi waktu inkubasi (1,5 jam) pada suhu 65°C dan peningkatan konsentrasi EDTA (100 mM) serta metode Rogers and Bendich dengan modifikasi waktu inkubasi (1,5 jam) pada suhu 65°C dan pemberian 2x volume etanol. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa metode Doyle and Doyle dengan modifikasi menghasilkan DNA dari herbarium *C. emarginata*. Metode Rogers and Bendich dengan modifikasi juga menghasilkan DNA *C. emarginata* tetapi tidak konsisten. Metode Dellaporta *et al.* dengan modifikasi menghasilkan DNA dari herbarium *G. procera*. Metode Doyle and Doyle menghasilkan DNA *G. procera* tetapi tidak konsisten. PCR-RAPD yang dilakukan menunjukkan bahwa kualitas DNA dengan metode Doyle and Doyle dengan modifikasi tidak optimal karena menghasilkan pita DNA dengan pola yang tidak jelas. Metode Rogers and Bendich menghasilkan pita DNA yang lebih jelas pada PCR-RAPD tetapi hanya pada pita dengan ukuran yang kecil.

Kata kunci: *anggrek, ekstraksi DNA, herbarium, PCR*

ABSTRACT

DNA extraction is the first step to study plant systematic and biodiversity analysis using molecular markers. This study aimed to conduct DNA extraction from herbarium materials using different extraction methods. A total of 0.05 grams of herbarium powders of *Calanthe emarginata* (Blume) Lindl. and *Goodyera procera* (Ker-Gawl) Hook. (terrestrial orchid) were used for samples by three different methods. The first method was from Doyle and Doyle with modification of incubation time for 1,5 hours at 65°C and increasing EDTA concentration to 50 mM. Second method was Dellaporta *et al.* with modification of incubation time for 1,5 hours (at 65°C) and increasing EDTA concentration to 100 mM. Third method was Rogers and Bendich with modification of incubation time for 1,5 hours (65°C) and adding ethanol twice. The results of electrophoresis revealed that method of Doyle and Doyle obtained DNA from *C. emarginata* herbarium, while method from Rogers and Bendich, unfortunately it was inconsistent. The method from Dellaporta *et al.* obtained DNA from *G. procera* herbarium, while method from Doyle and Doyle revealed inconsistent DNA for *G. procera*. PCR-RAPD revealed the quality of DNA isolated using Doyle and Doyle method was not optimal, showed by unclear patterns of DNA bands. PCR-RAPD using DNA isolated with method from Rogers and Bendich revealed clearer DNA bands but only for small size fragment.

Keywords : *orchid, DNA extraction, herbarium, PCR*

PENDAHULUAN

Perkembangan biologi molekuler yang pesat sejak akhir abad ke-20 ikut mendukung berkembangnya penelitian-penelitian di bidang biologi termasuk biodiversitas dan sistematika tumbuhan. Penggunaan penanda molekuler, misalnya DNA dalam berbagai penelitian biodiversitas dan sistematika tumbuhan telah dilakukan secara intensif untuk mendukung data morfologi yang telah ada. Penggunaan penanda molekuler memiliki beberapa keuntungan, yaitu hasil yang konsisten dan dapat dideteksi pada semua jenis jaringan dengan berbagai tahap perkembangan, serta tidak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (Mondini *et al.*, 2009). Penelitian biodiversitas dan sistematika tumbuhan yang menggunakan analisis dengan penanda molekuler diawali dari ekstraksi DNA (Pharmawati, 2009). Sampel untuk ekstraksi DNA tumbuhan dapat berasal dari berbagai sumber, seperti jaringan segar, jaringan yang dibekukan dengan nitrogen cair (Sozen and Poyraz, 2008), jaringan yang dikeringkan dengan silika gel (Cota-Sanchez *et al.*, 2006) dan jaringan herbarium (Lambertini *et al.*, 2008).

Herbarium yang telah dikoleksi berpotensi untuk digunakan sebagai sumber sampel DNA dari spesies langka ataupun

spesies dari daerah terpencil (Mazo *et al.*, 2012). Anggrek merupakan tumbuhan yang sering menjadi objek eksplorasi oleh peneliti untuk tujuan pendataan kekayaan hayati dan konservasi *ex situ*. Di Bukit Silangjana, Lemukih, Kabupaten Buleleng ditemukan beberapa spesies anggrek, dua diantaranya adalah *Calanthe marginata* (Blume) Lindl. dan *Goodyera procera* (Ker-Gawl) Hook. yang merupakan anggrek tanah (Tirta, 2011). Kedua spesies anggrek ini menjadi koleksi Herbarium Biologi Unud (HBU) dan dipilih menjadi model pada penelitian ini.

Saat ini terdapat beberapa metode ekstraksi DNA tumbuhan menggunakan bahan herbarium, tetapi tiap spesies memiliki kesulitan tersendiri, tergantung proses pengeringan dan waktu penyimpanan (usia herbarium) dalam fasilitas penyimpanan (Mazo *et al.*, 2012). Kondisi sebelum dikeringkan dan tahap pertumbuhan ketika dikeringkan juga sangat mempengaruhi kualitas DNA yang dihasilkan. Kualitas DNA hasil ekstraksi mempengaruhi analisis lebih lanjut seperti hibridisasi DNA, pemotongan DNA dengan enzim restriksi maupun analisis dengan *polymerase chain reaction* (PCR) (Pharmawati, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode ekstraksi DNA

yang dapat menghasilkan DNA dari bahan herbarium dengan kualitas yang baik.

MATERI DAN METODE

Sampel herbarium (Tabel 1) digerus dalam *mortar* dan *pestle* hingga menjadi serbuk, kemudian disaring dengan alat

penyaring sehingga didapat serbuk herbarium yang sangat halus. Serbuk tersebut ditimbang sebanyak 0,05 g dengan dua kali pengulangan pada tiap metode ekstraksi DNA. Herbarium tersebut merupakan koleksi dari Herbarium Biologi UNUD yang dibuat tahun 2011.

Tabel 1. Informasi sampel herbarium yang digunakan

Spesies	Deskripsi	Lokasi	Kolektor	Tahun
<i>C. emarginata</i>	Tinggi tanaman 20-30 cm, panjang daun 27 cm, lebar 12 cm, panjang dorsal sepal 2 cm, <i>apex labellum</i> pinggirannya berlekuk, berbau harum.	Bukit Silangjana, Lemukih, Buleleng	Ni Made Gari	2011
<i>G. procera</i>	Tinggi tanaman 20-40 cm, bunga berwarna putih, kulit kayu halus, tidak memiliki pola pada daun	Bukit Silangjana, Lemukih, Buleleng	Ni Made Gari	2011

Ekstraksi DNA Metode Doyle and Doyle (1990) dengan Modifikasi

Sebanyak 0,05 g sampel ditambahkan 1,2 ml buffer ekstraksi (3% CTAB, 100 mM Tris/HCl pH 8, 1.4 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8, 2% mercaptoethanol) yang sudah dipanaskan pada suhu 65°C. Tabung diinkubasi pada suhu 65°C selama 1,5 jam dalam penangas air dan dibolak-balik secara kontinyu setiap 5 menit. Tabung disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 10 menit, supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan kloroform isoamilalkohol 24:1. Campuran dihomogenkan dan disentrifugasi selama 10 menit. Lapisan atas dipindahkan ke tabung baru, ditambahkan isopropanol dingin kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama 16 jam. Tabung disentrifugasi, pelet dicuci dengan etanol 70% dan disentrifugasi selama 3 menit. Pelet dikeringanginkan dan ditambahkan 100 µl air steril.

Ekstraksi DNA Metode Dellaporta *et al.* (1983) dengan Modifikasi

Sebanyak 0,05 g sampel ditambahkan 1,2 ml buffer ekstraksi (10% SDS, 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8, 20 µl/ml β-mercaptoethanol) yang sudah dipanaskan pada suhu 65°C. Tabung diinkubasi pada suhu 65°C selama 1,5 jam dalam penangas air dan dibolak-balik

secara kontinyu setiap 5 menit. Ditambahkan 300 µl 5 M Na asetat. Campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 16 jam. Tabung disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 10 menit, supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan kloroform isoamilalkohol 24:1. Setelah sentrifugasi selama 10 menit, lapisan atas dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan isopropanol dingin, kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama 16 jam. Tabung disentrifugasi, pelet dicuci dengan etanol 70% dan disentrifugasi kembali selama 3 menit. Pelet dikeringanginkan dan ditambahkan 100 µl air steril.

Ekstraksi DNA Metode Rogers and Bendich (1985) dengan Modifikasi

Sebanyak 0,05 g sampel ditambahkan 1,2 ml buffer ekstraksi (3% CTAB, 100 mM Tris/HCL pH 8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8, 2% mercaptoethanol) yang sudah dipanaskan pada suhu 65°C. Tabung diinkubasi pada suhu 65°C selama 1,5 jam dalam penangas air dan dibolak-balik secara kontinyu setiap 5 menit. Tabung disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan kloroform isoamilalkohol 24:1. Campuran dihomogenkan dan disentrifugasi selama 2 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung

baru dan ditambahkan buffer 10% CTAB (10% CTAB, 0.7 M NaCl) yang telah dipanaskan pada suhu 65°C, kemudian ditambahkan kloroform isoamilalkohol 24:1 dan disentrifugasi selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan buffer 1% CTAB (1% CTAB, 50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8) dan disentrifugasi selama 3 menit. Pelet dilarutkan dengan 100 µl buffer TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 1 M NaCl), ditambahkan 2x volume etanol, kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama 16 jam. Tabung disentrifugasi selama 3 menit dan pelet dicuci dengan etanol 70%, kemudian dikeringanginkan dan ditambahkan 100 µl air steril.

Elektroforesis DNA

Sebanyak 10 µl larutan DNA dielektroforesis menggunakan 1% gel agarosa dalam buffer 1x TAE (Tris acetate-EDTA). Lambda DNA (400 ng) digunakan sebagai pembanding untuk menentukan konsentrasi DNA yang dihasilkan. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 volt selama 40 menit, kemudian direndam dalam larutan etidium bromida selama 30 menit dan

HASIL

Hasil ekstraksi DNA menghasilkan pelet yang sebagian besar berwarna coklat.

diamati pada UV transluminator. Konsentrasi DNA ditentukan dengan membandingkan tingkat pendaran pita DNA hasil ekstraksi dengan lambda DNA.

PCR-RAPD

PCR-RAPD dilakukan berdasarkan Chandra (2011). Volume reaksi PCR adalah 20µl dan mengandung 1 x buffer Taq polymerase (*MD Bio*), 200µM dNTP, 2 mM MgCl₂, 1 U Taq polymerase, 2mM primer dan 10ng DNA. PCR dilakukan dalam *termocycler (MyGenie)* dengan siklus 5 menit denaturasi awal pada suhu 95°C, diikuti 35 kali 1 menit denaturasi pada suhu 95°C, 1,5 menit *annealing* pada 36°C, 1,5 menit pemanjangan pada 72°C dan setelah 35 siklus ditambah 1 siklus pemanjangan akhir selama 10 menit pada 72°C. Primer yang digunakan adalah OPD14 (CTTCCCCAAG) dan OPF11 (TTG GTA CCC C).

Sebanyak 10 µl produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1,8% selama 40 menit pada tegangan 100 Volt. Selanjutnya gel diwarnai dengan etidium bromida dan diamati dengan UV transluminator.

Ringkasan hasil ekstraksi DNA ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Konsentrasi dan warna pelet DNA yang dihasilkan

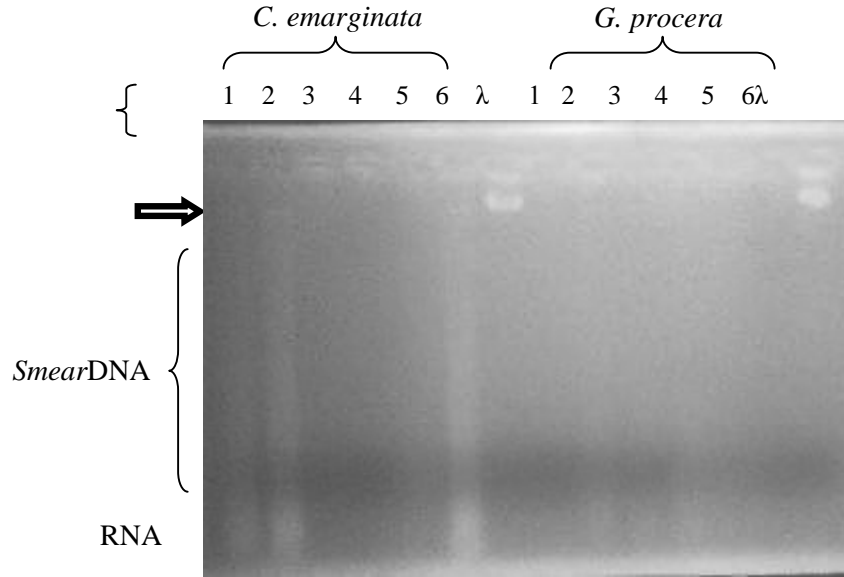
Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)			Warna Pelet		
	Doyle	Dellaporta	Rogers	Doyle	Dellaporta	Rogers
<i>C. emarginata</i>	2.5	0	0	Coklat	Putih	Putih
	5	0	6			
<i>G. procera</i>	0	2	0	Coklat	Coklat	Putih
	2	2	0			

Keterangan: Doyle = Metode Doyle and Doyle (1990)
 Dellaporta = Metode Dellaporta *et al.* (1983)
 Rogers = Metode Rogers and Bendich (1985)

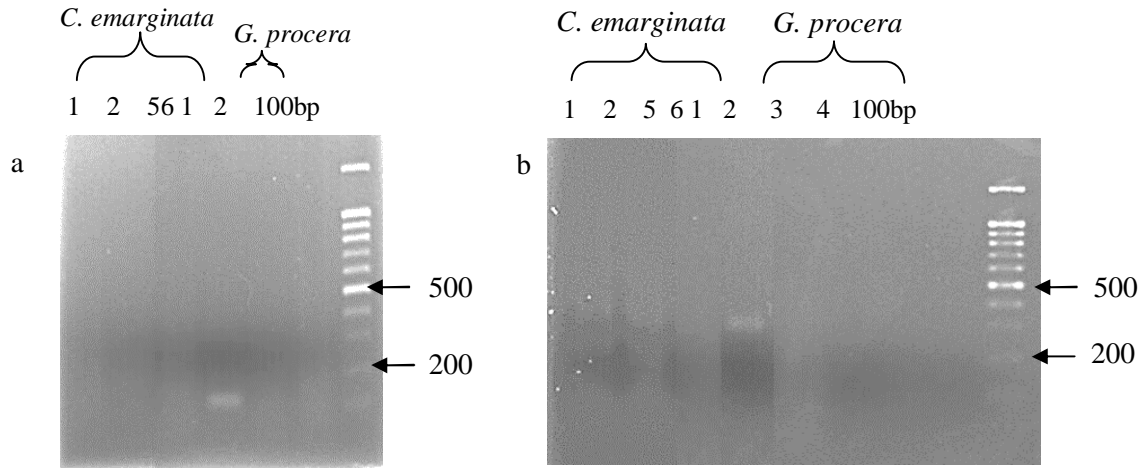
Sampel DNA *C. emarginata* yang diekstrak berdasarkan metode Doyle and Doyle (1990) serta Rogers and Bendich dengan jelas setelah dielektroforesis, sedangkan metode Dellaporta *et al.* (1983) tidak menunjukkan adanya pita DNA. Sampel DNA *G. procera* yang diekstrak berdasarkan metode Doyle and Doyle (1990) serta metode Dellaporta *et al.* (1983) dengan modifikasi menunjukkan adanya pita DNA yang samar, sedangkan metode Rogers

(1985) dengan modifikasi menunjukkan adanya pita DNA (tanda panah pada Gambar 1) and Bendich (1985) tidak menunjukkan adanya pita DNA.

Hasil PCR-RAPD dengan primer OPD 14 dan OPF 11 menggunakan DNA hasil ekstraksi dengan metode Doyle and Doyle (1990), Dellaporta *et al.* (1983) serta metode Rogers and Bendich (1985) menunjukkan pola fragmen yang tidak jelas (Gambar 2 a dan b).



Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA *C. emarginata* dan *G. procera* yang diekstrak berdasarkan metode Doyle and Doyle (1990) (1 dan 2), Dellaporta *et al.* (1983) (3 dan 4) serta Rogers and Bendich (1985) (5 dan 6). Lambda DNA (λ) 400 ng digunakan sebagai pembanding. Tanda panah menunjukkan DNA dengan ukuran besar



Gambar 2. Hasil PCR-RAPD dengan primer OPD14 (a) dan OPF11 (b). DNA *template* diekstrak dengan metode Doyle and Doyle (1 dan 2), Dellaporta *et al.* (3 dan 4) dan Rogers and Bendich (5 dan 6)

PEMBAHASAN

Metode ekstraksi DNA tidak semuanya cocok untuk semua jenis tumbuhan, sehingga dilakukan modifikasi agar diperoleh DNA dengan kualitas yang baik untuk analisis selanjutnya (Padmalatha and Prasad, 2006). Modifikasi pada ketiga metode ekstraksi DNA adalah inkubasi pada suhu 65°C selama 1,5 jam untuk mengoptimalkan kerja buffer ekstraksi yang ditambahkan ke dalam sampel (Syafaruddin dan Santoso, 2011). Modifikasi yang lain berupa peningkatan konsentrasi EDTA menjadi 50 mM pada metode Doyle and Doyle (1990) dan peningkatan konsentrasi EDTA menjadi 100 mM pada Metode Dellaporta *et al.* (1983) untuk mengikat ion magnesium yang merupakan kofaktor enzim DNase (Pharmawati, 2009; Zidani *et al.*, 2005). Modifikasi pada metode Rogers and Bendich (1985) adalah pemberian 2x volume etanol untuk mempresipitasi DNA (Telfer *et al.*, 2013) dan menghilangkan residu garam dari larutan sebelumnya (Mazo *et al.*, 2012).

Metode Doyle and Doyle (1990) serta Rogers and Bendich (1985) menggunakan buffer ekstraksi yang mengandung deterjen CTAB (*cetyltrimethyl ammonium bromide*), deterjen ini mampu menghilangkan kompleks polisakarida serta

lipid dari membran dan dinding sel kemudian mempresipitasi DNA (Moore *et al.*, 2004), tetapi memiliki kelemahan mudah mengendap pada suhu 15°C (Surzycki, 2000). Metode Dellaporta *et al.* (1983) menggunakan buffer ekstraksi yang mengandung deterjen SDS (*sodium dodecyl sulfate*), deterjen ini mampu mendenaturasi protein dari membran dan dinding sel (Moore *et al.*, 2004) serta mengurangi aktivitas enzim DNase (Chaput and Switzer, 1999), tetapi tidak mampu menghilangkan polisakarida (Moore *et al.*, 2004).

Ekstraksi DNA *C. emarginata* berdasarkan metode Doyle and Doyle (1990) dengan modifikasi menunjukkan pita DNA yang konsisten, sedangkan metode Rogers and Bendich (1985) dengan modifikasi menunjukkan pita DNA yang tidak konsisten karena hanya terdapat pada satu dari dua ulangan. Hasil yang tidak konsisten dapat terjadi karena pemipetan supernatan yang tidak maksimal sehingga DNA banyak yang terbuang atau sampel DNA tidak benar-benar masuk ke sumur gel agarosa ketika elektroforesis (Restu dkk, 2012). Metode Dellaporta *et al.* (1983) dengan modifikasi tidak menunjukkan adanya pita DNA, kemungkinan karena sampel sangat terkontaminasi polisakarida

yang ditunjukkan dengan tertinggalnya DNA pada sumur gel pada saat elektroforesis (Pharmawati, 2009).

Ekstraksi DNA *G. procera* berdasarkan metode Doyle and Doyle (1990) dengan modifikasi dan metode Dellaporta *et al.* (1983) dengan modifikasi menunjukkan pita DNA yang samar. Hal tersebut menandakan konsentrasi DNA yang diperoleh sangat sedikit (Mazo *et al.*, 2012). Metode Rogers and Bendich (1985) dengan modifikasi tidak menunjukkan pita DNA, kemungkinan karena konsentrasi DNA yang dihasilkan sangat sedikit sehingga tidak terlihat ketika divisualisasikan pada gel agarosa (Staats *et al.*, 2011). Proses pengeringan menyebabkan sel pecah dengan cepat, bersamaan melepaskan nuklease, ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan enzim seluler lainnya yang menyebabkan konsentrasi DNA yang dihasilkan sangat sedikit, sehingga tidak terlihat ketika divisualisasikan pada gel agarosa (Staats *et al.*, 2011). *Smear* pada pita DNA menandakan DNA telah terfragmentasi. Panjang dan kualitas fragmen DNA berhubungan dengan tingkat degradasi DNA, semakin lama spesimen disimpan, maka semakin besar fragmentasi DNA yang terjadi (Andreasen and Manktelow, 2009). Setiap spesies mengalami proses degradasi dan kerusakan

yang berbeda ketika proses pengeringan dan kandungan senyawa kimia tertentu yang mereka miliki dapat mendukung atau bahkan mengganggu proses ekstraksi DNA (Yang *et al.*, 1997), sehingga pada sampel yang berasal dari spesies yang sama dapat diperoleh konsentrasi DNA yang berbeda (Tabel 1) (Mazo *et al.*, 2012).

DNA yang diperoleh memiliki kualitas yang tidak baik yang ditunjukkan dengan tidak jelasnya pola fragmen DNA produk PCR-RAPD. PCR memerlukan DNA dengan kualitas yang baik yang tidak mengandung senyawa fenolik maupun kontaminan lain seperti polisakarida (Pharmawati, 2009; Restu dkk, 2012). Pada penelitian ini DNA hasil ekstraksi telah terdegradasi yang ditunjukkan dengan munculnya *smear*. DNA yang terdegradasi menandakan kerusakan nukleotida yang mengakibatkan primer tidak dapat menempal pada DNA template (Pharmawati, 2009; Nuraini dkk, 2012) dan dapat mengakibatkan menurunnya kemampuan enzim polimerase mengakses DNA pada proses amplifikasi (Staats *et al.*, 2011). Modifikasi lain harus dilakukan untuk mendapatkan DNA dengan kualitas baik dari material herbarium tanaman.

SIMPULAN

Metode Doyle and Doyle dengan modifikasi menghasilkan DNA dari herbarium *C. emarginata*. Metode Rogers and Bendich (1985) dengan modifikasi juga menghasilkan DNA *C. emarginata* tetapi tidak konsisten. Metode Dellaporta *et al.*(1983)dengan modifikasimenghasilkan DNA dari herbarium *G. procera*. Metode Doyle and Doyle (1990) menghasilkan DNA *G. procera* tetapi tidak konsisten. PCR-RAPD menunjukkan bahwa kualitas DNA dengan metode Doyle and Doyle (1990) dengan modifikasi tidak optimal dan menghasilkan pita DNA dengan pola yang tidak jelas, sedangkan metode Rogers and Bendich (1985) menghasilkan pita DNA yang lebih jelas pada PCR-RAPD tetapi hanya pada pita dengan ukuran yang kecil.

KEPUSTAKAAN

- Andreasen, K. and M. Manktelow. 2009. Successful DNA Amplification of a More than 200 Year Old Herbarium Specimen: Recovering Genetic Material from the Linnaean Era. *Taxon*. 58(3): 959-962.
- Chandra, I.P. 2011. Keragaman Genetik Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) yang Dibudidayakan di Bali Berdasarkan Marka Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Program Magister, Program Studi Bioteknologi Pertanian, Program Pascasarjana, Universitas Udayana. (Tesis). Tidak Dipublikasikan.
- Chaput, J.C. and C. Switzer. 1999. A DNA Pentaplex Incorporating Nucleobase Quintets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96(16): 10614-10619.
- Cota-Sanchez, J.H., K. Remarchuk, K. Ubayasena. 2006. Ready-to-Use DNA Extracted with a CTAB Method Adapted for Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue. *Pl. Mol. Biol. Rep.* 24: 161-167.
- Dellaporta S. L., J. Wood and J.B. Hick. 1983. A Plant Minipreparation: version II. *Pl. Mol. Biol. Rep.* 1: 19-20.
- Doyle J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Lambertini, C., J. Frydenberg, M.H.G. Gustafsson, H. Brix. 2008. Herbarium Specimens as a Source of DNA for AFLP Fingerprinting of Phragmites (Poaceae): Possibilities and Limitations. *Pl. Syst. Evol.* 272: 223–231.
- Mazo, L.C., G. Alberto, R.Q. Sonia, E.B. Jaime, O.V. Pedro. 2012. Extraction and Amplification of DNA from Orchid Exsiccates Conserv for More than Half a Century in a Herbarium in Bogota, Colombia. *Lankesteriana*. 12(2): 121-129.
- Mondini, L., A. Noorani, M.A. Pagnotta. 2009. Assesing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. *Diversity*. 2009(1): 19-35.
- Moore, E., A. Arnscheidt, A. Kruger, C. Strompl, M. Mau. 2004. Simplified Protocol for Preparation of Genomic DNA from Bacterial Cultures. *Mol.*

- Microb. Eco. Man. Sec. Edition.* 1(1): 3-18.
- Nuraini, I., S.E. Kusuma, A. Sosiawan. 2012. Analisis Pengaruh Waktu dan Pencucian Deterjen terhadap DNA Bercak Cairan Semen pada Lokus FGA dengan Metode STR-PCR. *JBP.* 14(2): 106-114.
- Padmalatha, K., and M.N.V. Prasad. 2006. Optimization of DNA Isolation and PCR Protocol for RAPD Analysis of Selected Medicinal and Aromatic Plants of Conservation Concern from Peninsular India. *African J. Biotech.* 5(3): 230-234.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi Ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. (Proteaceae). *J. Biologi.* 8(1): 12-16.
- Restu, M., Mukrimin., Gusmiaty. 2012. Optimalisasi Teknik Ekstraksi dan Isolasi DNA Tanaman Suren (*Toona Sureni* Merr.) untuk Analisis Keragaman Genetik Berdasarkan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). *J. Nature Ind.* 14(2): 138-142.
- Rogers, S.O., and A.J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from Miligram Amounts of Fresh, Herbarium, and Mummified Plant Tissues. *Pl. Mol. Biol.* 5: 69-76.
- Sozen, E. and I. Poyraz. 2008. Rapid and High Quality DNA Isolation from *Origanum onites* for RAPD and ISSR Analysis. *Z. Naturforsch.* 63c: 595-598.
- Staats, M., A. Cuenca, J.E. Richardson, R. Vrieling-van Ginkel, G. Petersen, O. Seberg, F.T. Bakker. 2011. DNA Damage in Plant Herbarium Tissue. *PLoS ONE.* 6(12): e28448.
- Surzycki, S.J. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology.* Springer-VerlagPublisher. Berlin.
- Syafaruddin dan T.J. Santoso. 2011. Optimasi Metode Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *J. Littri.* 17(1): 11-17.
- Telfer, E., N. Graham, L. Stanbra, T. Manley, P. Wilcox. 2013. Extraction of High Purity Genomic DNA from Pine for Use in a High-Throughput Genotyping Platform. *New Zeal. J. For. Sci.* 43(3): 1-8.
- Tirta, I.G. 2011. Ekplorasi flora di bukit Silangjana, Singaraja, Bali. *Widyatech, J. Sain. Tek.* 11(2):105-111.
- Yang, H., E. Golenberg, J. Shishani. 1997. Proboscidean DNA from Museum and Fossil Specimens: an Assessment of Ancient DNA Extraction and Amplification Techniques. *Biochem. Genet.* 35(5): 165-178.
- Zidani, S., A. Ferchichi, M. Chaib. 2005. Genomic DNA Extraction Method from Pearl Millet (*Pennisetum glaucum*) Leaves. *African J. Biotech.* 4(8): 862-866.