

**ISOLASI DNA GENOM DAN IDENTIFIKASI KEKERABATAN  
GENETIK NANAS MENGGUNAKAN RAPD (*RANDOM AMPLIFIED  
POLIMORFIC DNA*)**

**[DNA GENOM ISOLATION AND IDENTIFICATION OF GENETIC  
RELATIONSHIP PINEAPPLE USING RAPD (*RANDOM AMPLIFIED  
POLIMORFIC DNA*)]**

Hidayah Murtiyaningsih  
Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Jember  
Email: [hidayahmurtiyaningsih@gmail.com](mailto:hidayahmurtiyaningsih@gmail.com)

**ABSTRAK**

Beberapa jenis nanas lokal di Indonesia umumnya diberi nama berdasarkan nama daerah atau lokasi, sehingga klon yang secara genetik sama kemungkinan dapat berbeda namanya. Dengan demikian identifikasi nanas berdasarkan marka biokimia maupun molekuler sangat dibutuhkan. Penelitian ini bertujuan memperoleh informasi mengenai teknik isolasi DNA daun nanas dengan metode CTAB dan kekerabatan genetik nanas lokal dengan metode yang lebih valid yaitu dengan RAPD (*Random Amplified Polimorfic DNA*). Hasil isolasi DNA daun nanas menggunakan metode CTAB menunjukkan kemurnian yang bagus yaitu diantara 1,8 – 1,9. Hasil analisis RAPD dan dendogram menunjukkan bahwa kisaran kekerabatan antara kedua kelompok nanas tersebut berkisar antara 0.95 - 1.00. Hal ini menunjukkan bahwa keragaman antara ketiga jenis nanas kode 1, 2 dan 4 sangat rendah meskipun memiliki fenotip yang berbeda.

Kata Kunci: RAPD, Kekerabatan Genetik, Nanas, *Ananas* sp.

**ABSTRACT**

Some local pineapple species in Indonesia are generally named by region or location, so genetically similar clones may be have a different name. So Pineapple identification based on biochemical or molecular markers is needed. The aim of this research is to obtain information about DNA Isolation of pineapple leaf DNA by CTAB method and genetic relationship of local Pineapple with more valid method that is RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). The result of pineapple leaf DNA isolation using CTAB method showed good purity that is between 1.8 – 1.9. The results of RAPD and dendogram analysis showed that the range of relationship between the two pineapple groups ranged from 0.95 - 1.00. This study shows that the diversity between the three types of pineapple code 1, 2 and 4 is very low despite having a different phenotypes.

Key Words: RAPD, Genetic Relationship, Pineapple, *Ananas* sp.

## PENDAHULUAN

Identifikasi molekuler memerlukan tahapan awal yaitu isolasi DNA genom. Prinsip isolasi DNA adalah mendapatkan DNA murni yang tidak tercampur dengan komponen sel lainnya seperti protein dan karbohidrat. Isolasi DNA genom dapat dilakukan dengan metode lisis sel secara fisik dan kimia. Secara fisik sel dipecah dengan kekuatan mekanik yaitu secara *freeze thaw*, *bead mill homogenization* dan resonansi misalnya dengan sonikasi. Sedangkan secara kimia sel dirusak dengan buffer lisis berisi senyawa kimia yang dapat merusak integritas *barrier* dinding sel, misalnya SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) dan CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*) (Cheng *et al.*, 2003).

Kualitas DNA genom yang baik merupakan hal penting yang dibutuhkan dalam aplikasi biologi molekuler. Aplikasi tersebut meliputi PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), dan analisis molekuler yang lain.

Salah satu aplikasi biologi molekuler yang sering digunakan adalah metode RAPD. RAPD merupakan teknik pengujian polimorfisme DNA berdasarkan pada amplifikasi dari segmen-segmen DNA acak menggunakan primer tunggal yang sekuens nukleotidanya ditentukan secara acak. Teknik RAPD merupakan teknik penanda molekuler pen-

gembang dan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mengetahui hubungan kekerabatan suatu spesies maupun kekerabatan atau keragaman genetik antar spesies (Kumar & Gurusubramanian, 2011).

Keragaman genetik merupakan variasi gen dalam satu spesies baik diantara populasi-populasi yang terpisah secara geografis maupun diantara individu-individu dalam satu populasi. Adanya keanekaragaman morfologi erat kaitannya dengan keanekaragaman genetik (Sijapati *et al.*, 2008). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai isolasi DNA genom dan aplikasi teknik RAPD untuk mengetahui kekerabatan dan keragaman genetik pada beberapa sampel tanaman nanas (*Ananas sp.*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mempelajari teknik isolasi genom pada tanaman nanas serta teknik RAPD menggunakan primer OPA 2, 3 dan 4 pada tanaman nanas untuk melihat hubungan kekerabatan menggunakan pohon filogenetik.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biorin Pusat Antar Universitas IPB Dramaga Bogor, pada bulan Agustus sampai dengan September 2015.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian RAPD adalah mortar-pestle, mikropipet, mikro tip, microtube

sentrifuge, inkubator, sentrifuge, vacuum dry, spektrophotometer, elektroforesis gel agarosa, mesin thermocycler untuk PCR dan UV transiluminator dilengkapi dengan gel doc.

Bahan yang digunakan adalah 3 jenis daun nanas lokal, liquid nitrogen, buffer CTAB, CI (*Cloroform Isoamilalkohol*), PCI (*Phenol Chloroform Isoamilalkohol*), ethanol, NaOAc pH 5,2, ddH<sub>2</sub>O, RNase, agarose, buffer TAE, *loading buffer*, Etidium bromide, master mix PCR, primer OPA (2, 3, 4 dan 13). *Sequence primer* OPA2 (TGCCGAGCTG), OPA3 (AGTCAGCCAC) dan OPA4 (CAGCACCCAC).

## Metode

### Isolasi DNA Genom

Isolasi genom dilakukan dengan menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromida*). Tahap-tahap isolasi genom sebagai berikut:

Sebanyak  $\pm 100$  mg sampel nanas diekstraksi menggunakan nitrogen cair. Serbuk yang didapat ditambahkan dengan 600  $\mu$ l buffer CTAB. Campuran diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan 600  $\mu$ l CI, dibolak balik agar homogen. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, suhu 4 °C, selama 15 menit. Supernatan yang didapatkan kemudian ditambahkan dengan PCI sebanyak 600  $\mu$ l, dibolak balik agar homogen. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, suhu 4 °C,

selama 10 menit. Supernatan yang didapat ditambahkan dengan ETOH 10% (2x volume) dan NaOAc pH 5,2 (0,1 x volume). Campuran dipresipitasi dengan cara inkubasi freezer selama 2 jam, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, suhu 4 °C, selama 15 menit. Pellet yang didapatkan dicuci dengan ethanol 70 %, kemudian disentrifugasi ulang pada kecepatan 10.000 rpm, suhu 4 °C, selama 5 menit. Pellet dikeringkan dengan vacuum dry selama 20 menit. Pellet ditambahkan dengan 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O dan RNase (0,2 x volume), diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Untuk menginaktivasi RNase, dilakukan inkubasi ulang pada suhu 70 °C selama 10 menit.

### Pengukuran Kualitas dan Kuantitas DNA

Hasil DNA genom dapat dilihat melalui spektrofotometer maupun elektroforesis. Sebanyak 5  $\mu$ l DNA diencerkan dengan ddH<sub>2</sub>O 695  $\mu$ l, kemudian dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm untuk protein. Tahap ini berfungsi untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNA genom.

Hasil isolasi DNA juga dapat dilihat dengan elektroforesis yaitu dengan menambahkan 1  $\mu$ l *loading dye* pada 5  $\mu$ l DNA genom, kemudian dimasukkan dalam sumuran gel agarose 1% (0,3 gram agarose dalam 30 ml buffer TAE (*Tris Acetic EDTA*) 1X. DNA lambda digunakan sebagai marker. Elektroforesis dilakukan selama 40 menit pada 85 Volt dengan

*buffer* TAE 1X sebagai *running buffer*. Gel direndam dalam larutan *Ethidium Bromida* (EtBr). Gel dapat divisualisasi dengan meletakkan gel diatas UV iluminator untuk melihat ada tidaknya pita DNA genom.

### **Amplifikasi DNA Genom**

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer OPA 2, 3 dan 4 (pada masing-masing sampel) menggunakan mesin thermocycler. Analisis PCR RAPD dilakukan dengan total 1x reaksi sebanyak 10 µl, mengandung DNA template 1 µl, Master Mix 5 µl, Primer OPA 0,5 µl,

ddH<sub>2</sub>O 3,5 µl. Campuran dihomogenkan kemudian dimasukkan ke dalam mesin thermocycler.

Hasil amplifikasi divisualisasikan menggunakan elektroforesis horizontal dengan gel agarose 1 % (w/v) dalam buffer 1x TAE. Gel agarose kemudian direndam dalam larutan EtBr, sehingga pola pita dapat dilihat dibawah sinar ultraviolet. Ukuran fragmen ditentukan dengan membandingkan terhadap standar 1 Kb *Ladder*. Analisis data hasil amplifikasi kemudian dibangun berdasarkan analisis data biner program NTSYS membentuk dendogram.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Isolasi DNA Genom dan Pengukuran Kuantitas serta Kualitas DNA**

Isolasi DNA genom pada daun nanas memiliki prinsip berupa lisis sel, presipitasi (pengendapan) dan purifikasi (pemurnian). Lisis sel dilakukan dengan penggerusan (*grinding*) bersama nitrogen cair dan buffer CTAB. Nitrogen cair digunakan karena memiliki suhu sangat rendah yaitu -196<sup>0</sup>C, sehingga dapat membekukan sel dan memudahkan dalam pemecahan dinding sel secara mekanik. Selain itu, suhu dingin juga dapat menonaktifkan kerja seluler misalnya enzim nuklease yang memiliki fungsi dalam pemotongan DNA, sehingga berpengaruh pada hasil isolasi DNA. Penambahan buffer CTAB berfungsi untuk melisis dinding sel maupun membran sel yang memiliki

komposisi berupa komponen lipid dan protein. Selain itu di dalam bufer CTAB mengandung PVP (*polivilpirolidone*) yang berfungsi mereduksi senyawa fenolik. Penambahan β-*Mercaptoethanol* pada sampel tanaman berfungsi untuk mereduksi dan memotong ikatan disulfida protein. Perlakuan inkubasi 65<sup>0</sup>C berfungsi mengoptimalkan kerja buffer ekstraksi yang ditambahkan ke dalam sampel (Cheng *et al* 2003). SDS merupakan larutan deterjen anion kuat yang dapat melarutkan lipid sebagai penyusun membran, sehingga DNA akan terekspos ke luar sel, sedangkan penambahan proteinase-K berfungsi untuk menghilangkan protein dalam larutan dengan memotong ikatan peptida. Sentrifugasi pada tahap ini berfungsi untuk memisahkan debris dan komponen sel lain yang menjadi

penyebab kontaminasi dengan DNA (Syafaruddin dan Santoso, 2011).

Presipitasi dilakukan dengan penambahan Chloroform Isoamil alkohol untuk memisahkan DNA dari kontaminan. Chloroform merupakan pelarut organik yang dapat melarutkan protein, lipid, dan molekul lain seperti polisakarida. Penambahan PCI (*Phenol Chloroform Isoamilalkohol*) yang mengandung fenol berfungsi untuk memaksimalkan presipitasi, dimana fenol merupakan senyawa yang mampu berikatan dengan protein. Penambahan PCI menghasilkan 3 lapisan yaitu lapisan aquous, protein dan fenol. DNA terdapat pada lapisan aquous yang bebas dari kontaminan, sementara protein membentuk lapisan tengah, dan chloroform terletak di bawah karena memiliki berat jenis besar. Presipitasi juga dilakukan dengan perlakuan suhu dingin (20°C) yang bertujuan untuk mengendapkan DNA (Syafaruddin dan Santoso, 2011).

Etanol absolut dan NaOAc digunakan sebagai agen presipitasi lanjutan. Etanol memiliki dielektrik lebih rendah daripada air sehingga memudahkan garam yang memiliki muatan positif ( $\text{Na}^+$ ) untuk berinteraksi dengan DNA yang bermuatan negatif. Interaksi tersebut menyebabkan DNA bersifat hidrofob dan mengendap. Pellet DNA kemudian dicuci dengan etanol 70% untuk menghilangkan kelebihan garam (Syafaruddin dan Santoso, 2011).

Purifikasi pada praktikum ini dilakukan dengan penambahan RNase dengan tujuan untuk menghilangkan RNA pada larutan DNA. RNase merupakan enzim pendeградasi RNA. Prinsip kerja RNase adalah memotong ikatan fosfodiester antara 5'-ribosa dari nukleotida dan gugus fosfat yang melekat pada 3'-ribosa, yang kemudian dihidrolisis membentuk 3'-nukleosida fosfat (Sambrook *et al.*, 1989).

Larutan DNA yang didapatkan kemudian diamati kuantitas dan kualitas DNANYA. Analisis kuantitas dilakukan untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNA. Kemurnian larutan DNA dapat dihitung melalui perbandingan A260 nm dengan A280 nm. Hasil isolasi DNA dikatakan murni apabila rasio perbandingan A260 nm dan A280 nm adalah 1,8-2,0 dan telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan dalam analisis molekuler (Sambrook *et al.*, 1989).

Pada penelitian ini diperoleh kemurnian antara 1,7 sampai 1,9 (Tabel 1). Kisaran nilai tersebut menunjukkan bahwa jumlah DNA dalam sampel lebih banyak daripada jumlah protein. Apabila kemurnian dibawah 1,8 dan diatas 2,0 diindikasikan DNA masih terkontaminasi RNA dan protein.

Pengukuran kuantitas DNA selanjutnya adalah pengukuran konsentrasi DNA, yang bertujuan untuk mengetahui banyak sedikitnya DNA yang terkandung dalam larutan. Konsentrasi DNA diukur

melalui spektrofotometer yang didasarkan pada prinsip penyerapan sinar ultraviolet oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Penyerapan sinar UV oleh DNA dicapai pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan penyerapan protein dicapai pada panjang gelombang 280 nm. Pada panjang gelombang 260 nm, apabila *optical density* (OD260) sama dengan 1, maka konsentrasi molekul DNA setara 50 ug ml<sup>-1</sup> (untuk DNA heliks ganda) 40 ug ml<sup>-1</sup> (untuk RNA) dan 20 ug ml<sup>-1</sup> (untuk oligonukleotida). Secara umum formula yang digunakan untuk menghitung konsentrasi DNA dengan alat spektrofotometer adalah sebagai berikut:

$$\frac{\text{Konsentrasi (ug ml}^{-1}\text{)}}{\text{ml}^{-1}} = \frac{A_{260} \times FP \times 50 \text{ ug}}{\text{Volume sampel yang digunakan}}$$

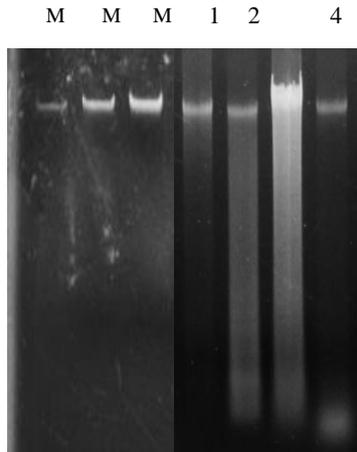
Tabel 1. Hasil spektrofometri DNA

| No. | Sampel | 260 nm | 280 nm | Kemurnian | Konsentrasi (ng/μl) |
|-----|--------|--------|--------|-----------|---------------------|
| 1   |        | 0,396  | 0,223  | 1,77      | 2772                |
| 2   | Nanas  | 0,910  | 0,509  | 1,78      | 6370                |
| 4   |        | 0,498  | 0,256  | 1,94      | 3486                |

Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa DNA memiliki keutuhan yang baik, hal ini dibuktikan dengan pita DNA yang muncul single pita (diatas 10000 bp) (Gambar 1). DNA yang utuh akan memberikan hasil yang akurat dalam analisis molekuler. Tetapi kemurnian dari hasil isolasi cenderung

Hasil konsentrasi DNA (Tabel 1) menunjukkan hasil yang cukup tinggi yaitu 3 - 6 ug/ul. Hasil tersebut kemudian dikonfirmasi dengan gel agarosa. Pengamatan kualitas DNA dengan elektroforesis gel agarosa 1% bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya DNA, keutuhan DNA hasil isolasi dan tingkat kemurnian DNA dari kontaminan RNA (Brown, 2002). Penambahan *Loading dye* berfungsi sebagai pemberat dan pewarna karena mengandung gliserol dan *bromphenol blue*. Visualisasi dilakukan dengan penambahan *ethidium bromida* yang akan menyisip di antara utas basa nitrogen (pada ikatan hidrogen) sehingga membantu memendarkan DNA saat dilihat di bawah sinar UV. Pendaran DNA akan terlihat sebagai pita-pita yang bermigrasi pada gel dari kutub negatif ke kutub positif.

terkontaminasi RNA, hal ini dibuktikan dengan munculnya pita RNA pada gel agarosa, yang memiliki ukuran lebih rendah daripada DNA genom (kurang dari 250 bp). Munculnya kontaminan RNA bisa disebabkan oleh kurang maksimalnya kerja RNase pada tahap purifikasi.



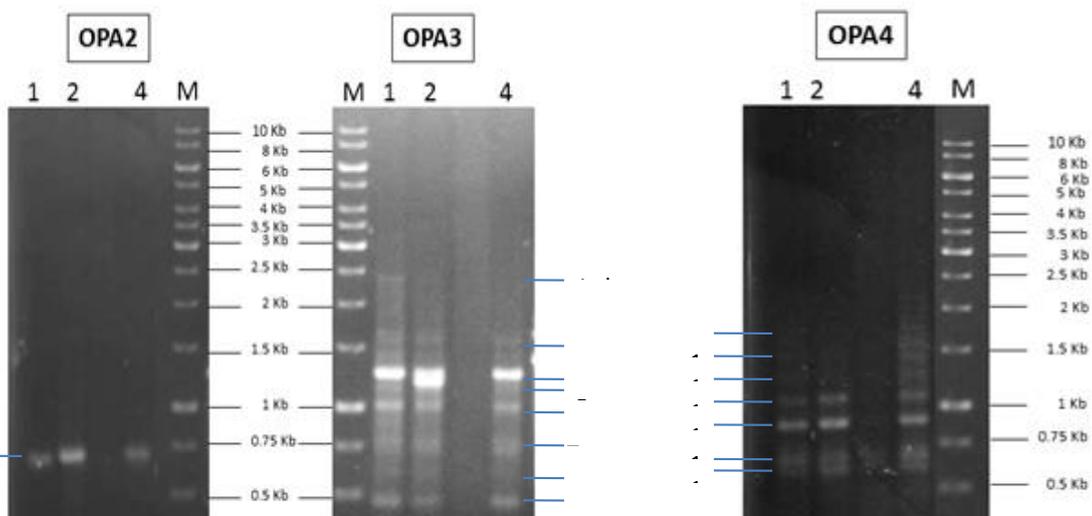
Gambar 1. Hasil elektroforesis gel agarosa 1% pada DNA genom. M: marker lambda( 3 µg, 5 µg, 10 µg), 1-4: sampel DNA daun nanas.

**Analisis Keragaman Menggunakan Teknik RAPD**

Variasi genetik menggambarkan keragaman fenotipe di alam. Variasi genetik di alam dapat terjadi karena adanya mutasi atau rekombinasi. Variasi genetik dapat diketahui dengan melihat perbedaan urutan basa-basa. Perbedaan urutan basa tersebut mengakibatkan adanya polimorfisme pada DNA. Polimorfisme adalah banyaknya fragmen DNA yang berbeda berdasarkan ukuran, karena adanya marka-marka yang tersebar pada seluruh genom (Sijapati, 2008).

Hasil analisis DNA pada ketiga jenis daun nanas (nanas 1, 2 dan 4) dengan metode RAPD

menggunakan amplifikasi dari primer OPA 2, 3 dan 4 didapatkan 17 total fragmen DNA (Lampiran). Pita-pita DNA yang teramplifikasi terletak pada posisi antara 250 bp dan 3000 bp. Jumlah fragmen DNA yang diproduksi untuk setiap primer berkisar antara 1 hingga 8 (Gambar 2). Pada primer OPA 3 dan 4 menghasilkan masing-masing 8 fragmen DNA. Jumlah pita polimorfis terbanyak terdapat pada primer OPA 3 dan 4 yaitu masing-masing sebanyak 3. Sedangkan untuk primer OPA 2 hanya memiliki 1 fragmen/ lokus, dan bersifat monomorfik (pada semua sampel nanas yang diamati memisah pada jarak yang sama).



Gambar 2. Hasil amplifikasi primer OPA 2, 3 dan 4 pada DNA nanas. M: marker 1 kb ladder, 1-3: jenis nanas.

Berdasarkan hasil amplifikasi PCR selanjutnya dilakukan skoring terhadap pita DNA yang muncul (Tabel 2), dan dilanjutkan dengan analisis terhadap kekerabatan melalui program NTSYS. Hasil analisis sebagaimana yang ditampilkan dalam bentuk pohon kekerabatan pada Gambar 3. Berdasarkan dendrogram dapat dilihat bahwa terdapat 2 kelompok utama nanas. Kelompok pertama mengelompok dengan tingkat kemiripan 1.00. Nanas yang termasuk golongan ini adalah nanas 1 dan 2. Kelompok kedua hanya ditempati oleh nanas 4 dengan tingkat kemiripan 0.95. Kisaran kekerabatan antara kedua kelompok nanas tersebut berkisar antara 0.95-1.00. Hal ini menunjukkan bahwa keragaman antara nanas 1, 2 dan 4 sangat rendah. Menurut Olivier *et al.*,

(1995) nilai similaritas berkisar antara 0 sampai 1,0 dan hubungan kekerabatan dekat apabila nilai similaritas mendekati 1.

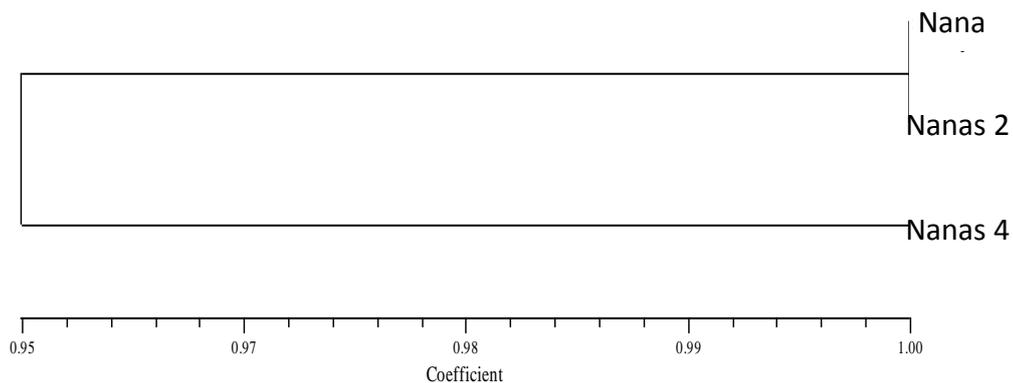
Menurut Hardiyanto *et al.* (2008) kemiripan genetik merupakan kebalikan dari jarak genetik. Makin kecil nilai tingkat kemiripan, memiliki indikasi makin jauhnya kekerabatan genetik sampel yang diuji. Informasi ini sangat berarti dalam kegiatan pemuliaan di mana semakin jauh jarak genetik yang dimiliki suatu sampel dengan sampel yang lain akan meningkatkan peluang mendapatkan keragaman genetik. Apabila diaplikasikan dalam budidaya pemuliaan nanas, hal ini menunjukkan bahwa antara nanas yang diuji diatas tidak bisa digunakan dalam persilangan karena memiliki tingkat keragaman yang rendah.

Tabel 2. Hasil Skoring Amplifikasi PCR

| Locus  | Nanas 1 | Nanas 2 | Nanas 4 |
|--------|---------|---------|---------|
| Locus1 | 1       | 1       | 1       |
| Locus2 | 999     | 0       | 0       |
| Locus3 | 1       | 1       | 1       |

|         |     |     |     |
|---------|-----|-----|-----|
| Locus4  | 1   | 1   | 1   |
| Locus5  | 999 | 1   | 0   |
| Locus6  | 1   | 1   | 1   |
| Locus7  | 999 | 999 | 999 |
| Locus8  | 999 | 999 | 0   |
| Locus9  | 1   | 1   | 1   |
| Locus10 | 0   | 0   | 999 |
| Locus11 | 0   | 0   | 999 |
| Locus12 | 0   | 0   | 999 |
| Locus13 | 1   | 1   | 1   |
| Locus14 | 1   | 1   | 1   |
| Locus15 | 1   | 1   | 1   |
| Locus16 | 1   | 1   | 1   |
| Locus17 | 1   | 999 | 1   |

Keterangan: Skoring : 1 jika pita jelas; skoring 999 jika pita semir, skoring 0 jika tidak terdapat pita pada lokus.



Gambar 3. Dendrogram hasil RAPD menggunakan primer OPA 2, 3 dan 4 dari 3 jenis nanas (nanas 1, 2 dan 4).

**KESIMPULAN**

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa DNA genom hasil isolasi dengan metode CTAB mendapatkan hasil konsentrasi yang baik. Hasil isolasi DNA daun nanas menggunakan metode CTAB menunjukkan kemurnian yang bagus yaitu diantara 1,8 – 1,9. Metode

RAPD dapat digunakan untuk menentukan kekerabatan suatu tanaman. Hasil analisis keragaman metode RAPD dengan menggunakan primer OPA 2, 3, 4 pada ketiga jenis nanas memberikan hasil bahwa antara nanas 1, 2 dan 4 memiliki keragaman yang rendah, dengan tingkat similaritas/ koefisien antara

0.95-1.00, meskipun memiliki bentuk

fenotip yang berbeda.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T.A. 2002. *Genomes 2nd Ed.* BIOS Scientific Publishers Ltd: New York.
- Cheng YJ, Guo WW, Yi HL, Pang XM & Deng X. 2003. An efficient protocol for genomic DNA extraction from citrus species. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 177a-177g.
- Hardiyanto NF, Devy, dan Martasari C. 2008. Identifikasi Kekerbatan Genetik Klon-klon Bawang Putih Indonesia Menggunakan Isozim dan RAPD. *J. Hort.* 18(4): 385-394.
- Kumar NS and Gurusubramanian G. 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci Vis.* 11 (3): 116-124.
- Olivier M, Meehl MA, Lust G. 1999. DNA Sequences as Markers for Canine Genetic Studies. *The journal of heredity.* 90(1).
- Sambrook, J., and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning (A laboratory manual)* Vol. 2. Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p.
- Sijapati J, Rana N, Rana P and Shrestha S. 2008. Optimization of RAPD-PCR Conditions for the Study of Genetic Diversity in Nepalese Isolates of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Nepal Journal of Science and Technology.* 9: 91-97.
- Syafaruddin dan Santoso TJ. 2011. Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif pada Kemiri Sunan (*Reutalis Trisperma*). *Jurnal Littri.* 17(1): 11–17.