

Isolasi DNA Daun Jeruk Bali Merah (*Citrus maxima* Merr.) dengan Modifikasi Metode Doyle and Doyle

Nurmalisa Rizko*¹⁾, Hermin Pancasakti Kusumaningrum*¹⁾, Rejeki Siti Ferniah¹⁾, Sri Pujiyanto¹⁾, Tia Erfianti²⁾, Shelina Nurunnisa Mawarni¹⁾, Hesti Tri Rahayu²⁾, Dinda Khairunnisa³⁾

- 1) *Biotechnology Study Program, Biology Department, Faculty of Sains and Natural Sciences, Diponegoro University, Jl. Prof. Soedarto, UNDIP, Tembalang, Semarang. 50275 Telp./fax. 024-76480923,*
- 2) *Biology Study Program, Biology Department, Faculty of Sains and Natural Sciences, Diponegoro University, Jl. Prof. Soedarto, UNDIP, Tembalang, Semarang. 50275 Telp./fax. 024-76480923,*
- 3) *International University Program, Biology Study Program, Biology Department, Faculty of Sains and Natural Sciences, Diponegoro University, Jl. Prof. Soedarto, UNDIP, Tembalang, Semarang. 50275 Telp./fax. 024-76480923,*

Corresponding author : nurmalisarr@gmail.com dan herminpk@live.undip.ac.id

ABSTRAK

Jeruk bali merah (*Citrus maxima* Merr) merupakan tanaman lokal yang tersebar di wilayah Indonesia. Keunggulan tanaman tersebut adalah nutrisi yang tinggi yang terdiri dari vitamin C 996,773 mg/L, riboflavin, natrium (Na), kalsium (Ca), serta senyawa metabolit lainnya yang merupakan sumber antioksidan yang baik. Dalam masa pandemi ini, kebutuhan vitamiknya dalam menghadapi Pandemi Covid19. Pengembangan potensivarietas unggul dari jeruk bali perlu dilakukan salah satunya dengan analisis genetik. Tahap awal analisis genetik suatu tanaman adalah isolasi DNA tanaman tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi DNA pada daun jeruk bali dengan metode Doyle & Doyle yang dimodifikasi dengan penambahan CTAB untuk mengatasi kadungan polisakarida dan senyawa polifenol yang tinggi dalam tanaman jeruk bali. Sampel DNA jeruk bali yang telah diisolasi di analisis menggunakan NanoDrop dengan absorbansi (A260/A280). Hasil pada penelitian ini, sampel DNA yang dianalisis menggunakan NanoDrop memiliki konsentrasi 220,8ng/ μ l serta kemurnian sebesar 1,93.

Kata kunci : Jeruk bali (*Citrus maxima*), isolasi DNA, CTAB.

1. Pendahuluan

Jeruk bali merupakan tanaman yang tersebar di wilayah Indonesia. Jeruk bali berkembang terutama di Asia Tenggara dan beberapa kultivar hanya ditemukan di Indonesia. Kandungan nutrisi pada jeruk bali memiliki banyak manfaat untuk kesehatan. Data dari Kementerian Kesehatan tahun 2019 menunjukkan bahwa kandungan jeruk bali dihitung per 100 gram antara lain : vitamin C, niasin, riboflavin, thiamin, karoten, seng (Zn), kalium (K), natrium (Na), besi (Fe), kalsium (Ca), Tembaga (Cu), Abu (ASH), serat, karbohidrat, lemak, protein, dan air. Saat masa pandemi sekarang, kebutuhan vitamin C menjadi sangat tinggi. Vitamin C mengandung

antioksidan yang berperan melindungi sel dari radikal bebas dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh dalam melawan Covid-19. Pada uji *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), kandungan asam askorbat dalam jeruk bali memiliki konsentrasi 996,773 mg/L sehingga dapat digunakan sebagai alternatif sumber vitamin C yang lain. Kandungan vitamin C tersebut melebihi jeruk nipis dan jeruk lemon yang berada pada kisaran 55 -66 mg/L (Kusumaningrum *et al.*, 2018).

Jeruk merupakan tanaman asli dari benua Asia khususnya dari India sampai Cina. Banyak spesies jeruk yang telah dibudidayakan di daerah subtropik. Tanaman Jeruk merupakan salah satu komoditas hortikultura yang bernilai ekonomi tinggi. Buah

jeruk merupakan salah satu jenis buah-buahan yang paling banyak digemari oleh masyarakat di Indonesia. Selain itu, jeruk merupakan buah yang selalu tersedia sepanjang tahun karena tanaman jeruk tidak mengenal musim berbunga yang khusus. Tanaman jeruk juga dapat ditanam dimana saja, baik di dataran rendah maupun di dataran tinggi (Badan Pusat Statistik, 2007; Amelia, 2017). Hampir semua jeruk-jeruk komersial Indonesia (jeruk Siam, Keprok, Bali dan Manis) termasuk dalam genus ini.

Bagian jeruk bali dapat digunakan sebagai obat tradisional. Beberapa manfaat dari jeruk bali antara lain : daunnya yang dapat digunakan untuk menyembuhkan penyakit epilepsies, kloreia, batuk, serta dapat juga digunakan sebagai pengobatan pada pendarahan. Minyak dari daun jeruk bali yang segar dapat digunakan sebagai anti-fungisida. Buah jeruk dapat digunakan untuk mengobati asma, batuk, epilepsy, dan kardiotonik. Kulit buah dapat digunakan sebagai pengobatan asma, mengobati muntah, diare, sakit kepala, dan masalah pada mata. Akar pada tanaman dapat digunakan untuk menghambat aktivitas antimikroba (Martasari, 2008; Vijaylakshmi, 2015).

Menurut data dari Badan Statistik, produksi jeruk bali di Indonesia tahun 2018 mencapai 102.339. Rendahnya produksi jeruk bali di Indonesia bukan hanya disebabkan oleh kurangnya kemampuan teknik budidaya para petani, namun juga disebabkan oleh kualitas bibit yang kurang baik. Salah satu kunci pengembangan jeruk bali adalah ketersediaan bibit bermutu pada saat yang tepat (Susanto, 2010). Pencarian bibit jeruk bali yang unggul dapat dilakukan salah satunya dengan analisis genetik.

Informasi genetik mengenai jeruk Indonesia masih kurang karena banyaknya varietas dari jeruk yang belum diketahui genomnya. Metode *Doyle and Doyle* yang ditemukan dapat digunakan untuk sampel dengan ukuran besar pada tanaman-tanaman yang berbeda, termasuk pada monokotil dan dikotil (Doyle and Doyle, 1987). *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA genom tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol. Penggunaan bufer CTAB sebagai

pengganti nitrogen cair untuk ekstraksi dapat menghasilkan produk DNA yang berkualitas. Bufer CTAB cukup memenuhi syarat untuk digunakan dalam ekstraksi DNA tanaman yang mengandung karbohidrat dan fenol tinggi karena tidak merusak DNA (Porebski *dkk.*, 1997). Bufer CTAB dengan kandungan garam yang tinggi dapat memisahkan polisakarida dari dinding sel (Surzycki, 2000). CTAB bekerja dengan mengendapkan asam nukleat dan polisakarida asam dalam larutan kekuatan ionik rendah, sedangkan protein dan polisakarida netral tetap berada dalam larutan.

Isolasi DNA merupakan salah satu tahap penting dalam kegiatan memperoleh informasi genetik dan analisis genetik. DNA dengan kualitas yang baik digunakan untuk kegiatan seperti pemanfaatan marka molekuler, pembuatan pustaka genom, hingga sekuensing. Prinsip isolasi DNA terdiri dari tiga tahapan, yaitu: lisis dinding dan membran sel, pemisahan atau purifikasi DNA, dan presipitasi DNA (Yuwono, 2005; Travers and Muskhelishvili, 2015; Dairawan, 2020).

Permasalahan utama yang sering muncul dalam proses isolasi DNA tanaman adalah kandungan senyawa polisakarida, polifenol, protein, RNA, dan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman yang dapat menghambat tahapan isolasi DNA (Varma *dkk.*, 2007).

Metode *Doyle and Doyle* dengan penambahan CTAB yang digunakan pada penelitian bertujuan untuk memudahkan dalam ekstraksi DNA tanaman. Keunggulan metode *Doyle and Doyle* adalah mudah, biaya murah, cepat serta hasil isolasi DNA memiliki kemurnian dan konsentrasi yang baik dibandingkan dengan metode isolasi tanaman lainnya. Namun utamanya adalah metode tersebut mampu mengatasi kandungan senyawa lain dalam daun jeruk yang dapat menghambat tahap isolasi DNA. Isolasi DNA daun jeruk bali merah (*Citrus maxima* Merr.) diharapkan dapat membantu pemulia tanaman dalam mengembangkan varietas jeruk yang lebih unggul. Dari latar belakang tersebut, maka penelitian yang akan dilakukan bertujuan untuk Memperoleh isolat DNA daun jeruk bali merah menggunakan modifikasi

metode *Doyle and Doyle*. Selain itu juga ingin diketahuikualitas dan kualitas DNA jeruk bali merah yang diisolasi menggunakan modifikasi metode *Doyle and Doyle*.

2. Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel daun jeruk bali merah (*Citrus maxima* Merr.) dari Tegal sebagaimana diperlihatkan pada Gambar 1. , *gel ice*, alkohol 70%, bufer ekstraksi *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) 28 ml, kloroform isoamyl alkohol (CIA) 3,5 ml, isopropanol dingin 3,5 ml, bufer *Tris-Asetat-EDTA* 2,1 ml, sodium asetat 3M 0,1 ml, etanol 3,5 ml, dan akuades.



Gambar 1. Jeruk Bali Merah (Pangestuti, 2009)

Sampel daun jeruk bali merah yang diambil, yaitu daun yang tidak terlalu tua dan daun sehat. Sampel diletakkan di dalam plastik dan diberi label. Sampel disimpan didalam kulkas agar tidak layu sebelum diekstraksi.

Isolasi DNA Daun Jeruk Bali dengan modifikasi Metode *Doyle and Doyle*

Sebanyak 0,4 gr daun jeruk bali merah yang telah dipotong kecil-kecil dimasukkan ke dalam mortar. Sampel daun digerus diatas mortar dan *pestle* yang dibawahnya diberi *gel ice*. Kemudian, sebanyak 4 ml CTAB ditambahkan secara bertahap kedalam sampel menggunakan mikropipet. Sebanyak 500 µl sampel yang telah dicampur CTAB dimasukkan

kedalam tube. Inkubasi sampel selama satu jam dan sampel dibolak-balik tiga kali setiap 10 menit. Sampel ditambah dengan CIA konsentrasi 24:1 sebanyak 500 µl. Kemudian sampel di *vortex* selama satu menit dan dilanjutkan sentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifugasi membentuk tiga lapis, lapisan paling bawah berwarna hijau tua, lapisan tengah berwarna hijau muda, dan lapisan atas berwarna kuning bening. Lapisan atas atau supernatan diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke tube baru. Supernatan ditambah dengan isopropanol dingin sebanyak 500 µl untuk presipitasi DNA. Sampel diinkubasi dalam suhu -20°C. Sampel yang telah diinkubasi, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifugasi berupa pelet dan supernatan. Supernatan dibuang, sisakan pelet didalam tube dan dikering-anginkan. Kemudian, sampel ditambah dengan bufer TE sebanyak 250 µl, sodium asetat 20 µl, dan etanol absolut 500 µl. Inkubasi selama 30 menit pada suhu -20°C. Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan sisakan pelet dalam tube. Lalu, sampel dikering-anginkan selama 10 menit. Sampel ditambah dengan alkohol 70% sebanyak 200 µl ke dalam tube lalu tunggu selama 5 menit agar kontaminan hilang. Alkohol pada tube dibuang dan pelet dikering-anginkan. Sampel DNA ditambahkan bufer TE 50 µl dan simpan sampel pada suhu -20°C.

Uji Kuantitatif dan kualitatif DNA menggunakan NanoDrop

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan dengan menggunakan NanoDrop. Tahapannya dimulai dengan mengaktifkan perangkat lunak NanoDrop yang dihubungkan pada komputer. Setelah terhubung pada komputer, dipilih kotak *Nucleic Acids*, lalu

lengan NanoDrop dibuka. Sebanyak 1 µl larutan blanko berupa bufer TE diteteskan ke penampang NanoDrop, kemudian pada program dipilih blank. Penampang NanoDrop dibersihkan, kemudian dimasukkan sebanyak 1 µl larutan sampel ke dalam penampang larutan NanoDrop. Lengan NanoDrop kemudian ditutup dan dipilih *measure*. Hasil sampel DNA pada NanoDrop dapat dilihat pada layar computer

3. Hasil dan pembahasan

Penelitian dilakukan dengan modifikasi metode *Doyle and Doyle* pada daun jeruk bali merah. Keberhasilan isolasi DNA bergantung pada metode isolasi yang digunakan (Ali, 2013; Elkins, 2013; Aboul-Maaty, 2019; Gupta, 2019; Dairawan, 2020).

Dalam penelitian kali ini, metode untuk mengisolasi DNA daun jeruk bali menggunakan modifikasi metode *Doyle and Doyle* dengan penambahan CTAB (Doyle and Doyle, 1987). Menurut Fardilla dkk (2017), metode *Doyle and Doyle* menggunakan larutan bufer ekstraksi *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) yang di pre-inkubasi pada suhu 65°C, kloroform isoamyl alkohol (CIA), isopropanol dingin, etanol absolut, H₂O steril, dan ddH₂O.

Sampel DNA daun jeruk bali merah yang telah diisolasi menghasilkan sampel yang berwarna bening. Warna bening menandakan terdapat DNA pada bagian bawah tube. Sampel kemudian diuji kemurnian serta konsentrasinya secara kuantitatif menggunakan NanoDrop. Hasil dari uji NanoDrop dapat dilihat pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1 Hasil Spektrofotometer DNA Daun Jeruk Bali Merah (*Citrus maxima* Merr.)

No.	Nama Sampel	Konsentrasi (ng/µl)	λ ₂₆₀	λ ₂₈₀	λ ₂₆₀ /λ ₂₈₀
1.	JB 2	493,3	9,866	5,211	1,89
2.	JB 5	410,9	8,217	4,686	1,75
3.	JB 6	220,8	4,415	2,287	1,93

Berdasarkan Tabel 1.1, DNA yang diperoleh dari isolat daun jeruk bali merah menunjukkan bahwa dari tiga ulangan, sampel JB 6 memiliki kemurnian tertinggi, sedangkan JB 5 memiliki kemurnian terendah. Konsentrasi DNA pada setiap sampel tinggi sehingga dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut. Menurut Sambrook *et al.*, (2001), DNA digolongkan berkualitas baik apabila berdasarkan uji nanodrop memiliki kemurnian 1,8 – 2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/µl. Meskipun tahapan pada masing-masing sampel sama, namun hasil akhir konsentrasi dan kemurnian setiap sampel berbeda. Hal ini dapat dipengaruhi oleh penambahan sejumlah

bufer yang sama saat presipitasi DNA padahal

masing-masing sampel memiliki kandungan DNA yang berbeda. Selain itu, proses pencucian dengan etanol juga dapat mempengaruhi konsentrasi dan kemurnian DNA. Semakin banyak sampel dicuci dengan etanol, kemurnian DNA semakin tinggi, namun konsentrasi DNA semakin turun. Menurut Gokarn (2016), peningkatan konsentrasi etanol menurunkan kelarutan molekul besar seperti karbohidrat, protein, dan asam nukleat. Namun, dari ketiga polimer tersebut, asam nukleat adalah yang paling larut dalam etanol. Pada metode isolasi DNA, pengendapan DNA terjadi saat konsentrasi etanol 67-70%. Lebih lanjut Hearn (2010) menyebutkan, konsentrasi ion natrium yang lebih tinggi menghasilkan larutan keruh pada penambahan alkohol. Larutan yang kurang pekat menyebabkan lebih sedikit DNA yang

mengendap. Isopropanol dingin lebih baik digunakan daripada alkohol 70%. Pengkocokan dengan sentrifugasi menyebabkan lebih banyak DNA yang diendapkan. Saat tabung dikocok, larutan mulai berputar dan endapan DNA tampak menggulung ke atas, lebih banyak DNA mengendap. Proses ini menghasilkan produksi DNA dalam jumlah yang lebih besar.

Analisis kualitas dan kuantitas hasil isolasi DNA dilakukan menggunakan NanoDrop spektrofotometri. Menurut Prayogo *dkk.* (2020), konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dihitung dengan membutuhkan alat yang dikenal sebagai spektrofotometer. Prinsip metode spektrofotometer sinar absorbansi UV adalah pemanfaatan panjang gelombang tertentu yang dapat ditangkap oleh molekul DNA. Menurut Healey *dkk.* (2014) untuk kegiatan molekuler berbasis NGS (*Next Generation Sequencing*) dibutuhkan DNA dengan perbandingan $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ antara 1,8–2,0. Menurut Sambrook *dkk.* (1989) bahwa kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan dalam analisis molekuler DNA. Angka yang memiliki nilai perbandingan $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ kurang dari 1,8 menunjukkan adanya kontaminan fenol atau senyawa protein yang ikut terbawa selama proses ekstraksi berlangsung. Sedangkan jika rasionya lebih dari 2,0 maka DNA masih mengandung RNA. Nilai DNA yang tidak murni dapat disebabkan oleh fenol karena serapan maksimal fenol berada di panjang gelombang 270 nm dan mampu memberikan serapan di panjang gelombang 260 nm (Wirajana *dkk.*, 2013). Rasio absorbansi $\lambda_{260}/\lambda_{230}$ adalah indikator untuk *microarrays*. Rentang rasio $\lambda_{260}/\lambda_{230}$ adalah 1,8 hingga 2,2. Nilai rasio $\lambda_{260}/\lambda_{230}$ dapat digunakan untuk membantu mengevaluasi keberadaan senyawa garam, protein, guanidin HCL, EDTA, lipid, dan fenol. Semakin rendah nilainya, semakin tinggi jumlah kontaminan (Olson *dkk.* 2012; Lucena *dkk.* 2016). Lebih lanjut Iqbal (2016), menyebutkan bahwa nilai konsentrasi tinggi belum tentu nilai kemurniaannya tinggi. Jika nilai λ_{260} yang merupakan nilai untuk DNA tinggi maka nilai konsentrasi akan tinggi. Nilai kontaminan untuk kemurnian DNA dipengaruhi oleh nilai λ_{280} sehingga meskipun nilai konsentrasi DNA tinggi bukan berarti nilai kemurnian akan tinggi juga.

Isolasi DNA merupakan tahap awal dari penelitian genetika. Isolasi DNA jeruk pada penelitian ini menggunakan metode *Doyle and Doyle* yang dimodifikasi menghasilkan kemurnian dan konsentrasi DNA yang dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut. Hasil yang diperoleh hampir elaras dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Kusumaningrum *et al.*, (2018). Modifikasi metode *Doyle and Doyle* banyak dilakukan untuk jenis tanaman yang memiliki kandungan polisakarida yang tinggi. Penelitian terdahulu oleh Nugroho (2016) yang memodifikasi metode CTAB dengan menghilangkan nitrogen cair dan penambahan konsentrasi untuk PVP 2%, natrium metasulfit 0,3%, sukrosa 2 %, dan asam askorbat 40mM pada isolasi tanaman jarak (*Jatropha* sp.) menghasilkan rata-rata kemurnian DNA 1,9 serta konsentrasi DNA berkisar 100-300 ng/ μ l, metode *Doyle and Doyle* berhasil dilakukan untuk mengisolasi DNA pisang Rajalawe, nilai kemurnian DNA pada sampel menunjukkan DNA telah murni karena berkisar diantara 1,8 hingga 2,0 yaitu 1,96 (Fardilla, 2017; metode modifikasi CTAB juga dilakukan oleh Jose and Usa (2000); Ardiana (2007); Ribeiro and Lovato (2007); Syafaruddin dan Tri (2011); Ferniah dan Pujiyanto (2013) ; Healey *et al.*, (2014); Fardilla *dkk.*, (2017); Harahap (2017) dan Maaty (2019) dengan melakukan perbandingan metode CTAB klasik terhadap beberapa tanaman pertanian seperti *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, *Capsium annuum*, *Cucurbitales maxima*, *Cucumis sativus*, *Lupinus lupinus*, *Lens culinaris*, *Triticum aestivum*, dan *Gossypium arboretum* menunjukkan bahwa metode CTAB klasik memiliki kemurnian DNA rata-rata dibawah 1,8, sedangkan pada metode yang dimodifikasi nilai kemurnian DNA 2,08-2,33. Namun, tidak semua tanaman dapat diisolasi dengan metode *Doyle and Doyle* karena meskipun pada spesies tanaman tertentu berhasil belum tentu metode tersebut dapat digunakan pada spesies tanaman lain. Menurut Ediwirman (2009), suatu prosedur yang sesuai untuk suatu spesies belum tentu dapat digunakan untuk spesies yang lain. Untuk mencapai hasil yang optimal penggunaan metode purifikasi menjadi salah satu bagian penting, selain mempertahankan kondisi jaringan tanaman tidak rusak. Secara umum isolasi DNA jeruk bali merah

menggunakan modifikasi Metode Doyle dan Doyle telah berhasil memperoleh DNA dengan kualitas dan kualitas yang cukup baik. Hasil isolasi DNA yang diperoleh nantinya akan digunakan pada tahap analisis genetik selanjutnya.

Kesimpulan

Teknik isolasi DNA menggunakan modifikasi metode *Doyle and Doyle* dengan penambahan CTAB dapat digunakan untuk isolasi DNA pada tanaman jeruk bali merah (*Citrus maxima* Merr.) yang memiliki kandungan polisakarida yang tinggi. Hasil uji kualitatif dan kuantitatif menunjukkan sampel DNA jeruk bali merah memiliki konsentrasi terbesar 220,8ng/μl, sedangkan nilai kemurnian tertinggi pada rasio λ260/λ280 sebesar 1,93.

Ucapan terimakasih

Tim Penulis mengucapkan terimakasih karena penelitian ini telah dibiayai oleh Fakultas Sains dan Matematika sesuai dengan Surat Penugasan Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Sumber dana selain APBN FSM Tahun Anggaran 2020 nomor 1971/UN7.5.8/PP/2020 tanggal 2 Maret 2020

Daftar Pustaka

- Aboul-Maaty, N.A., Hanaa, A.O. 2019. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*. 43(35):1-10.
- Ali, N. 2017. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *BioMed Research International*. 1-13.
- Ardiana, D.W. 2009. Isolasi DNA genom pepaya dan jeruk menggunakan bufer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian*. 14(1):12-16.
- Badan Pusat Statistik. 2018. Statistik tanaman buah-buahan dan sayuran tahunan Indonesia 2018. Jakarta : Badan Pusat Statistik.
- Dairawan, M., Preetha, J.S. 2020. The evolution of DNA extraction methods. *America Journal of Biomedical Science and Research*. 39-46.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19(1):11-15.
- Ediwirman, E., Ellina, M. 2009. Optimasi metode isolasi DNA genom pada tanaman kapulasan. *Jurnal Agroekoteknologi*. 1(1):7-11.
- Elkins K. 2013. DNA Extraction. *Forensic DNA Biology*. 39-52.
- Fardilla, F.P., Kusumaningrum, H.P., Wijanarka. 2017. Identifikasi molekuler tanaman pisang rajalawe berdasarkan gen Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Biologi*. 6(1):21-28.
- Ferniah, R.S., S. Pujiyanto. 2013. Optimasi isolasi DNA cabai (*Capsicum annum L.*) berdasar perbedaan kualitas dan kuantitas daun serta teknik penggerusan. *Jurnal Bioma*. 156(1):14-19.
- Gokarn, K. 2016. Ethanol extraction method for DNA isolation from *Mycobacterium smegmatis*. *International Journal of Current Research*. 8(9):39013-39015.
- Gupta, N. 2019. DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*. 36(2):116-117.
- Harahap, A.S. 2017. Uji kualitas dan kuantitas DNA beberapa populasi pohon kapur Sumatera. *Journal of Animal Science and Agronomy Panca*. 2(2):1-6.
- Healey A, Furtado A, Cooper A, Henry RA. 2014. Protocol: A simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*. 10:21.
- Hearn, R.P. 2010. DNA extraction techniques for use in education. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 38(3):161-166.
- Iqbal, M., Ibnu, D.B., Nia, K. 2016. Analisis perbandingan metode isolasi DNA untuk deteksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada udang Vaname

- (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*. 8(1):54-65.
- Jose, J. and R. Usha. 2000. Extraction of geminiviral DNA from a high mucilaginous plant (*Abelmoschus esculentus*). *Plant Mol.Biol.Rep.* 18:349-355.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2020. Data komposisi pangan Indonesia. <https://www.panganku.org/>. Diakses tanggal 30 Juli 2020.
- Kusumaningrum, HP., A. Budiharjo, A. Suprihadi, Y. Eshananda, A. Fadillah, dan D.R. Pangestuti. The characterization of *Citrus* sp. from Parang Island Karimunjawa based on morphological, DNA barcoding and nutritional analysis. *International Journal of Genetic and Molecular Biology* 10(3):26-38
- Martasari, C. 2008. Teknik identifikasi varietas jeruk. *Iptek Hortikultura* no. 4.
- Nugroho, K. 2016. Metode ekstraksi DNA pada *Jatropha* spp. tanpa menggunakan nitrogen cair. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 22(4):159-161.
- Olson, N.D., Jayne, B.M. 2012. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*. 5(668):1-14.
- Reuther, S., L.G. Baily, and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:8-15.
- Prayogo, F.A., Anto, B., Kusumaningrum, H.P., Wijanarka, W., Agung, S., Nurhayati, N. 2020. Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 18:39.
- Reuther W., Webber, H.J., Batchelor, L.D. 1967. History, world distribution, botany and varieties. *The Citrus Industry* vol. 1.
- Ribeiro, R.A. and M.B. Lovato. 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genet. Mol. Res.* 6:173-187.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning Laboratory Manual 3rd Ed.* New York : Cold Spring Harbour Lab. Press.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Berlin :Springer-Verlag.
- Susanto, S., Herik, S., Sri, M. 2010. Pertumbuhan vegetatif dan generatif batang atas jeruk pamele 'Nambangan' pada empat jenis interstok. *Jurnal Hortikultura Indonesia*. 1(2):53-58.
- Syafaruddin, R., E., dan Tri, J.K. 2011. Efektivitas dan efisiensi teknik isolasi dan purifikasi DNA pada jambu mete. *Buletin RISTRI*. 2(2):151-161.
- Travers, A., and Muskhelishvili, G. 2015. DNA structure and function. *FEBS Journal*. 2279-2295.
- USDA. 2020. Classification of *Citrus maxima* Merr. <https://plants.usda.gov/>. Diakses tanggal 30 Juli 2020.
- Varma, A., H. Padh, and N. Shrivastava. 2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Journal Biotechnology*. 2: 386-392.
- Vijaylakshmi, P., Radha, R. 2015. An overview: *Citrus maxima*. *The Journal of Phytopharmacology*. 4(5):263-267.
- Wirajana, I N., Yuliana, D. A., dan Ratnayani, K. 2013. Isolasi DNA metagenomik dari tanah hutan mangrove Pantai Suwung Bali. *Jurnal Kimia*. 7(1):19-24.
- Yuwono. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta : Penerbit Erlangga.