

Seleksi Primer RAPD Untuk Analisis Keragaman Genetik Tanaman Pisang (*Musa spp.*)RAPD Primers Selection for Genetic Variation Analysis of Banana Plant (*Musa spp.*)I Ketut Catur Wiguna ¹⁾, Made Pharmawati ²⁾ *)

1) Program Studi Magister Biologi, Fakultas MIPA Universitas Udayana, Jalan P.B. Sudirman, Denpasar, Bali

2) Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Badung, Bali

SUBMISSION TRACK

Submitted : 26-07-2021
Revised : 02-10-2021
Accepted : 04-10-2021
Published : 07-10-2021

KEYWORDS

DNA isolation,
Musa,
PCR optimation,
primer RAPD

*)CORRESPONDENCE

email:
made_pharmawati@unud.ac.id

ABSTRACT

Identification of genetic diversity using molecular markers is important for basic information for plant conservation. Banana is a fruit bearing plants that important for food sources in human life. This study aimed to determine the optimum conditions of PCR-RAPD reaction and RAPD primers that suitable to amplify DNA fragments. DNA isolation was done using modified of CTAB and chloroform isoamyl alcohol. The samples used was young leaves of nine banana cultivar plants. Optimization was done using variety of DNA and MgCl₂ concentration. Eight primers produced by Operon Primer Technology were tested. The DNA genomic concentration obtained was in the range of 23,3 ng/μl – 70 ng/μl. The optimum conditions of PCR-RAPD of banana plants that produce clear band were 50 ng/μl DNA template, 3 mM MgCl₂ with the number of thermal cycles was 40 x. There were six RAPD primers that successfully amplified DNA : OPA 02, OPA 04, OPB 12, OPD 20, OPH 01, and OPH 03. The primer OPA-04 had the lowest resolving power value (4,4), while OPH 01 had the highest (11,3) resolving power.

PENDAHULUAN

Tanaman pisang sangat bermanfaat diantaranya untuk keperluan upacara agama, sumber bahan makanan, pakan ternak, minuman, obat-obatan dan bahan baku olahan yang bernilai ekonomis (Kasijadi 2006, Usha *et al.* 2015). Identifikasi keragaman genetik pisang lokal khususnya di Bali masih sedikit dilakukan, oleh sebab itu penelitian keragaman genetik tanaman pisang perlu dilakukan untuk mempermudah identifikasi tanaman. Inventarisasi keanekaragaman genetik berbasis penanda molekuler merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengetahui keanekaragaman genetik suatu tanaman (Uslan dan Pharmawati 2015). Penanda umum yang sering digunakan adalah penanda PCR-RAPD.

PCR-RAPD merupakan teknik amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan menggunakan primer RAPD. Penanda RAPD lebih sederhana dibandingkan penanda molekuler lainnya karena membutuhkan DNA lebih sedikit (5 - 25 ng DNA) dalam reaksi PCR,

lebih cepat dalam mendeteksi polimorfisme pada sejumlah lokus, tidak memerlukan *probe* DNA spesifik dan tidak menggunakan radioisotop (Williams *et al.* 1990) Keberhasilan amplifikasi DNA pada PCR-RAPD sangat dipengaruhi oleh konsentrasi komponen reaksi PCR seperti konsentrasi DNA cetakan, MgCl₂, primer, dan jumlah siklus termal (Martida dan Pharmawati 2016). Oleh karena itu optimasi kondisi PCR-RAPD perlu dilakukan demi keberhasilan amplifikasi DNA genomik.

Terdapat 60 set operon RAPD primer 10-mer dimana masing-masing set terdiri dari 20 primer yang dapat digunakan dalam reaksi PCR-RAPD (Eurofinsgenomic, 2014). Seleksi primer yang dapat menghasilkan polimorfisme tinggi diperlukan dalam analisis variasi genetik tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum konsentrasi DNA dan MgCl₂ pada reaksi PCR-RAPD serta menyeleksi primer RAPD yang dapat mengamplifikasi fragmen DNA kultivar tanaman pisang dengan optimal.

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel

Sebanyak sembilan kultivar tanaman pisang yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari 5 lokasi kabupaten/kota di Bali yaitu Bangli, Gianyar, Klungkung, Karangasem dan Tabanan. Bahan yang digunakan yaitu daun muda segar dari sembilan kultivar tanaman pisang yaitu dari pisang “Batu”, “Mas”, “Sasih”, “Kepok”, “Susu”, “Kayu”, “Temaga”, “Gancan” dan “Kapas”. Daun ditaruh di box es untuk selanjutnya diekstrak di laboratorium.

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode CTAB (Doyle dan Doyle, 1990) yang telah dimodifikasi dengan *buffer* ekstraksi yang terdiri atas 2 % CTAB, 1,4 M NaCl, 0,2 % 2-mercaptoethanol, 50 mM ETDA, dan 100 mM Tris-HCl (pH 8) (Pharmawati, 2009). Sebanyak 0,1 g daun pisang digerus dalam 1 ml *buffer* ekstraksi. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro dan diinkubasi dalam *water bath* pada suhu 65°C selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan 500 µl klorofom:isoamilalkohol (24:1) dan divortex selama 1 menit. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dan supernatan dipindahkan ke tabung mikro yang baru. Ekstraksi dengan klorofom isoamilalkohol diulangi sekali lagi. Supernatan dipindahkan ke tabung mikro baru, kemudian ditambahkan 500 µl etanol dingin dan diinkubasi pada suhu -20°C selama satu malam.

Pelet dikoleksi dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya pelet dicuci dengan 500 µl alkohol 70% dan dikeringanginkan. Pelet yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan ditambahkan 100 µl *aquadest* steril. Setelah itu ditambahkan RNase sebanyak 2 µl dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. DNA hasil ekstraksi kemudian disimpan pada suhu -20°C.

Elektroforesis dan Penentuan Konsentrasi DNA

Elektroforesis dilakukan pada 1 % gel agarosa dalam 1 x *buffer* TAE (40 mM Tris-Asetat (pH

7,9) dan 2 mM ETDA (pH 8)) dan perwarna *ethidium bromide*. Sebanyak 4 µl DNA sampel dicampurkan dengan 1 µl *loading dye* di atas kertas parafilm, kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel. Lamda DNA dengan konsentrasi konsentrasi 100 ng dan 200 ng digunakan sebagai pembanding. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama 40 menit. Visualisasi DNA diamati dengan UV transiluminator.

Optimasi Kondisi PCR-RAPD

Optimasi kondisi PCR-RAPD dilakukan pada konsentrasi DNA dan MgCl₂. Konsentrasi DNA yang diuji yaitu 25 ng dan 50 ng sedang konsentrasi MgCl₂ adalah 2 mM. Dan 3 mM. Konsentrasi optimum DNA dan MgCl₂ terpilih digunakan untuk proses PCR-RAPD selanjutnya. Proses PCR dilakukan pada total volume 20 µl yang terdiri atas campuran 0,2 mM dNTP, 3 mM MgCl₂, 1 U *Taq DNA polymerase*, 2,5 µM primer, 50 ng DNA, 1 x *buffer* polimerase dan *aquadest*.

Delapan primer RAPD yang diuji adalah OPA 02, OPA 03, OPA 04, OPB 12, OPD 12, OPD 20, OPH 01 dan OPH 03. Amplifikasi DNA dilakukan dalam *thermocycler* dengan program siklus sebagai berikut : a) denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit sebanyak 1 kali, dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit; b) *annealing* pada suhu 36°C selama 1 menit; c) elongasi awal pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik sebanyak 40 siklus dan elongasi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit sebanyak satu kali.

Elektroforesis PCR-RAPD

Hasil PCR-RAPD dielektroforesis dengan 1 % gel agarosa dalam *buffer* TAE dengan pewarnaan *ethidium bromide*. Sebanyak 10 µl produk hasil PCR dicampur dengan 1 µl *loading dye* dan dimasukkan ke dalam sumur gel. Sebagai *size marker* dimasukkan DNA *ladder* 100 bp. Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama 40 menit. Hasil PCR-

RAPD diamati dengan UV transiluminator (Sambrook dan Russell 2001).

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan *scoring* hasil amplifikasi pita DNA yang jelas dan terang. Pita DNA yang muncul diskor 1 dan yang tidak muncul diskor 0. Keinformatifan primer diperoleh dengan menghitung nilai *resolving power* (RP) menurut Prevost dan Wilkinson (1999) dengan menggunakan rumus :

$$RP = \sum_{i=1}^n BI_i$$

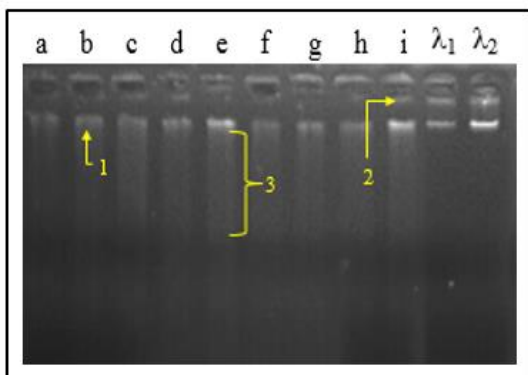
RP adalah *resolving power*, n adalah jumlah pita polimorfis, dan BI merupakan *band informativeness* yang dihitung dengan rumus :

$$BI_i = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

dimana *p* adalah proporsi dari total kultivar yang mengandung pita DNA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Elektroforesis DNA kultivar tanaman pisang menghasilkan pendaran pita DNA yang terang, beberapa pita DNA ada yang terlihat *smear* dan ada yang tertinggal di sumur gel (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA Kultivar Tanaman Pisang. (a) “Batu”, (b) “Mas”, (c) “Sasih”, (d) “Kepok”, (e) “Susu”, (f) “Kayu”, (g) “Temaga”, (h) “Gancan”, (i) “Kapas”, (λ_1) Lambda DNA 100 ng, (λ_2) Lambda DNA 200 ng, (1) Pita DNA, (2) DNA Tertinggal di Sumur Gel, (3) Pita *Smear*

Isolasi DNA menghasilkan pendaran pita DNA yang terang sedang beberapa terlihat

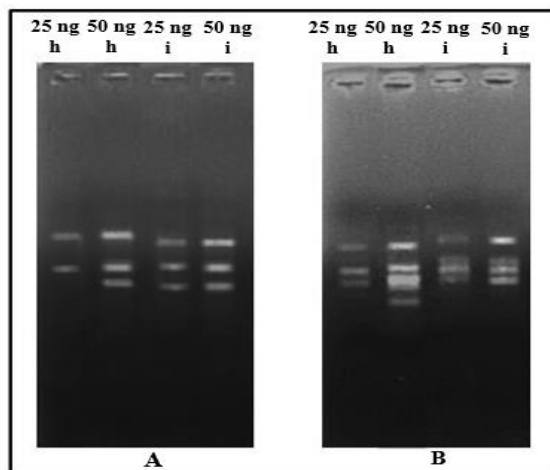
smear dan tertinggal di sumur gel. Adanya pita *smear* pada bagian bawah pita DNA genomik disebabkan oleh variasi berat molekul dari potongan DNA genomik yang terdegradasi (Prayitno dan Nuryandani, 2011). Degradasi DNA genom dapat disebabkan oleh terputusnya untaian DNA genom karena aktivitas enzim endonuklease pada proses ekstraksi (Saraswathi dan Mullainathan 2020). Sampel DNA yang tertinggal di sumur gel menandakan adanya kontaminan polisakarida yang ikut terekstrak pada sampel DNA genomik (Pharmawati, 2009). Berdasarkan perbandingan pendaran DNA sampel dengan Lambda DNA 100 ng, (λ_2) dan Lambda DNA 200 ng, konsentrasi DNA yang dihasilkan berkisar 23,3 ng/ μ l – 70 ng/ μ l.

Pada PCR-RAPD, konsentrasi DNA yang dicoba adalah 25 ng dan 50 ng dengan konsentrasi $MgCl_2$ 2 mM pada pisang “Gancan” dan “Kapas” menggunakan primer OPB 12 dan OPA 02. Penggunaan OPB 12 dan OPA 02 adalah secara acak hanya untuk menguji konsentrasi DNA yang menghasilkan produk PCR yang lebih baik. Hasil PCR menunjukkan pita DNA yang jelas dan terang pada konsentrasi DNA 50 ng pada kedua primer. Selanjutnya konsentrasi DNA 50 ng/ μ l dipilih sebagai konsentrasi optimum DNA karena mampu menghasilkan amplifikasi pita DNA dengan jumlah pita lebih banyak dan lebih terang pada kedua sampel dan primer yang diuji (Gambar 2).

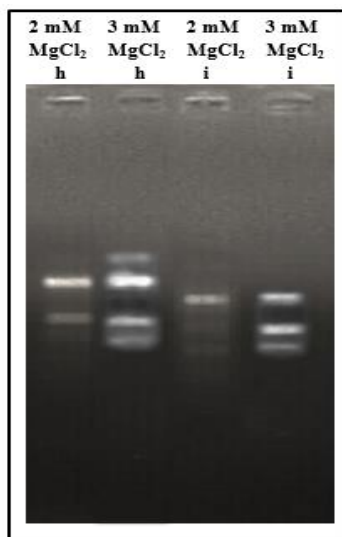
Konsentrasi $MgCl_2$ yang diuji yaitu 2 mM dan 3 mM dengan konsentrasi DNA 50 ng/ μ l menggunakan primer OPB 12. Hasil amplifikasi menunjukkan jumlah pita DNA yang lebih banyak dan terang dihasilkan pada konsentrasi $MgCl_2$ 3 mM, sehingga konsentrasi $MgCl_2$ yang dipilih adalah 3 mM (Gambar 3).

Hasil PCR-RAPD menunjukkan hanya enam primer yang mampu mengamplifikasi fragmen DNA pada seluruh kultivar tanaman pisang yaitu primer OPA 02, OPA 04, OPB 12, OPD 20, OPH 01, dan OPH 03. Primer OPA 03 menghasilkan amplifikasi yang tampak *smear*, sedangkan primer OPD 12 tidak berhasil mengamplifikasi kesembilan kultivar tanaman pisang. Gambar 4 menunjukkan hasil PCR-

RAPD menggunakan primer OPH3. Ringkasan seleksi primer RAPD ditampilkan pada Tabel 1.



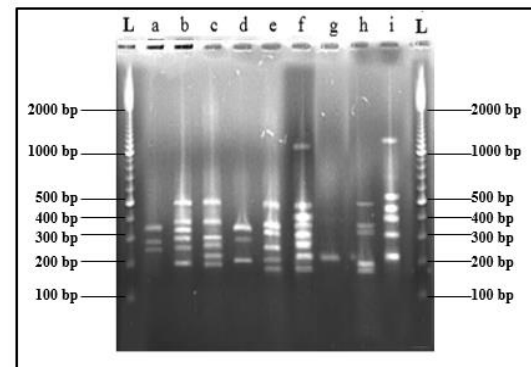
Gambar 2. Profil Amplifikasi Pita DNA pada Variasi Konsentrasi DNA. (h) Sampel DNA Pisang “Gancan”, (i) Pisang “Kapas”, (A) Primer OPB 12, (B) Primer OPA 02]



Gambar 3. Profil Amplifikasi Pita DNA pada Variasi Konsentrasi MgCl₂. (h) Pisang “Gancan”; (i) Pisang “Kapas”

Kondisi PCR-RAPD optimal dalam penelitian ini diperoleh menggunakan konsentrasi DNA 50 ng dan MgCl₂ 3 mM dengan siklus 40 kali. Hal ini didukung oleh penelitian Innis dan Gelfand (1990) yang menyatakan bahwa jumlah siklus yang sesuai pada jumlah molekul DNA 50 ng/μl berkisar antara 40-45 siklus. Konsentrasi ini dipilih karena mampu memberikan hasil amplifikasi

pita DNA yang terbaik pada sejumlah sampel yang diuji. Variasi konsentrasi DNA dan MgCl₂ memberikan pengaruh terhadap jumlah pita DNA yang dihasilkan dalam proses PCR-RAPD.



Gambar 4. Hasil Amplifikasi Menggunakan Primer OPH 03 dengan konsentrasi DNA cetakan 50 ng dan konsentrasi MgCl₂ 3 mM (L) DNA Ladder Marker 1 kb; (a) “Batu”; (b) “Mas”; (c) “Sasih”; (d) “Kepok”; (e) “Susu”; (f) “Kayu”; (g) “Temaga” (h) “Gancan”; (i) “Kapas”

Menurut Pharmawati (2009), konsentrasi DNA yang rendah dapat mengurangi peluang penempelan primer pada DNA cetakan, sebaliknya jika konsentrasi DNA terlalu tinggi dapat meningkatkan kemungkinan kontaminan yang dapat mengganggu reaksi amplifikasi pada proses PCR. Selain kuantitas dan kualitas DNA, magnesium merupakan komponen penting berpengaruh dalam amplifikasi profil pita DNA hasil PCR-RAPD. Konsentrasi MgCl₂ yang tidak tepat dapat mempengaruhi aktivitas enzim *taq DNA polimerase* dan menghambat penempelan primer tertentu pada DNA cetakan, sehingga menyebabkan beberapa pita DNA tidak muncul (Lorenz 2012).

Amplifikasi DNA berhasil terjadi pada kesembilan sampel pisang pada enam primer, sedangkan dua primer tidak berhasil mengamplifikasi kesembilan sampel pisang. Keberhasilan amplifikasi DNA disebabkan oleh keberhasilan primer menempel pada sekuen DNA dengan sempurna dan tepatnya konsentrasi komponen PCR RAPD (Ali *et al.* 2006), Pharmawati 2009, dan Randriani *et al.* 2012).

Hal lain yang juga berpengaruh dalam keberhasilan amplifikasi DNA adalah kandungan basa GC pada primer RAPD yang digunakan. Semakin banyak kandungan GC maka akan semakin tinggi suhu *annealing* yang digunakan dalam proses PCR (Nadeem *et al.*, 2018). Semakin optimal suhu *annealing* maka akan semakin kuat primer tersebut untuk berikatan. Pada penelitian ini dengan suhu *annealing* 36°C, primer yang mempunyai kandungan GC 70 %, mampu mengamplifikasi fragmen DNA pada seluruh kultivar tanaman pisang. Pada primer yang mempunyai kandungan GC 60%, terdapat dua primer yang tidak mampu mengamplifikasi fragmen DNA pada semua kultivar. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh faktor lain seperti spesifikasi dari primer tertentu.

Pita DNA hasil amplifikasi enam primer RAPD kemudian diskor dan dihitung jumlah pita DNA yang dihasilkan, persentase polimorfisme dan nilai *resolving power* dari seluruh primer (Tabel 2). Keseluruhan jumlah pita DNA yang berhasil diamplifikasi berjumlah 88 pita dengan kisaran ukuran pita 82-1500 bp dan persentase polimorfisme 100 %. Nilai *resolving power* yang dihasilkan dari 4,4 sampai 11,3.

Semakin tinggi nilai *resolving power* maka semakin baik primer tersebut dalam mengamplifikasi DNA (Choudhary *et al.*, 2014; Usha *et al.*, 2015). Nilai *resolving power* pada setiap primer dapat bervariasi tergantung dari proporsi jumlah sampel yang menghasilkan pita DNA. Perhitungan ini ke depan dapat digunakan untuk melihat perbandingan antar primer dan membantu dalam proses pemilihan primer. Hasil penelitian ini selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk analisis keanekaragaman dan identifikasi molekuler pada kultivar tanaman pisang.

KESIMPULAN

Isolasi DNA genomik pada kultivar tanaman pisang menghasilkan DNA dengan konsentrasi DNA berkisar antara 23,3 ng/μl – 70 ng/μl. Kondisi optimum untuk PCR-RAPD pada

kultivar tanaman pisang adalah menggunakan konsentrasi DNA 50 ng dan MgCl₂ 3 mM. Hasil seleksi primer RAPD diperoleh enam primer yang mampu mengamplifikasi fragmen DNA pada semua kultivar tanaman pisang yaitu primer OPA 02, OPA 04, OPB 12, OPD 20, OPH 01, dan OPH 03, dengan jumlah pita DNA dihasilkan adalah 88 pita dan keseluruhan polimorfisme 100 %, dengan nilai *resolving power* terendah terdapat pada primer OPA 04 sedangkan nilai *resolving power* tertinggi terdapat pada primer OPH 01.

Tabel 1. Ringkasan PCR-RAPD Sembilan kultivar pisang dengan delapan primer RAPD

Nama Primer	Sekuens (5'-3')	Kandungan GC (%)	Hasil Amplifikasi	Jumlah Pita DNA	Ukuran pita DNA (bp)
OPA 02	TGCCGAGCTG	70	Mengamplifikasi sembilan kultivar pisang	15	82, 145, 165, 180, 190, 200, 220, 245, 300, 365, 400, 450, 500, 540, 625.
OPA 03	AGTCAGCCAC	60	<i>Smear</i> sembilan kultivar pisang	0	-
OPA 04	AATCGGGCTG	60	Mengamplifikasi sembilan kultivar pisang	7	230, 250, 300, 340, 400, 500, 580.
OPB 12	CCTTGACGCA	60	Mengamplifikasi sembilan kultivar pisang	15	105, 115, 130, 180, 200, 260, 280, 300, 340, 360, 400, 450, 500, 560, 700, 280, 300, 480.
OPD 12	CACCGTATCC	60	Mengamplifikasi tiga kultivar pisang	3	280, 300, 480.
OPD 20	ACCCGGTCAC	70	Mengamplifikasi sembilan kultivar pisang	17	130, 170, 180, 190, 200, 220, 225, 300, 380, 400, 440, 500, 530, 600, 625, 750, 900.
OPH 01	GGTCGGAGAA	60	Mengamplifikasi sembilan kultivar pisang	14	380, 400, 440, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1400, 1500.
OPH 03	AGACGTCCCG	70	Mengamplifikasi sembilan kultivar pisang	20	140, 150, 170, 180, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 300, 330, 360, 420, 460, 500, 640, 1230.

Tabel 2. Primer RAPD yang Mampu Mengamplifikasi Sembilan Kultivar

Nama Primer	Sekuens (5'-3')	Jumlah Pita DNA	Jumlah Pita Polimorfis	Persentase Polimorfisme (%)	Resolving Power (RP)
OPA 02	TGCCGAGCTG	15	15	100	7,8
OPA 04	AATCGGGCTG	7	7	100	4,4
OPB 12	CCTTGACGCA	15	15	100	6,4
OPD 20	ACCCGGTCAC	17	17	100	6,0
OPH 01	GGTCGGAGAA	14	14	100	11,3
OPH 03	AGACGTCCCG	20	20	100	9,8
Total		88	88	-	45,7

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, B.A., Huang, T.H., Salem, H.H. and Xie, Q.D. 2006. Influence of Thermal Cycler Day to Day Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprints. *Biotechnology* 5: 324-329
- Choudhary, R., Keshavachandran, R., Menon, R., Khalekar, G., Singh, N., and Maruthiyottu, D. 2014. Molecular Variability of Plantain Ecotypes from the Genus *Musa* (Musaceae). *Turkish Journal of Botany* 38: 827-834.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Eurofinsgenomic. 2014. RAPD 10mer KITS. https://eurofinsgenomics.eu/media/1610370/rapd_10mer_kits_sequences.pdf
- Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J.J. and White T.J. 1990. *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. New York : Academic Press Incorporated.
- Kasijadi, F. 2006. Penerapan Agribisnis Berbasis Pisang Spesifik Lokasi Pisang Mas dan Agung, Jawa Timur : Balai Pengkajian Teknologi Pertanian.
- Lorenz, T. C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments : JoVE* (63), e3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Martida, V., dan Pharmawati, M. 2016. Pemilihan Primer RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pada PCR (Polymerase Chain Reaction) Tanaman Kamboja (*Plumeria* sp.). *Sombiosis* 4(1):16-18
- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., , Doğan, Y., Comertpay G., Yıldız M., Hatipoğlu R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane N., Özkan H., Chung G., and Baloch F.S. 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 32(2): 261–285.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi Ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. *Jurnal Biologi* 13(1): 12-16.
- Prayitno, E. dan Nuryandani E. 2011. Optimalisasi Ekstraksi DNA Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Melalui Pemilihan Daun yang Sesuai. *Bioteknologi* 8(1): 24-31.
- Prevost, A., Wilkinson, M.J. 1999. A New System of Comparing PCR Primers Applied to ISSR Fingerprinting of Potato Cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 107–112.
- Randriani, E., Tresniawati, C., dan Syafaruddin. 2012. Pemanfaatan Teknik Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Unruk Pengelompokan Secara Genetik Plasma Nutfah Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L.). *Buletin RISTR* 3(1): 1-6.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saraswathi, U., and Mullainathan, L. 2020. Extraction of high-quality genomic DNA and identification of different DNA barcoding markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Buletin Agroteknologi* 1(1): 7-11
- Usha, K., Moahnty, S.K., Roy, P.S, Behera, L. And Chand, P.K. 2015. Genetic Diversity among Banana Cultivars from Odisha using RAPD Markers. *Science Research Article* 5(2): 118-124.
- Uslan dan Pharmawati, M. 2015. Optimasi Konsentrasi DNA dan MgCl₂ pada Reaksi Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA untuk Analisis Keragaman Genetik Tanaman Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br). *Jurnal Bioslogos* 5(1): 26-34.
- Williams, J. G., Kubelik, A.R., Livak, K. J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.J. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Promers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.