



Optimasi Metode Ekstraksi DNA pada Melon (*Cucumis melo* L.) Berdasarkan Suhu, Lama Inkubasi, dan Kondisi Daun

Optimization of DNA Extraction Method on Melon (*Cucumis melo* L.) Based on Temperature, Incubation Time and Condition of Leaf

Dewi Retnaningati

*Prodi Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta
Jl. Babarsari no. 44, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia
Email: dewi.retnangingati@uajy.ac.id*

Abstract

Melon is a fruit commodity that has high economic value and is in demand by the community, so it has the potential to be developed. Therefore it is necessary to study various sciences, one of which is the molecular approach. DNA is an essential element in molecular research. The right extraction technique will determine the quality and quantity of DNA produced. The temperature and incubation time applied in the DNA extraction technique, as well as the quality of the leaves as a source of plant DNA, are among the determining factors for the quality and quantity of extracted DNA, so it is necessary to carry out an assessment and optimization. This study aims to assess the optimal temperature and incubation time in extracting DNA from material (melon leaves) under different conditions. Research activities include planting melon seeds, collecting leaf samples, DNA extraction and quantitative DNA testing. The results showed that the concentration and purity of DNA extracted from cold leaves was higher than that from fresh leaves. The highest DNA concentration was obtained from the 65 ° C incubation treatment for 20 minutes, namely 2707.6 ng / µl, and the highest DNA purity was obtained from the 70 ° C incubation treatment for 10 minutes, namely 1.94 from leaf material that had been cooled overnight at a temperature of -20 ° C .

Keywords: DNA extraction, DNA isolation, melon DNA, DNA incubation, plant DNA samples

Abstrak

Melon merupakan salah satu komoditas buah yang bernilai ekonomi tinggi dan diminati masyarakat, sehingga potensial untuk dikembangkan. Oleh karenanya perlu pengkajian dari berbagai ilmu salah satunya dengan pendekatan molekuler. DNA merupakan unsur yang cukup esensial dalam riset molekuler. Teknik ekstraksi yang tepat sangat menentukan kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan. Suhu dan lama inkubasi yang diterapkan dalam teknik ekstraksi DNA, serta kualitas daun sebagai sumber DNA tanaman merupakan salah satu faktor penentu kualitas dan kuantitas DNA hasil ekstraksi, sehingga perlu dilakukan pengkajian dan optimasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji suhu dan lama inkubasi yang optimal dalam mengekstraksi DNA dari bahan (daun melon) dengan kondisi yang berbeda. Kegiatan penelitian meliputi penanaman benih melon, koleksi sampel daun, ekstraksi DNA dan uji kuantitatif DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi dari daun dingin lebih tinggi dibandingkan dari daun segar. Konsentrasi DNA tertinggi diperoleh dari perlakuan inkubasi 65°C selama 20 menit, yaitu 2707.6 ng/µl, dan kemurnian DNA tertinggi diperoleh dari perlakuan inkubasi 70°C selama 10 menit, yaitu 1.94 dari bahan daun yang sudah didinginkan semalaman pada suhu -20°C.

Kata Kunci : Ekstraksi DNA, Isolasi DNA, DNA Melon, inkubasi DNA, Sampel DNA Tanaman

Diterima: 20 Maret 2020, disetujui: 30 Mei 2020

Pendahuluan

Melon merupakan salah satu komoditas buah dari famili Cucurbitaceae yang bernilai ekonomi tinggi dan diminati masyarakat, sehingga potensial untuk dikembangkan. Pengkajian sifat/karakter dari suatu kultivar melon tidak hanya dilihat dari karakter morfologisnya saja, tetapi dapat pula dianalisis pada aras molekuler untuk mengetahui variasi genetiknya. Sesuai dengan perkembangan teknik genetika molekuler, variasi genetik dapat diketahui melalui analisis DNA-nya (Garcia *et al.*, 2000). Penggunaan teknik molekuler dalam pemuliaan tanaman dapat mempermudah proses introgresi suatu gen dari satu individu ke individu lain. Pengembangan marka molekuler yang terpaut gen tertentu juga dapat membantu mengurangi ukuran populasi dan waktu yang diperlukan dalam program pemuliaan tanaman per siklus seleksi (Syukur *et al.*, 2012).

Sel tanaman dilindungi oleh membran dan dinding sel. Membran sel terdiri dari ikatan antara protein dan lemak, sedangkan dinding sel tersusun atas polisakarida. Membran dan dinding sel harus dihancurkan untuk mengeluarkan DNA-nya. Penghancuran sel dapat dilakukan secara mekanik, kimiawi maupun enzimatik. Proses penghancuran sel dipengaruhi oleh kuantitas dan kualitas sampel, serta teknik penghancurannya (Ferniah, 2013).

Ekstraksi DNA dari tumbuhan dilakukan melalui proses penghancuran dinding sel (*lysis of cell walls*), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa serta penghilangan protein dan RNA (*cell digestion*), dan pengendapan DNA (*precipitation of DNA*) (Nicholl, 1993; Surzycki, 2000; Ling & Feldman, 2010). Proses ekstraksi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen seluler lain seperti protein, RNA, dan lemak. Pada dasarnya beberapa metode ekstraksi DNA memiliki prinsip yang sama, namun dapat dilakukan modifikasi untuk menghancurkan inhibitor yang ada di dalam masing-masing sumber spesimen. Optimasi prosedur tersebut dapat dilakukan terhadap suhu dan lama inkubasi yang digunakan dalam proses ekstraksi DNA (Langga *et al.*, 2012).

Beberapa teknik dan prosedur ekstraksi DNA telah dipublikasikan, namun

tidak selalu dapat diaplikasikan pada jenis bahan yang berbeda karena genus atau bahkan spesies tanaman bersifat sangat spesifik, sehingga modifikasi metode standar diperlukan dalam mengekstraksi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji suhu dan lama inkubasi yang optimal dalam mengekstraksi DNA dari bahan (daun melon) dengan kondisi yang berbeda.

Metode Penelitian

Penyiapan Sampel Tanaman Melon

Benih melon direndam dalam akuades steril, lalu disemai dalam kotak persemaian. Benih yang dipilih adalah benih yang tenggelam saat perendaman. Penyemaian dilakukan di dalam *green house* dengan suhu 25-28 °C dan penyiraman teratur setiap pagi hari. Penyemaian dilakukan sampai tumbuh 2 daun sempurna. Selanjutnya tanaman dipindahkan ke pot yang berisi media tanah. Perawatan tanaman dilakukan dengan penyiraman setiap hari, pemupukan seminggu sekali, dan penyemprotan fungisida tiap 2 minggu sekali. Setelah tanaman berumur kurang lebih 4-5 minggu, daun dapat dikoleksi untuk keperluan ekstraksi DNA.

Koleksi sampel daun

Daun tanaman melon yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah daun ke-4 dari apikal yang segar dan bebas infeksi jamur maupun virus. Pemilihan daun yang bebas infeksi jamur dan virus dimaksudkan agar DNA yang diperoleh tidak terkontaminasi asam nukleat dari jamur maupun virus (Huda, 2013). Daun ditimbang masing-masing 0,5 g. Daun segar langsung dilakukan isolasi DNA, sementara sampel daun lainnya disimpan semalam dalam suhu -20°C dahulu sebelum dilakukan ekstraksi DNA. Perlakuan ini digunakan sebagai pengganti nitrogen cair dalam teknik penggerusan yaitu daun didinginkan terlebih dahulu (Ferniah, 2013).

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA tanaman melon dilakukan menurut prosedur kit ekstraksi DNA (*Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit*) dengan modifikasi. Daun digerus dalam mortar sampai lembut, untuk merusak dinding sel. Proses pelisisan sel

dilakukan dengan menambahkan 500 μL Reagen *PHYTOPURE* I dalam mortar, kemudian diratakan dan digerus kembali secara perlahan. Campuran yang telah halus dituangkan ke dalam *tube* 1,5 mL, lalu ditambahkan 400 μL Reagen *PHYTOPURE* II dan dihomogenisasi secara perlahan. Selanjutnya diinkubasi pada perlakuan suhu dan lama inkubasi yang berbeda (yaitu: suhu 60°C, 65°C, dan 70°C masing-masing selama 10 dan 20 menit) dalam gelas beker berisi air di atas pemanas *hot plate*. Setelah diinkubasi, kemudian *tube* dimasukkan dalam *ice box* selama 20 menit.

Tahap ekstraksi DNA dilakukan dengan menambahkan 400 μL kloroform dingin dan 20 μL Resin *PHYTOPURE* ke dalam *tube*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm untuk mengendapkan komponen sel dan pengotor. Hasil dari sentrifugasi berupa 3 lapisan yang terdiri dari supernatan, kompleks resin dan debris sel, dan kloroform. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam *tube* baru lalu ditambahkan isopropanol dingin melalui dinding *tube* sejumlah volume supernatan yang dimasukkan ke dalam *tube* (1:1), kemudian dibolak-balik perlahan sampai terlihat benang-benang halus DNA. Selanjutnya, *tube* disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan DNA. Setelah itu dihasilkan pelet DNA berwarna putih pada dasar *tube*. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan menambahkan 100 μL ethanol 70%, lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali. Ethanol dibuang, pelet DNA dikering anginkan (*tube* dapat dibalik untuk mempercepat pengeringan), lalu ditambahkan TE 1X sebanyak 50 μL . Penyimpanan DNA hasil ekstraksi yaitu di dalam *freezer* dengan suhu -20°C.

Uji kuantitatif DNA

Uji kuantitatif DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}) dan panjang gelombang 280 nm (A_{280}). Sebelum konsentrasi dan kemurnian sampel DNA diukur, larutan DNA diencerkan dengan cara mengambil 2 μL sampel DNA, lalu dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml,

kemudian ditambahkan akuabides sebanyak 98 μL (faktor pengenceran 50 kali).

Menurut Restu *et al.* (2012), dalam pengujian menggunakan teknik spektrofotometer, sampel dipipet pada plat spektrofotometer untuk mendapatkan nilai OD (*Optical Density*). Pada spektrofotometer digunakan metode panjang gelombang tunggal (*Single Wave Length*) dan OD diukur pada panjang gelombang 260 nm. Konsentrasi DNA dapat diketahui menggunakan rumus berikut:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{Faktor Pengenceran}$$

Sementara itu, kemurnian larutan DNA dapat diukur dari nilai perbandingan antara absorbansi pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}) dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm (A_{280}) (Sambrook *et al.*, 1989).

Hasil dan Pembahasan

DNA genom dapat diisolasi dengan berbagai macam teknik. Pada prinsipnya, sel harus dipecah (*lysis*) terlebih dahulu menggunakan beberapa agensia, baik secara fisik maupun kimiawi (Yuwono, 2008). Dinding sel juga dapat dipecahkan dengan penggerusan menggunakan bufer ekstraksi diikuti dengan inkubasi pada suhu 65°C. Detergen seperti *sodium dodecil sulfat* (SDS), sarkosil, dan CTAB dapat digunakan untuk proses lisis (Subandiyah 2006). Sementara inkubasi setelah penambahan detergen berfungsi untuk memaksimalkan proses pelisisan sel.

Polisakarida adalah kontaminan umum dalam ekstrak DNA tumbuhan dan dapat menghambat analisis enzimatik DNA lebih lanjut, sehingga perlu dihilangkan. Pada Penelitian ini proses lisis sel dilakukan secara mekanik dengan penggerusan dan secara kimiawi dengan penambahan reagen *Nucleon PhytoPure*. Setelah dinding sel pecah, sel-sel tersebut dilarutkan dalam reagen dari kit *Nucleon PhytoPure* (reagen I dan reagen II) yang mengandung potassium SDS. Komponen ini akan mengenali dan membentuk kompleks dengan protein dan polisakarida.

Kotoran (debris) yang dihasilkan dari aktivitas *lysis* ini dibersihkan dengan cara sentrifugasi agar kotoran mengumpul di dasar *tube*. Untuk membersihkan protein dan polisakarida dari larutan digunakan kloroform (Muladno, 2002) yang berfungsi sebagai pendenaturasi protein. Sedangkan DNA dan RNA tidak terdenaturasi karena molekul ini tidak larut di dalam pelarut organik seperti kloroform (Syafaruddin & Santoso, 2011).

Bersamaan dengan penambahan kloroform, juga ditambahkan resin *Nucleon PhytoPure*. Resin ini mengandung gugus asam borat (B(OH)₂) bebas yang akan berikatan secara kovalen dengan polisakarida dan menghilangkannya dari sampel. Bentuk resinnya setengah padat selama berpartisipasi dengan kloroform untuk memfasilitasi pemulihan DNA dan mendapatkan kualitas DNA yang tinggi. Hasil sentrifugasi setelah penambahan kloroform dan Resin *Nucleon PhytoPure* menunjukkan 3 lapisan, yaitu lapisan paling atas adalah supernatan yang mengandung DNA, lapisan tengah adalah kompleks resin dan debris sel, dan lapisan paling bawah adalah kloroform.

Isopropanol dingin yang ditambahkan pada supernatan bertujuan untuk mengendapkan, melekatkan, dan memisahkan

DNA dari larutan (Langga *et al.*, 2012). Setelah itu, proses sentrifugasi yang dilakukan bertujuan untuk presipitasi DNA sehingga didapatkan pelet DNA di dasar *tube*. Pelet DNA kemudian dicuci menggunakan etanol yang berfungsi sebagai penghilang kloroform yang tersisa. Apabila kloroform masih berada di dalam sampel, maka ada kemungkinan akan menghambat kinerja enzim restriksi atau enzim lain yang digunakan saat melakukan analisis molekuler (Syafaruddin & Santoso, 2011).

DNA mengandung basa purin dan pirimidin yang dapat menyerap cahaya UV. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm, sedang kontaminan berupa protein atau fenol dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm (Aras *et al.*, 2003). Kemurnian larutan DNA dapat diukur dari nilai perbandingan antara absorbansi pada panjang gelombang 260 nm (A₂₆₀) dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm (A₂₈₀). Nilai kemurnian DNA yang baik berkisar antara 1,8-2,0. Kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan dalam analisis molekuler (Sambrook *et al.*, 1989). Hasil Uji Kuantitatif DNA menggunakan spektrofotometer disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Kuantitatif DNA Melon pada Berbagai Perlakuan

Tipe Sampel	Daun Segar				Daun Dingin			
	10 menit		20 menit		10 menit		20 menit	
Lama Inkubasi	[DNA] (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	[DNA] (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	[DNA] (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	[DNA] (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
60 °C	1509.2	1.68	1755.6	1.7	1932.4	1.72	2237.5	1.77
65 °C	1812.7	1.76	2046.4	1.8	2633.1	1.8	2707.6*	1.92
70 °C	2012.7	1.81	2004.6	1.8	2556.1	1.94*	2454.3	1.9
Rata-Rata	1778.2	1.75	1935.5	1.77	2373.9	1.82	2466.5	1.86

Keterangan : tanda (*) menunjukkan nilai konsentrasi DNA dan kemurnian DNA tertinggi

Rerata konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi dari daun yang sudah didinginkan lebih tinggi dibanding hasil ekstraksi dari daun segar (Tabel 1). Daun segar tanaman melon berstruktur tipis tetapi liat, sehingga sulit untuk dilakukan penggerusan. Tidak semua sel daun dapat lisis, sehingga penambahan buffer lisis menjadi kurang efektif untuk memisahkan isi sel dengan debris sel. Akibatnya, DNA yang didapat dari daun segar menjadi sedikit. Daun melon yang telah

disimpan pada suhu -20 °C selama semalam memiliki struktur tipis dan lunak. Daun yang lunak lebih mudah digerus sehingga didapatkan bubur daun yang halus dan banyak cairan sel. Penambahan buffer lisis dapat memisahkan isi sel dan debris sel secara optimal. Oleh karena itu, hasil isolasi DNA dari daun yang telah didinginkan menjadi salah satu faktor pendukung tingginya konsentrasi DNA yang didapatkan.

Prosedur isolasi DNA tanaman umumnya menyarankan penggunaan nitrogen cair selama penggerusan sampel jaringan tanaman. Nitrogen cair berfungsi membekukan jaringan sehingga lebih mudah untuk melakukan pelisisan sel secara mekanik, yaitu melalui penggerusan. Namun demikian, harga nitrogen cair cukup mahal serta membutuhkan ruang berpendingin dan tanki khusus untuk penyimpanan sehingga nitrogen cair jarang digunakan di negara berkembang. Metode yang lain, yaitu perlakuan pendinginan sampel daun tanaman mengakibatkan perubahan morfologi daun, sehingga memudahkan pelisisan sel secara mekanik. Hal ini dapat meningkatkan jumlah perolehan hasil ekstraksi DNA dari sampel daun. Penelitian senada terhadap spesies lain pernah dilakukan oleh Ferniah & Pujiyanto (2013) pada tanaman Cabai (*Capsicum annuum* L.) yang mengungkapkan bahwa ekstraksi DNA dari daun cabai yang didinginkan terlebih dahulu pada suhu -20°C menghasilkan kuantitas DNA lebih tinggi, ditunjukkan dengan pita yang lebih tebal, dibandingkan dengan hasil ekstraksi DNA dari daun segar.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan inkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit menghasilkan konsentrasi DNA tertinggi yaitu $2707.6\text{ ng}/\mu\text{l}$, sementara perlakuan inkubasi suhu 70°C selama 10 menit menghasilkan DNA dengan kemurnian paling tinggi, yaitu 1.94 (Tabel 1). Inkubasi 65°C selama 20 menit dapat mendegradasi protein dari dinding sel secara optimal dan memaksimalkan keluarnya DNA dari sel dibandingkan perlakuan inkubasi lain, sehingga dapat meningkatkan konsentrasi DNA hasil ekstraksi.

Penelitian senada juga pernah dilakukan oleh Langga *et al.* (2012), pada tanaman Bitti (*Vitex cofassus* Reinw). Hasil penelitiannya menunjukkan rerata konsentrasi DNA hasil ekstraksi tertinggi dihasilkan pada perlakuan inkubasi 60°C selama 60 menit, dan rerata tingkat kemurnian DNA tertinggi didapatkan dari perlakuan inkubasi 70°C selama 90 menit. Adanya perbedaan keberhasilan ekstraksi DNA dipengaruhi oleh jenis tanaman serta kandungan yang terdapat pada tanaman tersebut. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa setiap jenis tanaman membutuhkan proses ekstraksi dengan perlakuan suhu dan lama inkubasi yang

berbeda. Selain itu, inkubasi dan ekstraksi DNA dipengaruhi oleh kandungan polifenol dan metabolit sekunder lainnya seperti tanin dan terpen yang dapat menurunkan kemurnian DNA.

Simpulan

Ekstraksi DNA dari sampel daun melon yang didinginkan terlebih dahulu pada suhu -20°C selama semalaman menghasilkan DNA dengan konsentrasi dan kemurnian yang lebih tinggi dibanding DNA hasil ekstraksi dari sampel daun segar. Konsentrasi DNA tertinggi diperoleh dari perlakuan inkubasi 65°C selama 20 menit, yaitu $2707.6\text{ ng}/\mu\text{l}$, sedangkan kemurnian DNA tertinggi diperoleh dari perlakuan inkubasi 70°C selama 10 menit, yaitu 1.94. dari bahan daun dingin.

Daftar Pustaka

- Aras, S., A. Duran & G. Yenilmez. 2003. Isolation of DNA for RAPD Nalysis From Dry leaf Material of some Hesperis L. specimens. *Plant Molecular Biology Reporter*. 21: 461a- 461f
- Direktorat Jenderal Hortikultura. 2015. Indonesia Kaya Berbagai Melon Unggulan. <http://hortikultura.pertanian.go.id/?p=547> . Diakses 13 Maret 2020
- Ferniah, R. S. & Pujiyanto, S. 2013. Optimasi Isolasi DNA Cabai (*Capsicum annuum* L.) Berdasar Perbedaan Kualitas dan Kuantitas Daun serta Teknik Penggerusan. *BIOMA*, Vol.156, No. 1, Hal. 14-19
- Garcia J, Oliver M, Paniagua HG & de Vicente MC, 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for Measuring Genetic Diversity in Melon. *Theor Appl Genet*. vol 1 (101): 860-864
- Huda, I. N. & daryono, B. S. 2013. Analisis Variasi Genetik Melon (*Cucumis melo* L.) Kultivar Gama Melon Basket Dengan Metode *Random Amplified Polymorphic DNA*. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, Vol 1, No. 1, hal 41-50
- Langga, I. F., Restu, M. & Kuswinanti T. 2012. Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitti (*Vitex cofassus* Reinw) serta Analisis Keragaman Genetik Dengan Teknik

- RAPD-PCR. *J. Sains & Teknologi*, Vol.12 No.3 : 265 – 276
- Ling, M. and L. Feldman. 2010. A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from *Arabidopsis siliques* and dry seeds. *Biotechnol Journal*. 5 (2): 183-186.
- Muladno. (2002). *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.
- Nicholl, D. S. T. 1993. *An Introduction to Genetic Engineering*. Department of Biological Science, University of Praisly.
- Restu, M., Mukrimin, &Gusmiaty. 2012. Optimalisasi Teknik Ekstraksi dan Isolasi DNA Tanaman Sureni (*Toona Sureni* Merr.) untuk Analisis Keragaman Genetik berdasarkan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). *Jurnal Natur Indonesia* 14(2): 138-142
- Sambrook, J., E. F., Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. 87 p.
- Subandiyah, S. 2006. Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi atau Identifikasi Patogen Tumbuhan. Beberapa Metode Ekstraksi DNA. *Pelatihan dan Workshop Identifikasi DNA dengan Aplikasi PCR*. Malang. hlm. 43-50.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in MolecularBiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Syafaruddin & T.J. Santoso. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 17(1):11-17.
- Syukur, M., S. Sujiprihati, & R. Yunianti. 2012. *Teknik Pemuliaan Tanaman*. Penebar Swadaya, Jakarta. 348 p.
- Yowono, T. 2008. *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta: UGM Press.