

OPTIMASI DETEKSI GEN PADA *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook.f. & Th. MENGUNAKAN KIT *DIRECT PCR*

Gene detection optimization of Stelechocarpus burahol (Bl.) Hook.f. & Th.
using direct PCR kit

Tri Suwarni Wahyudiningsih¹, dan Dian Sartika²

¹Kontributor Utama, ¹Universitas Tidar

Jl. Kapten S. Parman 39 Potrobangsari, Magelang Utara, Jawa Tengah, Indonesia

email penulis korespondensi : trisuwarni@untidar.ac.id

²Universitas Gadjah Mada

Jl. Teknik Selatan, Senolowo, Sinduadi, Mlati, Sleman, Yogyakarta, Indonesia

Tanggal diterima: 07 Desember 2020, Tanggal direvisi: 10 Desember 2020, Disetujui terbit: 21 Desember 2020

ABSTRACT

DNA isolation and purification in the conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) process require reagents that are toxic, more costly and time consuming, and poses a high contamination risk. *Stelechocarpus burahol* leaves contain phenolics, flavonoids, and terpenoids which can interfere with DNA isolation. The use of direct PCR kits was proposed to detect genes without DNA extraction. The objective of study was to determine the method of gene detection of *S. burahol* using direct PCR kit. Leaves sample were collected from trees planted in Garut, Purwodadi Botanical Garden, Kyai Langgeng Garden, Yogyakarta Palace, Turi Sleman, Wanagama, Karanganyar, and South Kalimantan. One leaf sample was collected from each location, except two leaves sample were collected from Bogor Botanical Garden. The primers used for the trials were ITS 1 and 4. The amplification product of 50 µl PCR reaction showed positive bands that were detected by electrophoresis. The PCR product was measured at ± 750 bp from ten samples. Direct PCR kits can be used for gene detection from *S. burahol* leaf samples, although the further confirmation by DNA sequencing will be required. This methods only requires a small amount of tissue, and reduces contamination during DNA extraction process. Direct PCR kits can be proposed as an effective method that can be utilized to detect target genes for large populations.

Keywords: detect target genes, DNA amplification, PCR product, without DNA extraction

ABSTRAK

Tahap isolasi dan pemurnian DNA pada proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional memerlukan reagen yang mahal, toksik, proses lama, dan memiliki resiko kontaminasi tinggi. Daun *Stelechocarpus burahol* mengandung senyawa fenolik, flavonoid, dan terpenoid yang dapat mengganggu saat isolasi DNA. Penggunaan kit direct PCR diharapkan dapat mendeteksi gen pada tanaman tanpa ekstraksi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk menguji metode deteksi gen pada *S. burahol* menggunakan kit direct PCR. Setiap lokasi diambil satu pohon sebagai sumber sampel daun *S. burahol*. Lokasi tersebut antara lain Garut, Kebun Raya Purwodadi, Taman Kyai Langgeng, Kraton Yogyakarta, Turi Sleman, Wanagama, Karanganyar, dan Kalimantan Selatan, kecuali Kebun Raya Bogor diambil dua pohon sebagai sampel. Primer yang digunakan untuk uji coba adalah primer ITS 1 dan primer ITS 4. Pada tahap amplifikasi DNA, sampel dari PCR dengan volume 50 µl menunjukkan adanya pita amplifikasi DNA dideteksi dengan elektroforesis. Produk DNA *S. burahol* berukuran ± 750 bp dari sepuluh sampel *S. burahol*. Kit direct PCR dapat digunakan untuk deteksi gen *S. burahol*, dengan efisiensi waktu dan tenaga, hanya memerlukan sedikit jaringan, dan mengurangi resiko kontaminasi selama proses ekstraksi DNA, meskipun pengujian lebih lanjut melalui *sequencing* DNA tetap diperlukan. *Direct PCR* diharapkan dapat menjadi metode yang efektif yang dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi gen target untuk populasi besar.

Kata kunci: deteksi gen target, amplifikasi DNA, produk PCR, tanpa ekstraksi DNA

I. PENDAHULUAN

Polymerase chain reaction (PCR) digunakan pada penelitian biologi molekuler tumbuhan, *thremmatology*, dan ekologi untuk analisis tipe gen, peta gen, isolasi gen, penyisipan gen ke transforman dan

pengembangan marker (Hwang et al., 2013). PCR konvensional memerlukan isolasi dan pemurnian DNA. Isolasi DNA dilakukan dengan penggerusan untuk mempermudah ekstraksi sehingga diperoleh DNA tanpa debris sel. Menurut Surzycki dan Surzycki (2000),

keberadaan DNase, senyawa metabolit sekunder dan kontaminan polisakarida menjadi permasalahan pada saat isolasi DNA tumbuhan, sehingga diperlukan kit ekstraksi. Ekstraksi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA di dalam inti sel dari komponen seluler lain, dengan cara lisis sel, pemisahan DNA dari komponen sel lain, dan presipitasi DNA menggunakan etanol absolut (isopropanol). Selama proses ekstraksi DNA memungkinkan terjadinya DNA yang patah, DNA terdegradasi oleh enzim nuklease, kontaminasi oleh polisakarida, dan metabolit sekunder. Langkah selanjutnya, menghilangkan zat kimia dan enzim sehingga menurunkan molekul DNA serta mengganggu PCR dalam pemurnian DNA (Young et al., 2007). Proses pemisahan dan pemurnian DNA memerlukan banyak tenaga, waktu, biaya dan proses yang rumit.

Teknologi *direct* PCR menggunakan jaringan hewan, mikroba atau tumbuhan secara langsung untuk PCR tanpa proses isolasi dan pemurnian DNA (Bellstedt et al., 2010; Berthomieu & Meyer, 1991; Klimyuk et al., 1993). *Direct* PCR merupakan metode yang efisien, cepat, mudah, hemat biaya dan waktu dibanding PCR konvensional. Beberapa produk komersial (HelixAmp direct PCR (3G), Nanohelix Co. Korea dan Phire Direct PCR kit, Thermo Fisher Scientific Co., USA) digunakan untuk *direct* PCR pada hewan dan mikroba. *Direct* PCR juga dapat digunakan untuk pengembangan tanaman transgenik. Pada *direct* PCR, lisis sel tumbuhan menggunakan buffer lisis PEG Alkali untuk deteksi genotipe berbagai tanaman. Teknik *direct* PCR digunakan untuk seleksi penanda filogenetik dan pengembangan modifikasi genetik tanaman padi (*TPI* 360bp), *Arabidopsis* (*Actin* 491bp), *Tobacco* (*Actin* 524bp), *Potato* (*Actin* 320bp), *Tomato* (*Actin* 247bp), *Chrysanthemum* (*Actin* 243bp), *Rape* (*Actin* 512bp) (Hwang et al., 2013). *Direct* PCR - jaringan merupakan metode yang cepat untuk mengidentifikasi gen target, eksplorasi komposisi dan keanekaragaman genetik (Li et al., 2010).

Pohon Kepel atau *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook.F & Th. mempunyai sinonim *Uvaria burahol* Bl. termasuk famili Annonaceae (Arora, 2014). Penyebaran pohon tersebut di Asia Tenggara, Malaysia, dan Indonesia terutama di Pulau Jawa (Heyne, 1987). Buah kepel berkhasiat sebagai obat radang ginjal, meringankan penyakit asam urat, menyehatkan saluran kemih, mencegah peradangan, pencegah dehidrasi, antioksidan, meningkatkan daya tahan tubuh, sumber energi dan bermanfaat untuk diet (Amin et al., 2018). Pohon *S. burahol* termasuk daftar 40 jenis tanaman langka pada kategori LR atau *Low Risk* (Dodo, 2015). Daun *S. burahol* mengandung flavonoid. Identifikasi B4b menunjukkan 3,7,3',4'- tetrahidroksi-5-metil flavon (Sunarni et al., 2007). Kandungan fenolik tinggi dalam sampel tumbuhan dapat mengganggu proses PCR. DNA daun sulit diperoleh bila sampel daun sudah tua, mengandung senyawa pengganggu, dan hasil amplikasi panjang. Pada saat memulai penggunaan kit direct PCR perlu optimasi. Tahap optimasi berfungsi untuk mengatasi kesulitan bila hasil produk DNA rendah akibat perbedaan penggunaan bahan jaringan dan primer. Sebelum dilakukan PCR, sampel perlu dioptimasi supaya diperoleh komposisi dan kondisi PCR yang sesuai sehingga mendapatkan hasil PCR optimal. Optimasi PCR tersebut bermanfaat untuk mengetahui kondisi PCR yang tepat dalam mendeteksi gen pada *S. burahol*. Produk PCR yang dihasilkan kemudian dielektroforesis. Tujuan penelitian ini untuk menguji metode deteksi gen pada *Stelechocarpus burahol* menggunakan kit direct PCR.

II. BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan bulan April 2020 sampai Agustus 2020. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan, Fakultas Pertanian Universitas Tidar. Sepuluh pohon *S. burahol* yang digunakan berasal dari sembilan lokasi. Setiap lokasi diambil satu pohon sebagai sumber sampel daun, kecuali

Kebun Raya Bogor diambil dua pohon karena ada pohon *S. burahol* varietas longiflora yang perlu diteliti. Pada lokasi Garut, Kebun Raya Purwodadi, Taman Kyai Langgeng Magelang, Kraton Yogyakarta, Turi Sleman, Hutan Wanagama, Karanganyar, dan Kalimantan Selatan hanya diambil satu pohon setiap lokasi.

Bahan penelitian terdiri atas sepuluh sampel daun kepel dengan label sesuai kode lokasi, Bioline MyTaq™ Plant-PCR Kit, DNA ladder 100 bp merk Vivantis, pewarna DNA (florSAFE DNA stain dari 1st BASE), aquades steril, aluminium foil, TBE 1X, akuabides (ddH₂O) steril, alkohol 70%, ice gel, SDS Solution, tisu, kertas label, primer ITS 1 forward, dan primer ITS 4 reverse. Alat yang digunakan terdiri atas cutter, gunting, inkubator, kotak es, autoklaf, freezer, timbangan analitik (Shimadzu corporation), tube 1,5 ml, tube 0,2 ml, tabung sentrifuge 15 ml, mikropipet (ukuran 10, 100, 200 µl), yellow tip, white tip, rak tip, spidol marker, tisu, vortex, mesin PCR, microwave, UV transilluminator, horizontal agarose gel electrophoresis apparatus (MUPID 2-Plus),

power supply, sisir pembentuk sumuran gel, geldoc, dan komputer.

Prosedur PCR: optimasi produk DNA dari daun 0,1 mg diiris tipis kemudian dihancurkan dan dilarutkan dengan 1,25% larutan SDS sebanyak 50 µl yang disebut template DNA. Kemudian diinkubasi pada suhu 95°C selama 5 menit dan divortex 2 detik. Komponen PCR: Kit PCR : 25 µl, Primer Forward 1 µl, Primer Reverse 1 µl, Plant Extraction 1 µl, dan ddH₂O 22 µl. Pelaksanaan PCR sebagai berikut. Pre-denaturasi 95°C selama 7 menit, denaturasi 95°C selama 1 menit, penempelan 55°C selama 1 menit, ekstensi 72°C selama 1 menit, tahap akhir ekstensi 72°C selama 1 menit dan 40 siklus (Bioscience, n.d.) yang dimodifikasi.

Hasil elektroforesis dianalisis dengan membandingkan ketebalan band/pita amplifikasi secara visual. Pita yang optimal adalah pita yang sesuai target. Gen target ITS tersebut tunggal dan mempunyai ukuran 400-1000 bp (Ali et al., 2015). Konsentrasi dan suhu penempelan primer yang menghasilkan pita optimal digunakan untuk PCR pada sepuluh sampel penelitian dicatat.

Tabel 1. Gen target, primer, urutan nukleotida, suhu annealing pada sepuluh sampel daun *S. burahol*

Gen target	Primer	Urutan nukleotida	Referensi	Suhu penempelan
ITS	ITS 1 (forward)	-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-	(White et al., 1990)	55°C
	ITS 4 (reverse)	-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-		

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pendekatan direct kit PCR memungkinkan amplifikasi PCR dari ukuran sampel sedikit, tanpa pemurnian, waktu efisien dan alur kerja sederhana untuk deteksi genotipe tumbuhan dan hewan (Chum et al., 2012). Amplifikasi menggunakan kit direct PCR dilakukan tanpa melalui proses isolasi DNA (Ben-Amar et al., 2017). Pada penelitian ini hanya diperlukan 0,1 mg daun, kemudian dilarutkan ke dalam 1,25% w/v larutan SDS (*Sodium Dodecyl sulfate*) atau NaDS atau dikenal sebagai natrium lauril sulfat

50 µl. Menurut Ben-Amar et al. (2017), pelarut proteinase K dengan adanya SDS dan atau NaOH berfungsi sebagai lisis alkali pada membran sel. Metode PCR pada umumnya, DNA inti yang dibebaskan mengalami pemurnian dengan fenol-kloroform, terjadi endapan etanol dan resuspensi pelet DNA. Prosedur tersebut, memerlukan tenaga dan waktu lama serta pelarut organik yang bersifat toksik, terutama bila pengerjaan sampel DNA dalam jumlah besar. Protokol tersebut memerlukan lisis alkali dan polimerase DNA Taq dengan aktivitas tinggi (AlShahni et al., 2009; Cascella et al., 2015).

Spesimen diinkubasi pada suhu 95°C selama 5 menit. Menurut AlShahni et al. (2009); Ben Amar et al. (2012), pemanasan pada proses lisis dilakukan untuk memudahkan pelepasan DNA. Pada penelitian ini jumlah yang digunakan hanya sedikit dan durasi vortex hanya 2 detik, hal ini sesuai yang disampaikan oleh Sharma, Kumar, Mohapatra, Khandelwal, dan Vyas (2012) bahwa substrat yang mengandung inhibitor dapat dihindari dengan menggunakan sedikit sampel dan durasi pendek saat campuran sampel dihancurkan. Dalam penelitian ini digunakan kit direct PCR *Bioline MyTaqTM Plant-PCR Kit* dan primer ITS untuk pengikatan gen ITS pada tanaman *S. burahol*. Chum et al. (2012) menyatakan bahwa kit direct PCR *Thermo Scientific Phusion* dan *Phire DNA Polymerases* direkayasa khusus untuk pengikatan domain DNA beruntai ganda yang bersifat unik. Deteksi DNA target berbasis PCR mempunyai banyak aplikasi pada penelitian molekuler tumbuhan untuk analisis genotipe dan verifikasi transgenik.

Syarat pemurnian DNA tumbuhan pada PCR adalah lisis sel dilanjutkan isolasi DNA menggunakan berbagai komponen yang berpotensi mengganggu analisis PCR. Pada tumbuhan yang mengandung fenolik tinggi menjadi kendala, sehingga perlu penambahan polivinilpirolidon untuk menghilangkan senyawa pengikat DNA setelah lisis sel (John, 1992; Kim et al., 1996). Langkah tersebut rumit dan memakan waktu lama sehingga perlu dihindari dengan alternatif penggunaan kit direct PCR untuk mendeteksi DNA target. Tahap lisis sel dan isolasi DNA dapat dihilangkan menggunakan teknik *direct PCR* dari sampel daun pohon *S. burahol*. Menurut Ben-Amar et al. (2017), pendekatan berbasis *direct PCR* menjadi metode yang serbaguna, andal, dan terstandarisasi untuk deteksi genom DNA organisme eukariotik dan prokariotik walaupun dengan ukuran sampel sedikit. Teknik ini memberikan manfaat dalam hal kecepatan, ketahanan, dan efisiensi dibandingkan dengan PCR konvensional serta metode PCR lain.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan primer universal dan kondisi siklus standar. Pada penelitian ini digunakan kit direct PCR *Bioline MyTaqTM Plant-PCR Kit*. Tahap ini merupakan metode sederhana karena sampel yang ada langsung dilakukan proses PCR. Menurut Ben-Amar et al. (2017), tahapan yang dihilangkan adalah kultivasi, pemulihan sel atau ekstraksi DNA.

Direct PCR dapat diterapkan pada penelitian diagnosis genetik penyakit tumbuhan, tanaman pertanian dan bioteknologi tanaman. Penggunaan primer khusus yang dirancang untuk menargetkan gen tertentu memungkinkan identifikasi langsung spesimen tanpa memerlukan ekstraksi DNA. Pada penelitian ini, tahap *sequencing* hanya memerlukan sampel produk PCR sebanyak 50 µl dan menunjukkan hasil positif saat dideteksi dengan elektroforesis.

Pada penelitian ini, keandalan metode *direct PCR* diuji pada daun dari sepuluh individu pohon *S. burahol* menggunakan primer ITS 1 dan primer ITS 4 yang merupakan penanda ITS universal (White et al., 1990) untuk deteksi gen pada jenis ini. Menurut Cao et al. (2009), jaringan daun dari semua spesies tanaman yang diuji memberikan hasil positif dan menunjukkan keberhasilan amplifikasi urutan DNA target tanpa menambahkan agen pengkelat seperti Chelex, EDTA atau DMSO yang digunakan dalam metode PCR konvensional yang sering mengalami kegagalan PCR. Protokol kit direct PCR tidak memerlukan perlakuan khusus untuk menghilangkan penghambat PCR termasuk polisakarida dan senyawa fenolik pada saat amplifikasi PCR. Beberapa data telah dilaporkan pada amplifikasi langsung tanpa isolasi DNA. Metode ini telah diterapkan pada koloni bakteri (Eszik et al., 2016), khamir dan jamur (AlShahni et al., 2009; Ben Amar et al., 2012), spesies alga (Sharma et al., 2012), jaringan hewan (Shokralla et al., 2010; Werblow et al., 2016), dan darah manusia (Cascella et al., 2015).

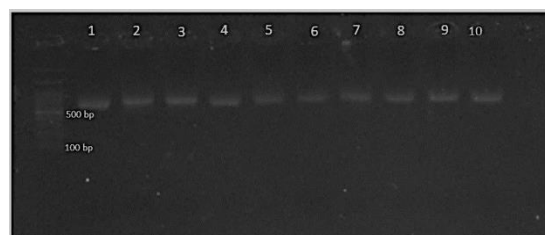
Penggunaan ITS sebagai *DNA barcode region* telah dilakukan pada 78 suku tanaman Angiospermae dengan 281 spesies (S. Chen et

al., 2010). Beberapa diantaranya adalah tanaman dari suku Potamogetonaceae (Yang et al., 2017), Araliaceae (X. Chen et al., 2013), Hypericaceae (Costa et al., 2016), Malvaceae (Santhosh Kumar et al., 2015), Rosaceae (Chin et al., 2014), dan Lauraceae (Doh et al., 2017). Pada penelitian ini gen target, primer, urutan nukleotida serta suhu penempelan yang diperlukan 55°C (Tabel 1) dapat menghasilkan pola pita yang optimal berukuran ± 750 bp (Gambar 1). Keuntungan *direct* PCR diantaranya adanya indikasi gen target pada *S. burahol* tanpa ekstraksi DNA, meskipun amplikon DNA ITS tersebut masih memerlukan pengujian lebih lanjut apakah merupakan amplifikasi dari DNA tanaman atau DNA dari mikroorganisme endofit yang hidup pada daun *S. burahol*. Pengujian melalui tahapan *sekuensing* DNA terhadap amplikon tersebut akan dapat memberikan kepastian bahwa DNA ITS yang teramplifikasi menggunakan metode *direct* PCR merupakan DNA dari *S. burahol*.

Teknologi *direct* PCR diharapkan dapat diterapkan untuk deteksi genotipe berbagai tanaman sehingga menghemat waktu, tenaga dan biaya. Prosedur tersebut dapat disederhanakan lebih efisien dan berhasil memperkuat fragmen DNA dari *template* secara langsung sehingga mengurangi biaya tambahan kit dan reagen pemurnian DNA. Metode *direct* PCR dapat diterapkan untuk mendeteksi tanaman buah dan biji transgenik sebagai alat untuk aplikasi keamanan hayati serta seleksi secara cepat pada skala besar. Metode ini menjadi efektif, cukup mudah dan relatif cepat terutama untuk sampel skala besar.

Pada elektroforesis hasil PCR, pita yang optimal adalah pita yang tebal, bersih dan sesuai ukuran (target) yang ditunjuk oleh primr ITS yang digunakan. Gambar 1 menunjukkan gambar pita yang jelas dan sesuai target, pada ladder dengan ukuran 750 bp. Menurut Padmalatha dan Prasad, (2006), konsentrasi primer yang terlalu rendah atau terlalu tinggi dapat menyebabkan tidak terjadi amplifikasi. Selain itu, semakin tinggi konsentrasi primer

dapat menyebabkan pita yang tebal tetapi kadang diikuti pita yang tidak spesifik (*unspecific band*). Pada semua sampel suhu penempelan 55°C menghasilkan gambar pita yang jelas sehingga hasil implifikasi kurang jelas (Rychlik et al., 1990). Sedangkan pada suhu penempelan yang terlalu rendah, pita tidak spesifik akan teramplifikasi yang menyebabkan pita multipel pada hasil elektroforesis. Hasil optimasi sebaiknya dicoba untuk beberapa sampel penelitian dahulu, tidak langsung pada seluruh sampel penelitian, karena konsentrasi DNA yang dioptimasi dapat berbeda dengan konsentrasi produk DNA pada seluruh sampel penelitian.



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA *barcodes region* ITS berukuran ± 750 bp pada sepuluh sampel *S. burahol*.

Keterangan: 1). Sampel dari Kebun Raya Bogor, 2) Garut, 3) var. longiforus, 4) Kebun Raya Purwodadi, 5) Taman Kyai Langgeng Magelang, 6) Karanganyar, 7) Turi Sleman, 8) Kraton Yogyakarta, 9) Wanagama, dan 10) Kalimantan Selatan

IV. KESIMPULAN

Metode *direct* PCR yang digunakan dalam penelitian ini berhasil mendapatkan amplifikasi DNA ITS dengan ukuran ± 750 bp sebagai target deteksi yang diujikan pada *S. burahol*. Namun demikian, pengujian lebih lanjut melalui *sekuensing* DNA masih diperlukan untuk memastikan bahwa DNA ITS yang telah terdeteksi tersebut adalah DNA *S. burahol*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim Peneliti menyampaikan terima kasih kepada Prof. Ir. Erry Purnomo, Ph.D. selaku Ketua LPPM-PMP yang telah memberikan dana skema Penelitian Unggulan Universitas melalui

DIPA (Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran)
Universitas Tidar tahun 2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, M. A., Gyulai, G., & Al-Hemaid, F. (2015). *Plant DNA Barcoding and Phylogenetics*. LAMBERT Academic Publishing. <http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/150>
- AlShahni, M. M., Makimura, K., Yamada, T., Satoh, K., Ishihara, Y., Takatori, K., & Sawada, T. (2009). Direct Colony PCR of Several Medically Important Fungi Using Ampdirect® Plus. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62(2), 164–167. https://www.researchgate.net/publication/24218484_Direct_colony_PCR_of_several_medically_important_fungi_using_Ampdirect_Plus/link/0912f5087383e2f3ee000000/download
- Amin, A., Radji, M., Mun'im, A., Rahardjo, A., & Suryadi, H. (2018). Antimicrobial activity of ethyl acetate fraction from stelechocarpus burahol fruit against oral bacteria and total flavonoids content. *Journal of Young Pharmacists*. <https://doi.org/10.5530/jyp.2018.2s.19>
- Arora, R. K. (2014). Diversity in Underutilized Plant Species. In *Bioversity International Sub-Regional Office for South Asia, New Delhi. Bioversity International National Agriculture Science Centre (NASC), Dev Prakash Shastri Marg, Pusa Campus, New Delhi 110012, India Bioversity-india@cgiar.org*.
- Bellstedt, D. U., Pirie, M. D., Visser, J. C., de Villiers, M. J., & Gehrke, B. (2010). A rapid and inexpensive method for the direct PCR amplification of DNA from plants. *American Journal of Botany*. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000181>
- Ben-Amar, A., Oueslati, S., & Mliki, A. (2017). Universal direct PCR amplification system: a time- and cost-effective tool for high-throughput applications. *3 Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0890-7>
- Ben Amar, A., Oueslati, S., Ghorbel, A., & Mliki, A. (2012). Prediction and early detection of mycotoxigenic *Fusarium culmorum* in wheat by direct PCR-based procedure. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.021>
- Berthomieu, P., & Meyer, C. (1991). Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. *Plant Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1007/BF00040656>
- Bioscience, M. (n.d.). *MyTag™ Plant-PCR Kit*.
- Cao, M., Fu, Y., Guo, Y., & Pan, J. (2009). *Chlamydomonas (Chlorophyceae) colony PCR. Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0036-9>
- Cascella, R., Strafella, C., Ragazzo, M., Zampatti, S., Borgiani, P., Gambardella, S., Pirazzoli, A., Novelli, G., & Giardina, E. (2015). Direct PCR: A new pharmacogenetic approach for the inexpensive testing of HLA-B*57:01. *Pharmacogenomics Journal*. <https://doi.org/10.1038/tpj.2014.48>
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., & Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- Chen, X., Liao, B., Song, J., Pang, X., Han, J., & Chen, S. (2013). A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.097>
- Chin, S. W., Shaw, J., Haberle, R., Wen, J., & Potter, D. (2014). Diversification of almonds, peaches, plums and cherries - Molecular systematics and biogeographic history of *Prunus* (Rosaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.02.024>
- Chum, P. Y., Haimes, J. D., André, C. P., Kuusisto, P. K., & Kelley, M. L. (2012). Genotyping of plant and animal samples without prior DNA purification. *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/3844>
- Costa, J., Campos, B., Amaral, J. S., Nunes, M. E., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2016). HRM analysis targeting ITS1 and matK loci as potential DNA mini-barcodes for the authentication of *Hypericum perforatum* and *Hypericum androsaemum* in herbal infusions. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.035>
- Dodo. (2015). *Keanekaragaman dan Konservasi Tumbuhan Buah Langka Indonesia*. *Warta Kebun Raya* 13(2).
- Doh, E. J., Kim, J. H., Oh, S. eun, & Lee, G. (2017). Identification and monitoring of Korean medicines derived from *Cinnamomum* spp. by using ITS and DNA marker. *Genes and Genomics*. <https://doi.org/10.1007/s13258-016-0476-5>

- Eszik, I., Lantos, I., Önder, K., Somogyvári, F., Burián, K., Endrész, V., & Virok, D. P. (2016). High dynamic range detection of *Chlamydia trachomatis* growth by direct quantitative PCR of the infected cells. *Journal of Microbiological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.11.010>
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan berguna Indonesia. Jilid II. Jakarta: Badan Litbang Kehutanan.*
- Hwang, H., Bae, S.-C., Lee, S., Lee, Y.-H., & Chang, A. (2013). A Rapid and Simple Genotyping Method for Various Plants by Direct-PCR. *Plant Breeding and Biotechnology*, 1(3), 290–297. <https://doi.org/10.9787/pbb.2013.1.3.290>
- John, M. E. (1992). An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2381>
- Kim, C. S., Lee, C. H., Shin, J. S., Chung, Y. S., & Hyung, N. I. (1996). A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/25.5.1085>
- Klimyuk, V. I., Carroll, B. J., Thomas, C. M., & Jones, J. D. G. (1993). Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *The Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00169.x>
- Li, F. W., Kuo, L. Y., Huang, Y. M., Chiou, W. L., & Wang, C. N. (2010). Tissue-direct PCR, a rapid and extraction-free method for barcoding of ferns. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02745.x>
- Padmalatha, K., & Prasad, M. N. V. (2006). Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.5897/AJB05.188>
- Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro; *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6409>
- Santhosh Kumar, J. U., Krishna, V., Seethapathy, G. S., Senthilkumar, U., Ragupathy, S., Ganeshaiah, K. N., Ganesan, R., Newmaster, S. G., Ravikanth, G., & Uma Shaanker, R. (2015). DNA barcoding to assess species adulteration in raw drug trade of “Bala” (genus: *Sida* L.) herbal products in South India. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61(August), 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.07.024>
- Sharma, R., Kumar, V., Mohapatra, T., Khandelwal, V., & Vyas, G. K. (2012). A Simple and Non-destructive Method of Direct-PCR for Plant Systems. *Journal of Plant Biology*. <https://doi.org/10.1007/s12374-011-9191-6>
- Shokralla, S., Singer, G. A. C., & Hajibabaei, M. (2010). Direct PCR amplification and sequencing of specimens’ DNA from preservative ethanol. *BioTechniques*. <https://doi.org/10.2144/000113362>
- Sunarni, T., Pramono, S., & Asmah, R. (2007). Antioxidant-free radical scavenging of flavonoid from The Leaves of *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th. *Indonesian Journal of Pharmacy*.
- Surzycki, S., & Surzycki, S. (2000). Preparation of Genomic DNA from Plant Cells. In *Basic Techniques in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56968-5_3
- Werblow, A., Flechl, E., Klimpel, S., Zित्रa, C., Lebl, K., Kieser, K., Laciny, A., Silbermayr, K., Melaun, C., & Fuehrer, H. P. (2016). Direct PCR of indigenous and invasive mosquito species: A time- and cost-effective technique of mosquito barcoding. *Medical and Veterinary Entomology*. <https://doi.org/10.1111/mve.12154>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc.
- Yang, T., Zhang, T., Guo, Y. hao, & Liu, X. (2017). Testing eight barcoding markers for *Potamogeton* species at intraspecific levels. *Aquatic Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.11.009>
- Young, G. Y., Jong, Y. K., Soh, M. S., & Kim, D. S. (2007). A simple and rapid gene amplification from *Arabidopsis* leaves using AnyDirect system. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2007.40.3.44>

