

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Salak

Tanaman salak (*Salacca zalacca* (Gaertner) Voss) termasuk tanaman monokotil, berumah dua (dioecious), sefamili dengan kelapa (palmae). Tanaman salak adalah tanaman asli Indonesia. Hampir di semua daerah di Indonesia dapat ditumbuhi salak, baik yang telah dibudidayakan maupun yang masih tumbuh liar di hutan (Ashari, 2002). Sejauh ini, sekitar 19 spesies *Salacca* telah diidentifikasi. Tersebar di selatan Yunan, Burma, Thailand, Semenanjung Malaya, Sumatera, Jawa Barat, Borneo (Kalimantan) dan bagian selatan Filipina (Mogea, 1980). Jumlah spesies terbesar yang ditemukan di Kalimantan sekitar 10 spesies, di Semenanjung Melayu dan Sumatera masing-masing 7 spesies (Mogea, 1986). Dari 19 spesies, 13 spesies telah diidentifikasi di Asia Tenggara. Spesies tersebut antara lain, *S. magnifies* Mogea, *S. multiflora* Mogea, *S. affinis* Griff., *S. sumatrana* Becc., *S. zalacca* (Gaertner) Voss, *S. glabrescens* Griff., *S. sarawakensis* Mogea, *S. dubia* Becc., *S. flabellata* Furtado, *S. minuta* Mogea, *S. dransfieldiana* Mogea, *S. vermicularis* Becc., *S. wallichiana* Wall. & Mart (Ferguson, 1986 dan Mogea, 1986). Diantara spesies tersebut *S. sumatrana*, *S. zalacca* dan *S. wallichiana* yang banyak dibudidayakan. *S. sumatrana* dan *S. zalacca* terutama dibudidayakan di Indonesia, dan yang lainnya hampir secara eksklusif di Thailand (Polprasid, 1991).

Salak termasuk tanaman menyerbuk silang dan pada umumnya diperbanyak melalui biji. Tanaman salak banyak ditanam di kebun dibawah naungan pohon-pohon (Ashari, 2002). Tanaman salak memiliki daun majemuk menyirip dengan panjang 3 - 7 m, tangkai daun, pelepah dan anak daun berduri panjang, tipis dan banyak, warna duri kelabu sampai kehitaman. Anak daun berbentuk lanset dengan ujung meruncing, berukuran sampai 8 x 85 cm, sisi bawah permukaan daun terdapat lapisan lilin. Bunga salak berbentuk majemuk, bertangkai dan tertutup oleh seludang. Panjang seludang bunga jantan mencapai 50 - 100 cm, terdiri atas 4 - 12 bulir silindris yang masing-masing panjangnya antara 7 - 15 cm, dengan bunga berwarna kemerahan yang tersusun rapat. Panjang

seludang bunga betina 20 - 30 cm, bertangkai panjang, terdiri atas 1 - 3 bulir yang panjangnya mencapai 10 cm (Ashari, 1995).

Buah salak yang bertandan muncul dari dalam pelepah daun. Kulit buah salak seperti sisik yang tersusun dan membungkus daging buah. Daging buah salak pada umumnya berwarna putih kusam atau kekuningan. Ketika masih muda, biji buah salak berwarna putih dan setelah tua berubah menjadi coklat serta bertekstur keras (Tjahjadi, 1989). Tanaman salak memiliki banyak akar serabut (Dransfield dan Moge, 1986). Sebagai buah segar salak memiliki kandungan gizi yang cukup tinggi. Kandungan gizi dalam 100 gram buah salak antara lain, 77 kal Kalori; 0,40 g protein; 20,90 g karbohidrat; 28,00 mg kalsium; 18,00 mg fosfor; 4,20 mg zat besi; 0,04 mg vit b1; 2,00 mg vit c; 78,00 % air (Anonymous<sup>a</sup>, 2013).

## 2.2 Syarat Tumbuh Tanaman Salak

Daerah ideal dan potensial untuk pengembangan budidaya tanaman salak berdasarkan zonasi agroklimat bagi pengembangan buah-buahan di Indonesia adalah propinsi Jawa Tengah, DI Yogyakarta, Jawa Timur, Bali, dan Sulawesi Selatan. Daerah tersebut diprioritaskan sebagai sentra produksi salak. Pengembangan budidaya (perkebunan) salak cocok di dataran rendah yang iklimnya sangat basah, basah sampai kering. Tipe iklim yang paling ideal adalah tipe iklim C (Schmidth dan Ferguson), yaitu daerah yang mempunyai 3 – 4,5 bulan kering, tetapi masih tumbuh baik pada daerah yang tipe iklimnya A (0 - 1,5 bulan kering) dan iklim B (1,5 - 3 bulan kering). Tanaman salak dapat beradaptasi luas di dataran rendah sampai ketinggian tempat 700 m di atas permukaan laut (dpl). Keadaan lingkungan tumbuh yang paling optimum untuk pertumbuhan dan produksi tanaman salak adalah dataran rendah sampai menengah (medium) dengan ketinggian tempat 50 m – 300 m di atas permukaan laut (dpl) dan tipe iklim C (Schmidth dan Ferguson), bersuhu antara 20°C - 30°C, dengan curah hujan 200 mm - 400 mm per bulan, kelembaban udara (rH) 40% - 70%, dan tempatnya terbuka sampai agak ternaungi dengan intensitas sinar matahari 40% - 50%. Selain itu tanaman salak juga dapat tumbuh subur di daerah-daerah berketinggian 450 m - 650 m di atas permukaan laut (dpl) dengan tipe iklim A (sangat basah) dan tipe iklim B (agak basah). Hal ini menjelaskan bahwa tanaman

salak mempunyai toleransi yang tinggi terhadap keadaan iklim, terutama pada tipe iklim dan tipe curah hujan (Rukmana, 1999).

Tanaman salak yang tumbuh tanpa naungan daunnya akan terbakar, pertumbuhannya sangat lambat, dan produksi buahnya sedikit. Dalam penelitian yang dilakukan Ashari (2002) tanaman salak harus mendapatkan naungan dengan intensitas cahaya matahari 50% atau kurang. Tanaman salak mempunyai toleransi yang tinggi terhadap berbagai jenis atau tipe tanah. Menurut Moge (1979) daerah pertumbuhan yang baik untuk tanaman salak yaitu pada tanah podsolik dengan ketinggian 700 meter di atas permukaan laut (dpl). Tanah yang paling baik adalah tanah gembur, subur, banyak mengandung humus, aerasi dan drainasenya baik, air tanahnya dangkal, serta ber-pH 6,0 - 7,0 (Rukmana, 1999).

### **2.3 Manfaat Tanaman Salak**

Salak terutama ditanam untuk dimanfaatkan buahnya yang pada umumnya dikonsumsi sebagai buah meja. Selain dimakan segar, buah salak juga dapat diolah menjadi manisan, asinan, dikalengkan, atau dikemas sebagai keripik salak. Salak yang masih muda digunakan untuk bahan rujak. Helai-helai anak daun dan kulit tangkai daunnya dapat digunakan sebagai bahan anyaman, setelah duri-durinya dihilangkan (Verheij dan Coronel, 1997). Di Kabupaten Bangkalan salak mulai banyak dimanfaatkan menjadi produk olahan, seperti dodol salak, kismis salak, kurma salak, sirup dari daun salak, yang pada saat ini banyak diminati oleh masyarakat di kota Bangkalan khususnya. Salak diyakini bisa mengobati sakit diare, selain itu juga bermanfaat untuk kesehatan kulit dan kuku.

Dalam mengonsumsi buah salak, sebaiknya tidak membuang kulit ari buah salak (kulit tipis yang menempel pada buah salak) karena kulit ari tersebut berkhasiat dalam memperlancar buang air besar (BAB). Salak juga bermanfaat untuk kesehatan mata. Menurut Pusat Litbang Gizi dan Makanan Departemen Kesehatan RI (1981) menyebutkan bahwa kandungan betakaroten dalam 100 gram salak lebih banyak 5,5 kali dari buah mangga, 3 kali dari buah jambu biji dan 5 kali dari buah semangka merah. Betakaroten adalah salah satu zat antioksidan yang banyak terdapat dalam sayuran wortel, yang sangat berkhasiat untuk kesehatan mata. Kulit buah salak ternyata sangat berkhasiat mengobati dan

menurunkan penyakit diabetes kering, menstabilkan tekanan darah tinggi maupun rendah (Anonymous<sup>b</sup>, 2013).

## 2.4 Penanda Genetik

### 2.4.1 Penanda Morfologi

Langkah awal sebelum melakukan analisis genetik suatu populasi diperlukan adanya penanda genetik, salah satu penanda genetik yaitu penanda morfologi. Penanda morfologi menggunakan sifat-sifat yang terekspresi dalam fenotipe suatu varietas misalnya bentuk, letak, ukuran dan warna pada bagian vegetatif maupun generatif tanaman. Penanda morfologi adalah penanda berdasarkan bentuk organ-organ tanaman yang mudah diamati. Namun, penanda morfologi memiliki kelemahan-kelemahan antara lain sifat penurunan yang dominan atau resesif, dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan mempunyai tingkat keragaman (polimorfisme) yang rendah serta jumlah yang sedikit.

Ada dua macam karakter morfologi, yaitu karakter kualitatif dan karakter kuantitatif. Karakter kualitatif merupakan ciri/ sifat tanaman yang dapat diamati dan dilihat secara langsung, sedangkan karakter kuantitatif ialah bagian tanaman yang dapat diukur, seperti panjang, lebar, diameter, dan tinggi suatu tanaman. Menurut Poespodarsono (1988), pengelompokan berdasarkan sifat kualitatif lebih mudah, karena sebarannya deskriptif (tegas) dan sifat kualitatif dikendalikan oleh gen sederhana serta faktor lingkungan kurang berpengaruh.

### 2.4.2 Penanda Isozim

Penanda biokimiawi biasanya memerlukan alat atau metode khusus untuk mengamatinya. Kalangan genetika tumbuhan banyak menggunakan penanda isozim atau isoenzim sejak tahun 1960-an. Menurut Pasteur dan Pasteur (1988) isozim atau isoenzim adalah enzim yang merupakan produk langsung dari gen, merupakan variasi yang terdapat pada enzim yang sama yang memiliki kemiripan fungsi dan terdapat pada individu yang sama. Enzim merupakan protein biokatalisator untuk proses-proses fisiologis tanaman yang pengadaannya dan pengaturannya dikontrol secara genetik (Shannon, 1986). Enzim adalah suatu rantai asam amino dimana informasi genetik yang ada padanya merupakan translasi dari RNA, sedangkan RNA merupakan transkripsi langsung dari DNA

(Gardner *et al.*, 1991 dalam Na'im 2000). Oleh karena itu adanya variasi pada level enzim menunjukkan adanya variasi pula pada level DNA (gen). (Hartl, 1980; Ayala and Kriger, 1980 dalam Na'im, 2000). Perubahan susunan asam amino yang membentuk protein akan merubah pula fenotipe tanaman sehingga mengakibatkan munculnya keragaman genetik (Suryo, 2005). Pengamatan utama variasi protein sebagai penanda adalah polimorfisme dalam spesies dan populasi. Polimorfisme isoenzim berupa molekul-molekul protein yang berbeda yang fenotipnya dapat ditampakkan dalam bentuk pita-pita dan pola pita yang berbeda dengan menggunakan gel elektroforesis yang diwarnai dengan pewarna spesifik untuk setiap enzim (Hartana, 2003).

Dalam pemunculan pita-pita tersebut dikenal adanya struktur homosigot yaitu dua alel atau lebih yang sama karena hasil sintesa satu rantai polipeptida, sedangkan heterosigot adalah pemunculan dua alel atau lebih yang berbeda sebagai hasil sintesa dua rantai polipeptida yang berbeda. Dalam teknik elektroforesis, yang merupakan teknik pemisahan protein dengan molekul lain yang bermuatan pada bidang listrik menghasilkan lebih dari satu zona-zona terwarna yang menunjukkan bahwa terkandung lebih dari satu jenis enzim yang berperan pada suatu substrat untuk memberikan reaksi yang sama. Enzim-enzim inilah dikenal dengan istilah isoenzim atau isozim. Penanda isozim bersifat kodominan sehingga dapat dipakai pada populasi segregasi dengan individu heterozigot. Penanda protein (isozim) memiliki beberapa keunggulan dibanding penanda morfologi, penanda ini bersifat stabil karena tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan, lebih cepat dan akurat karena tidak menunggu tanaman sampai berproduksi, materi yang digunakan bisa berasal dari berbagai jaringan tanaman, dapat dilakukan untuk sampel dalam jumlah yang banyak, waktu yang dibutuhkan lebih cepat (Nugraheni, 2006).

Menurut Azrai dan Kasim (2003) penggunaan penanda isozim mempunyai kelebihan karena isozim diatur oleh gen tunggal dan bersifat kodominan dalam pewarisan, yaitu individu-individu homozigot dapat dibedakan dari individu-individu heterozigot, bersegregasi secara normal menurut nisbah Mendell, dan merupakan produk langsung gen. Setiap isoenzim bermuatan listrik berbeda-beda (karena perubahan urutan asam amino penyusunnya) sehingga akan bergerak

dengan kecepatan yang berbeda pula pada elektroforesis. Perilaku ini dimanfaatkan dalam genetika molekuler untuk membedakan suatu sampel dengan sampel yang lain (Sudarmono, 2006).

## 2.5 Analisis Isozim

Prinsip dasar dari analisis isozim/ isoenzim ialah adanya variasi alel yang disebabkan karena perbedaan ekspresi protein yang dapat diamati pada gel elektroforesis. Hanya isozim yang memiliki banyak variasi dalam ukuran dan bentuk atau berbeda muatannya dapat dipisahkan melalui elektroforesis. Analisis isozim dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik tanaman dengan menggunakan teknik elektroforesis. Teknik elektroforesis isozim merupakan cara yang efisien sebagai teknik untuk mendeteksi suatu jenis tanaman dengan memanfaatkan material bagian organ-organ tanaman yang berupa daun yang masih muda, bunga, maupun biji (Lisdiyanti dan Hartati, 1997). Hal tersebut karena bagian vegetatif yang masih muda biasanya mempunyai aktivitas enzim yang tinggi, sehingga akan mudah diamati (Wendel dan Weeden 1989).

Torres *et al.* (1980) menjelaskan bahwa daun yang digunakan untuk analisis isozim ialah daun dewasa yang telah berkembang sempurna (*fully developed*). Penelitian yang dilakukan (Lisdiyanti *et al.*, 2003) dalam penelitian isozim dengan material dari daun dan biji menunjukkan bahwa material dari daun muda lebih terlihat variasi keragaman penampakan pola pita. Langkah pertama sebelum analisis isozim ialah pengambilan sampel tanaman yang akan diuji. Hal yang perlu diperhatikan dalam pengambilan sampel ialah waktu pengambilan dan penyimpanan sampel. Pengambilan sampel harus dilakukan pada pagi hari sebelum matahari terbit dan disimpan pada suhu kurang dari 4°C agar tidak terjadi perubahan fisik protein karena suhu tinggi dapat menyebabkan hilangnya sifat kelarutan dan sifat-sifat fisik lainnya atau biasa disebut denaturasi (Sigh dan Sigh, 1995). Dalam analisis isozim terdapat beberapa tahap, yaitu:

### 1. Ekstraksi Enzim

Ekstraksi enzim merupakan suatu kegiatan pengambilan enzim pada sampel tanaman yang diuji dengan penambahan buffer ekstrak. Pengekstraksian juga harus dilakukan dalam keadaan dingin agar aktivitas enzim dalam sampel

yang diuji tetap terjaga. Larutan buffer pengekstrak enzim pada umumnya yang dipakai adalah asam Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA), sukrosa, gliserol, basa Tris, mercaptoethanol, Bovin Serum Albumin (BSA) serta polivinil polipirolidon (Lisdiyanti dan Hartati, 1997). Berdasarkan hasil penelitian Fajriani (2008) komposisi larutan buffer ekstrak yang paling sesuai untuk analisis isozim daun salak adalah 2 ml EDTA (Ethylene Diamine tetra Asetate) 0,01 M, 2 ml KCl 0,1 M, 2 ml MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O 1 M, 2 ml Tris HCl 1 M pH 7,5, 20 ml β-mercaptoethanol, 0,6 gram PVP (Polyvinyl Pirolidone), 0,04 gram BSA (Bovine Serum Albumin), dan aquadest 20 ml.

## 2. Elektroforesis

Elektroforesis ialah suatu molekul yang mempunyai muatan listrik (biasanya protein atau asam nukleat) bermigrasi pada bidang listrik. Tingkat migrasi dalam bidang elektrik dipengaruhi oleh bentuk dan ukuran molekul, viskositas, dan temperatur dari media/ tempat molekul bergerak (Fatchiyah *et al.*, 2011). Molekul-molekul ini biasanya memiliki sifat-sifat enzimatis yang serupa, bahkan identik, kecuali sebagian kecil komposisi asam amino dan urutan asam nukleotida DNA yang mengkode pembentukan protein. Seringkali perbedaan antar isoenzim hanya berupa substitusi satu sampai beberapa asam amino. Perbedaan antar isozim dapat terjadi karena adanya gen-gen yang berbeda dalam melakukan kodifikasi untuk masing-masing isozim dan zona-zona yang berbeda dapat mewakili rantai polipeptida yang terkandung dalam enzim tersebut (Lakitan, 2007).

Prinsip kerja elektroforesis pada isozim ialah memisahkan formasi yang berbeda dari enzim yang terdapat pada tanaman dan menampilkannya dalam gel. Prosedur ini sekarang digunakan untuk menentukan variasi genetik pada berbagai macam spesies tumbuhan. Media pemisah atau gel elektroforesis yang banyak digunakan pada analisis isozim ialah gel poliakrilamida dan gel pati. Gel poliakrilamida memberikan pemisahan yang lebih baik dan kenampakan pita enzim atau protein yang lebih jelas karena penampilan gel yang transparan. Namun, dalam penggunaan gel poliakrilamida harus berhati-hati karena bersifat toksik dan harganya relatif mahal apabila dibandingkan dengan gel pati (Lisdiyanti dan Hartati, 1997).

### 3. Pewarnaan

Tahap selanjutnya dalam analisis isoenzim/ isozim ialah pewarnaan menggunakan pewarna enzim. Pewarnaan ini bertujuan untuk membangkitkan aktivitas enzim dengan cara merendam lempengan gel yang mengandung enzim yang telah dielektroforesis di dalam larutan pewarna agar mendapatkan kenampakan pola pita isozim yang jelas. Jelas atau tidaknya kenampakan pola pita isozim sangat berpengaruh dalam pengidentifikasian genetik. Pita isozim terjadi karena adanya perubahan substrat yang dikatalis oleh enzim dan pengikat produk perubahan substrat dengan pewarna spesifik (Lisdiyanti dan Hartati, 1997). Pola pita yang muncul pada elektroforesis dengan pewarna histokimia terjadi karena adanya aktifitas enzimatis (Micales dan Bonde, 1995). Terdapat beberapa jenis enzim yang dapat digunakan pada analisis isozim antara lain peroksidase, esterase, alkohol dehidrogenase, asam pospate alkalin, pospatase, asparat amino transferase, phosphoglucomutase, dan lain-lain (Wendel dan Weeden, 1989).

Teknik isozim telah banyak digunakan untuk mengkaji keragaman genetik dari beberapa organisme, diantaranya adalah karakterisasi mutan *Boerhavia diffusa* L, keterkaitan antara keragaman fenotipe dan genotipe pada populasi manggis Sumatera Barat. Isozim juga digunakan untuk mengidentifikasi salak *diosius* (tipe salak jantan dan betina). Penelitian ini menghasilkan bahwa enzim *esterase* dan *peroksidase* dapat digunakan sebagai penanda jenis tanaman jantan dan betina pada tanaman salak (Fajriani, 2008). Selain itu juga Fatimah dan Sucipto (2011) menggunakan analisis isozim untuk mengetahui hubungan kekerabatan sebelas jenis salak Bangkalan dengan pewarnaan peroksidase, dehidrogenase, dan catalase. Identifikasi keragaman genetik varietas lokal kedelai di Jawa berdasarkan analisis isozim dengan pewarnaan esterase dan peroksidase memberikan kenampakan pola berkas isozim yang jelas (Cahyarini *et al.*, 2004).

Enzim-enzim esterase dan peroksidase mempunyai pola pita yang jelas dan polimorfis dan juga telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi tanaman nanas, jeruk besar, *Ranunculus nanus*, dan tebu. Pada tanaman Esterase (EST) merupakan enzim hidrolitik yang berfungsi melakukan pemotongan ester sederhana pada asam organik, asam anorganik alkohol dan fenol serta mempunyai berat molekul yang rendah dan mudah larut. Enzim esterase memiliki struktur

monomer dan dimer (Tanskley dan Rick, 1980, dalam Acquah, 1992). Peroksidase (PER) pada tanaman merupakan anggota enzim reduktase yang dianggap mempunyai hubungan nyata dengan penyebab perubahan pada rasa, warna, tekstur, dan kandungan gizi buah-buahan dan sayuran yang belum diolah. Peroksidase juga merupakan isozim yang berperan dalam pertumbuhan, diferensiasi dan pertahanan (Burnette, 1997, dalam Cahyarini, 2004). Menurut Touti (1988) aktivitas isoenzim peroksidase mudah dideteksi karena aktivitasnya yang luar biasa pada jaringan. Enzim peroksidase (PER) tergolong dalam kelompok oksido reduktase, peroksidase mengkatalisis  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  substrat senyawa fenilin diamin seperti *3-amino-9 etil karbazole* akan dioksidasi oleh oksigen hasil reduksi membentuk endapan berwarna merah kecoklatan (Vallejos, 1983).

