

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia ialah negara mega biodiversitas karena memiliki kawasan hutan tropika basah dengan tingkat keanekaragaman hayati yang tinggi di dunia. Kekayaan plasma nutfah Indonesia memiliki potensi untuk dimanfaatkan dalam peningkatan kesejahteraan masyarakat. Oleh sebab itu, saat ini plasma nutfah banyak dikaji dan dikoleksi untuk meningkatkan produksi pertanian. Durian merupakan salah satu buah tropika yang memiliki tingkat keanekaragaman yang tinggi. Berdasarkan hasil penelitian diketahui terdapat sekitar 30 jenis durian di seluruh dunia dan 14 jenis diantaranya endemik di Pulau Kalimantan yang sebagian besar masih tumbuh liar di hutan. Sedikitnya di Kalimantan Timur terdapat 5 jenis durian (Mansur, 2007). Kekayaan keanekaragaman genetik spesies yang merupakan kekayaan sumberdaya hayati nasional sehingga perlu adanya pengelolaan yang sebaik-baiknya.

Durian merah Banyuwangi ialah salah satu plasma nutfah durian yang ada di Banyuwangi yang memiliki ciri khas yakni daging buahnya yang berwarna merah. Menurut Rusmiati *et al.*, (2013) durian merah Banyuwangi diduga merupakan jenis turunan dari persilangan interspesifik alami, antara *Durio zibethinus* dan *Durio graveolens*.

Beberapa cara untuk melihat hubungan kekerabatan suatu tanaman antara lain dengan penanda morfologi dan penanda molekuler. Penanda morfologi berkaitan erat dengan pertumbuhan, kelangsungan hidup dan kemampuan menghasilkan produk buah yang bermutu (Ariestin, 2014). Penanda morfologi dapat dilihat dan diketahui dengan cara melihat kenampakan secara fenotipik. Namun penanda morfologi ini sangat dipengaruhi oleh lingkungan. Menurut Hasnah (2014) penanda morfologi didasarkan pada fenotipe sehingga memiliki beberapa kekurangan antara lain; fenotipe suatu jenis banyak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan yang sangat kompleks dan biasanya dikendalikan oleh gen majemuk. Selain itu gen resesif heterozigot tidak terekspresikan sehingga untuk mencari hubungan antara genotipe dan fenotipe akan sulit. Penentuan pola pewarisan biasanya dilakukan melalui uji keturunan yang memerlukan waktu cukup lama.

Salah satu upaya untuk mengembangkan marka genetik koleksi plasma nutfah adalah dengan cara mengembangkan marka genetik secara biokimia menggunakan penanda protein (Bansir *et al.*, 2010). Menurut Widiyanti *et al.*, (2006) salah satu pendekatan yang dilakukan untuk mengetahui jarak genetik suatu tanaman ialah dengan menggunakan pola pita isoenzim. Penanda isoenzim telah digunakan secara luas, isoenzim tidak dipengaruhi oleh lingkungan dan tidak dipengaruhi oleh resesifitas suatu sifat seperti pada fenotipe tanaman (Hasnah, 2014). Isoenzim merupakan produk langsung dari gen dan relatif bebas dari pengaruh langsung lingkungan, sehingga dapat digunakan sebagai ciri genetik untuk mempelajari dan mengidentifikasi keragaman individu suatu kultivar, klasifikasi tanaman, identifikasi kultivar dan hibridnya (Rouf, 2007). Isoenzim adalah kelompok enzim yang terdiri dari molekul-molekul aktif yang memiliki struktur kimia yang berbeda tetapi mengkatalis reaksi kimia yang sama. Enzim-enzim tersebut diproduksi berdasarkan kode-kode yang dikontrol oleh gen-gen yang sama pada lokus yang berbeda atau pada lokus yang sama (Farooq *et al.*, 1991).

Dalam penelitian ini akan dilakukan pendugaan hubungan kekerabatan durian merah Banyuwangi dengan dugaan tetua yakni *D. zibethinus* putih dan kuning, *D. kutejensis* dan *D. graveolens*. Pendugaan tetua dari durian merah Banyuwangi ini mengacu pada daging buah durian merah yang dihasilkan. *D. zibethinus* memiliki daging buah berwarna putih kekuningan, *D. graveolens* memiliki daging buah berwarna kuning, jingga hingga merah, dan *D. kutejensis* memiliki daging buah berwarna kuning, oranye hingga merah. Sehingga perlu adanya penelitian untuk mengetahui kebenaran dugaan tersebut. Tujuannya ialah untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara durian merah Banyuwangi dengan dugaan tetua. Oleh karena itu apabila diketahui bahwa durian merah Banyuwangi berkerabat dekat dengan dugaan tetua, maka informasi tersebut menunjukkan bahwa dapat membuka peluang bagi pembentukan kultivar unggul baru yang lebih baik sesuai sifat yang diinginkan. Selain itu, dengan adanya persilangan interspesifik yang terjadi pada durian merah membuka peluang bagi spesies lain untuk dapat disilangkan dengan tujuan meningkatkan keragaman genetik. Serta dapat dijadikan sebagai kultivar unggul Banyuwangi karena

memiliki kelebihan warna daging buah yang menarik dan aroma yang tidak menyengat sehingga memiliki prospek untuk diminati pangsa pasar luar negeri.

### 1.2 Tujuan Penelitian

Mengidentifikasi durian merah Banyuwangi untuk mengetahui hubungan kekerabatan durian merah dengan dugaan tetua berdasarkan analisa morfologi daun dan isoenzim.

### 1.3 Hipotesis

Dari beberapa durian merah Banyuwangi terdapat satu atau lebih jenis durian merah yang memiliki tingkat kemiripan dengan dugaan tetua.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Klasifikasi Durian dan Persebarannya

Berdasarkan hasil penelitian Mansur (2007) diketahui terdapat sekitar 30 jenis durian di seluruh dunia dan 14 jenis diantaranya endemik di Borneo yang sebagian besar masih tumbuh liar di hutan. Sedikitnya di Kalimantan Timur terdapat 5 jenis durian. Berikut ialah klasifikasi untuk dugaan tetua durian merah Banyuwangi.

- a. *D. zibethinus* termasuk dalam golongan Kingdom Plantae, Subkingdom Tracheobionta, Super divisi Spermatophyta, Divisi Magnoliophyta, Kelas Mangnoliopsida, Sub Kelas Dileniidae, Ordo Malvales, Famili Bombacaceae, Genus Durio, Spesies *Durio zibethinus* Murr.
- b. *D. graveolens* termasuk dalam golongan Kingdom Plantae, Subkingdom Tracheobionta, Superdivisi Spermatophyta, Divisi Magnoliopsida, Sub Kelas Dileniidae, Ordo Malvales, Famili Bombacaceae, Genus Durio, Spesies *Durio graveolens* Becc.
- c. *D. kutejensis* termasuk dalam golongan Kingdom Plantae, Subkingdom Tracheobionta, Super Divisi Spermatophyta, Divisi Magnoliopsida, Sub Kelas Dilleniidae, Ordo Malvales, Famili Bombacaceae, Genus Durio, Spesies *Durio kutejensis* (Anonymous, 2012<sup>b</sup>).

### 2.2 Syarat Tumbuh Tanaman Durian

Tanaman durian dapat tumbuh dengan baik pada curah hujan maksimum 3000-3500 mm/th dan minimal 1500-3000 mm/th. Curah hujan sepanjang tahun dengan kemarau 1-2 bulan sebelum berbunga lebih baik daripada hujan secara terus menerus. Intensitas cahaya matahari yang dibutuhkan durian adalah 60-80%. Tanaman ini cocok pada suhu rata-rata 20-30 °C. Pada suhu 15 °C durian dapat tumbuh tetapi pertumbuhannya tidak optimal. Bila suhu mencapai 35 °C daun akan terbakar (Setiadi, 2008).

Tanaman durian menghendaki tanah yang subur (tanah yang kaya bahan organik). Partikel penyusunan tanah seimbang antara pasir liat dan debu sehingga mudah membentuk remah. Tanah yang memiliki ciri-ciri warna hitam keabu-abuan kelam, struktur tanah lapisan atas bebutir-butir, sedangkan bagian bawah

bergumpal, dan kemampuan mengikat air tinggi. Derajat keasaman tanah yang dikehendaki tanaman durian adalah (pH) 5-7, dengan pH optimum 6-6,5. Tanaman durian termasuk tanaman tahunan dengan perakaran dalam, maka membutuhkan kandungan air tanah dengan kedalaman cukup, (50-150 cm) dan (150-200 cm). Jika kedalaman air tanah terlalu dangkal/ dalam, rasa buah tidak manis/tanaman akan kekeringan/akarnya busuk akibat selalu tergenang (Anonymous, 2013<sup>a</sup>).

## 2.1 Keragaman Genetik Durian

### 2.1.1 Durian Merah Banyuwangi

Durian merah yang diduga *D. graveolens* ini memiliki ciri daging buahnya berwarna merah. Berbeda dengan durian pada umumnya, biji durian merah lebih kecil dan daging buahnya lebih tebal dan lebih manis, serta memiliki aroma buah lebih menyengat. Ukuran buah ini sedang atau sedikit lebih kecil dibanding durian lain. Warna kulit buah tidak berbeda dengan buah durian lainnya yaitu berwarna kuning.

Syarat hidup durian merah Banyuwangi ini sama dengan durian jenis lainnya yakni tumbuh di daerah tropis pada ketinggian kurang lebih 800 m dpl. Awalnya durian merah ditemukan pada tahun 1997. Kemudian pengembangan durian merah telah dilakukan sejak 2007 hingga 2014. Tercatat terdapat 200 pohon yang dapat di panen setiap tahunnya. Seiring perkembangan penyebaran 200 pohon tersebut terdapat 62 jenis durian merah asli Banyuwangi yang berhasil dikembangkan melalui perbanyakan vegetatif maupun generatif dan hingga saat ini tercatat persebaran durian merah Banyuwangi terdapat di lima kecamatan yakni Glagah, Licin, Kalipuro, Giri dan Songgon. Kemudian dari 62 jenis tersebut, durian merah Banyuwangi dikelompokkan menjadi dua kelompok berdasarkan warna daging buahnya.

1. Corak warna merah diduga silangan *D. zibethinus* putih x *D. graveolens*
2. Corak warna pelangi diduga silangan *D. zibethinus* kuning x *D. graveolens*

(Rusmiati *et al.*, 2013).

Sedangkan menurut Anonymous (2014) bahwa durian merah Banyuwangi dikelompokkan menjadi tiga kelompok yakni:

1. Durian merah bocking yang daging buahnya berwarna merah
2. Daging merah pelangi yang dagingnya berwarna merah dan kuning yang merupakan hasil perkawinan silang tiga varian durian di Banyuwangi antara lain jenis durian kuning, durian merah (*D. graveolens*), dan durian putih (*D. zibethinus*)
3. Durian grafika yang dagingnya berwarna kuning, putih dan merah

Contoh buah dari tiga kelompok durian merah Banyuwangi dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. (a) Durian merah bocking, (b) Durian merah pelangi, (c) Durian grafika

Ketiganya dapat dibedakan berdasarkan pohon dan daunnya yang memiliki ciri masing-masing. Banyak faktor yang alasan muncul mengenai asal mula durian merah Banyuwangi seperti alasan faktor budaya, faktor genetik dan faktor lingkungan (Anonymous, 2014).

### 2.1.2 *D. zibethinus*

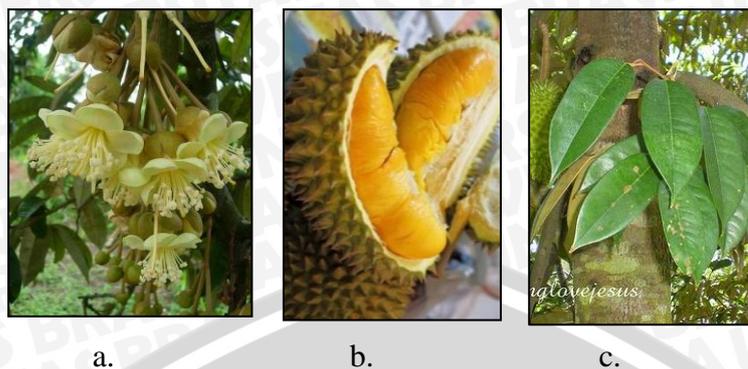
Tanaman durian menghendaki sinar matahari yang penuh. Memiliki postur tubuh berkayu dan mampu bertahan tumbuh sampai lebih dari 150 tahun. Diameter batang utama dapat mencapai 2 m dengan ketinggian sekitar 30-40 m. Pohon durian tingginya bisa mencapai 50 m. Menurut Wiryanta (2008), cabangnya tumbuh mendatar atau tegak dan membentuk sudut yang bervariasi tergantung pada jenis dan varietasnya, percabangannya banyak dan membentuk tajuk mirip kerucut atau segitiga.

Memiliki daun tunggal sederhana berbentuk lonjong dengan panjang 15-18 cm, lebar 3-4,5 cm, bertekstur halus dan lentur, dengan permukaan mengkilap dan

berwarna hijau tua pada permukaan atas dan coklat keemasan pada permukaan bawahnya (Ashari, 2006).

Bunga durian bentuknya mirip mangkok yang tersusun dalam tangkai agak panjang berbentuk dompolan dan berwarna putih serta beraroma harum. Bunga durian termasuk berkelamin sempurna, artinya dalam satu bunga terdapat bunga berbunga jantan dan betina. Tiap kuntum bunga bermahkota 5 helai yang masing-masing terlepas satu sama lain. Memiliki benang sari antara 5-12 helai, namun ada pula yang 3 helai (Rukmana, 1996). Bunga yang muncul bergantung pada cabang/batang yang sudah tua, secara bergerombol hingga 3-30 kuntum. Tangkai bunga antara 5-7 cm, panjang bunga 5-6 cm, dengan diameter 2 cm. Kelopak bunganya berwarna putih atau hijau keputihan (Ashari, 2006). Bentuk kanopi tanaman durian berbentuk segitiga dengan ukuran tajuk yang semakin membesar dari pangkal hingga ujung tajuk. Warna batang durian adalah coklat kehitaman untuk batang luar serta coklat dengan keadaan permukaan batang yang kasar dan ketiadaan lapisan lilin (Yuniastuti *et al.*, 2010).

Bunga akan mekar sempurna sekitar pukul 15.00, dan mulai diserbuki sekitar pukul 19.00-22.00, apabila bunga tidak mengalami penyerbukan akan luruh pada pagi harinya (Ashari, 2006). Wiryanta (2008) menambahkan untuk bunga yang diserbuki kelopak bunga akan berguguran menyisakan benang sari dan ovari. Dari banyak kuntum yang ada tidak semuanya akan menjadi bakal buah, hal ini disebabkan adanya kompetisi untuk mendapatkan unsur hara. Bunganya muncul langsung di permukaan cabang utama berupa dompolan ataupun bunga tunggal. Kuncup bunga berwarna kuning emas berbentuk seperti lonceng, dan mahkota berjumlah lima helai berwarna putih kekuningan. Bunga, buah dan daun *D. zibethinus* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. (a) morfologi bunga (b) buah (c) daun *D. zibethinus*  
(Anonimous, 2015 dan 2014)

Buah *Durio zibethinus* berbentuk bulat, bulat panjang, hingga tidak beraturan (Wiriyanta, 2008). Warna kulit buah hijau coklat sampai kekuningan dengan duri tajam berbentuk kerucut, berat rata-rata buah adalah 3-5 kg. Daging buah berwarna putih kekuningan, mempunyai rasa manis dengan kadar gula rata-rata 20%. Menurut Ashari (2006) panjang buah durian bisa sampai 25 cm, dengan diameter 20 cm. Buah, bunga dan daun *D. zibethinus* dilihat pada Gambar 2.

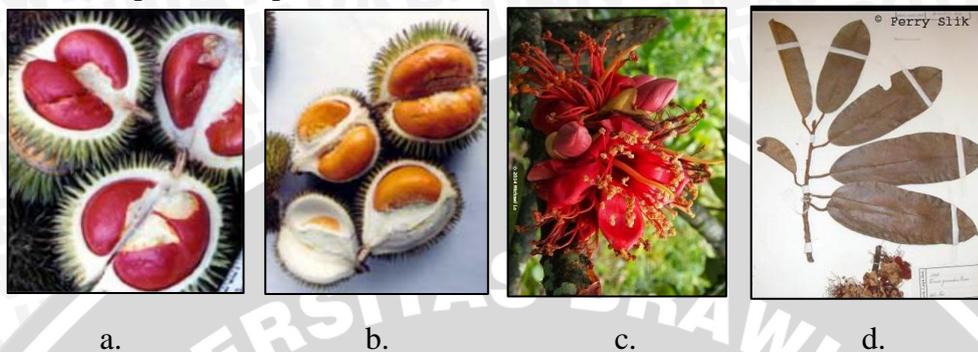
*D. zibethinus* termasuk spesies durian yang paling banyak berkembang dan menjadi komoditas komersial. Memiliki banyak variasi nama lokal seperti kadu, thurian, drien, duren, dll. Kelebihan *D. zibethinus* ialah daging buahnya sangat besar dan tebal berwarna kuning keemasan, bijiya kecil-kecil dan kempes, kulit tebal sehingga bisa tahan sampai lebih dari satu minggu. Sedangkan kekurangan dari durian ini ialah aroma yang menyengat yang mayoritas tidak disukai oleh orang asing (Anonimous, 2013<sup>a</sup>).

### 2.1.3 *D. graveolens*

Durian ini di Sabah disebut durian kuning karena pada umumnya dagingnya berwarna kuning. Termasuk spesies yang dalam kondisi kritis karena sudah mulai susah dicari. Pohonnya besar, tinggi, dan berbanir seperti durian biasa. Bunganya banyak terbentuk pada cabang tua. Bila masak buahnya merekah di atas pohon. Buahnya berwarna kuning coklat hingga kuning, duri cukup panjang, tajam dan rapat (Anonimous, 2013).

Memiliki warna daging yang sangat menarik, dari kuning, jingga hingga merah. daging buah agak tipis dengan porsi edible antara 15-30%, daging buah

halus, tekstur lembut, dan sedikit kering, serta rasa agak manis. Aroma tidak sekuat durian biasa. Buahnya tidak dapat disimpan lama. Pohonnya lebih tahan di kawasan yang terendam air (Anonimous, 2013). Buah, bunga dan daun *D. graveolens* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. (a) morfologi buah (b) bunga (c) daun *D. graveolens* (Anonimous, 2007)

#### 2.1.4 *D. kutejensis*

Durian *kutejensis* atau sering dikenal oleh masyarakat luas sebagai durian Lai berasal dari Indonesia yang tumbuh liar di hutan Kalimantan (Sunaryo, 2015). Lai atau Lay ialah nama khas yang diberikan oleh penduduk asli Kalimantan Timur dan Kalimantan Selatan. Namun demikian, ia juga dijumpai tumbuh baik di Sumatera dan Jawa. Di Banyuwangi juga ditemui Lai yang dapat berbuah dengan baik. *D. kutejensis* termasuk dalam Kingdom Plantae, Divisi Magnoliopsida, Kelas Dicotyledonae, Ordo Malvales, Famili Bombacaceae, Genus Durio, Spesies *Durio kutejensis* (Anonimous, 2013<sup>b</sup>).

Pohon durian Lai memiliki tinggi mencapai 24 m. Panjang daun mencapai 20-25 cm, dengan lebar 5-7 cm. Percabangan terletak tidak jauh dari permukaan tanah dan mempunyai mahkota yang rimbun. Lai tidak mengandung kolesterol, rendah alkohol, mengandung tryptophan yang tinggi, kalium, vit B6, dan vit C (Anonimous, 2013).

Ciri khas spesies ini pohonnya relatif lebih kecil dibanding *D. zibethinus*, bercabang rendah dan padat. Daunnya berukuran relatif besar berkisar 25-45 cm. bunganya juga besar, menarik dan berwarna merah tua. Buahnya kecil sampai sedang berukuran 1-1,5 kg, bertangkai pendek, berwarna kuning jika masak, berkulit tipis, dan duri tidak tajam. Percabangan terletak tidak jauh dari permukaan tanah dan mempunyai mahkota yang rimbun. Buah tua yang baru

gugur biasanya belum siap untuk dimakan, dalam beberapa hari setelah gugur mutunya meningkat. Memiliki aroma buah yang lembut. Daging buahnya berwarna kuning-oranye-merah, bertekstur lembut dan padat (tidak mudah lunak), serta porsi edible dapat mencapai 46% (Anonimous, 2013).

Durian Lai oleh masyarakat Dayak Kenyah disebut durian daun, mungkin disebabkan lebar daunnya hampir selebar telapak tangan orang dewasa. Durian ini banyak ditanam penduduk di sekitar pemukimannya atau di ladang Sungai Mahakam, Kabupaten Kutai, Kalimantan Timur. Buah ini juga dikenal dengan beberapa nama lain seperti durian Kuning, durian Tinggang, durian Pulu, Nyekak, Ruas, Sekawi, Pekawai dan lain-lain (Anonimous, 2012). Lai dapat ditemukan hampir di seluruh Kalimantan. Di Kalimantan Selatan dan Tengah dikenal dengan nama Pampaken, di Serawak dikenal sebagai durian Nyekak, sedangkan di Brunei dikenal dengan nama durian Pulu.

Menurut Wiryanta (2008) durian Lai menghendaki jenis tanah endapan lumpur (alluvial) untuk tempat pertumbuhannya, dengan ketinggian 50-200 m dpl. pada umur 5 tahun, durian ini sudah mulai berbuah. Kelebihan durian Lai adalah termasuk durian genjah dan perawakannya kerdil, bunga durian Lai berwarna merah dan berukuran lebih besar daripada bunga durian pada umumnya, bentuk buahnya bulat, berwarna hijau, kulit buahnya yang masak berduri agak lunak dan mudah dibelah. Rasa daging buahnya manis dan empuk, tebal, bertekstur kering berwarna kuning emas dan beraroma kurang harum hampir tidak mengeluarkan aroma, sehingga lebih disukai oleh orang Eropa. Warna bijinya kuning kecoklat-coklatan. Bunga durian Lai besar, menarik dengan warna yang bervariasi dari merah muda sampai merah tua. Bunga durian Lai ini tidak bisa menyerbuk sendiri karena matangnya benang sari dan putik tidak bersamaan sehingga perlu dilakukan penyerbukan buatan untuk memaksimalkan hasil dan kualitas buah (Ranu, 2009).

Durian jenis ini sebelumnya kurang diminati, tetapi setelah ditemukan varietas yang memiliki rasa seperti *D. zibethinus* dan berdaging tebal, sekarang mulai banyak dicari dan dikembangkan. Lai mulai dibudidayakan secara komersial di Kalimantan Timur, khususnya di Kabupaten Kutai Kartanegara dan beberapa kabupaten di sekitarnya. Beberapa varietas yang telah dilepas dari

spesies ini yaitu Lai Mahakam, Lai Batuah dan Lai Kutai dari Kalimantan Timur, serta Lai Mansau dari Kalimantan Barat (Anonymous, 2013). Durian Lai (Papaken) merupakan komoditas unggulan daerah, buah eksotik, dan buah-buahan khas dari daerah tropis yang tidak dimiliki oleh daerah lainnya sehingga dapat dijadikan komoditas unggulan daerah (Krismawati, 2012). Bunga, daun dan buah durian Lai dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. (a) morfologi bunga (b) daun (c) buah durian *D. kutejensis* (Anonymous, 2013)

Mansur (2007) menambahkan bahwa durian Lai memiliki ukuran daun lebih besar dan panjang daripada durian biasa, warna daging buah kuning tua, kering, tebal, manis dan aroma buah hampir tidak ada. Durinya besar, tidak tajam dan agak jarang, warna buah hijau muda kekuningan, bentuknya bulat, lonjong, atau bulat panjang.

#### 2.4 Pengertian Isoenzim

Penanda biokimiawi biasanya memerlukan alat atau metode khusus untuk mengamatinnya. Kalangan genetik tumbuhan banyak menggunakan penanda isoenzim atau isoenzim sejak tahun 1960-an. Menurut (Pasteur, 1988 dalam Ariestin, 2014) isoenzim atau isoenzim ialah 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 ialah protein biokatalisator untuk proses-proses fisiologis tanaman yang pengadaannya dan pengaturannya dikontrol secara genetik (Shannon, 1986 dalam Ariestin, 2014). Enzim ialah suatu rantai asam amino dimana informasi genetik yang ada padanya merupakan translasi dari RNA, sedangkan RNA ialah 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 dan 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 ialah 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* Ariestin 2014).

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 berwarna 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 isoenzim. Penanda isoenzim bersifat kodominan sehingga dapat dipakai pada populasi segregasi dengan individu heterozigot. Isoenzim 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).

Penggunaan penanda isoenzim mempunyai kelebihan karena isoenzim diatur oleh gen tunggal dan bersifat kodominan dalam pewarisan, yaitu individu-individu homosigot dapat dibedakan dari individu-individu heterosigot, bersegregasi secara normal menurut nisbah Mendell, dan merupakan produk langsung gen (Azrai dan Kasim 2003 *dalam* Ariestin, 2014). 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 *dalam* Ariestin, 2014). Penanda isoenzim juga dapat digunakan dalam analisis keragaman genetik dan hubungan kekerabatan karena dikendalikan oleh gen tunggal dan bersifat kodominan dalam pewarisannya. Kelebihannya adalah mudah dilakukan dan membutuhkan bahan dalam jumlah sedikit. Metode ini telah banyak dimanfaatkan oleh pemulia tanaman untuk mengidentifikasi varietas. Analisis hubungan kekerabatan secara molekuler dapat memberikan informasi genetik tetua yang akan dipilih dalam persilangan, sehingga bermanfaat untuk budidaya dan untuk perakitan varietas unggul (Julisaniah, 2008).

### 2.5 Analisis Isoenzim

Prinsip dasar dari analisis isoenzim ialah adanya variasi alel yang disebabkan karena perbedaan ekspresi protein yang dapat diamati pada gel elektroforesis. Hanya isoenzim yang memiliki banyak variasi dalam ukuran dan bentuk atau berbeda muatannya dapat dipisahkan melalui elektroforesis. Analisis isoenzim dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik tanaman dengan menggunakan teknik elektroforesis. Teknik elektroforesis isoenzim merupakan cara yang efisien untuk sebagai teknik mendeteksi suatu jenis tanaman dengan memanfaatkan material bagian organ-organ tanaman yang berupa daun yang masih muda, bunga maupun biji (Lisdiyanti dan Hartati, 1997 *dalam* Salasa, 2013). Hal tersebut karena bagian vegetatif yang masih muda biasanya mempunyai aktivitas enzim yang tinggi, sehingga akan mudah diamati (Wendel dan Weeden, 1989).

Hal yang perlu diperhatikan dalam pengambilan sampel ialah waktu pengambilan 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* Salasa, 2013). Dalam analisis isoenzim terdapat beberapa tahap yaitu :

1. Ekstraksi enzim

Ekstraksi enzim ialah suatu kegiatan pengambilan enzim pada sampel tanaman yang diuji dengan penambahan buffer ekstrak. Pengekstrasian 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 isoenzim daun salak adalah 2 ml EDTA (Ethylene Diamine tetra Asetate) 0,01 M, 2 ml KCl 0,1 M, 2 ml  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$  1 M, 2 ml Tris HCl 1 M pH 7,5, 20 ml  $\beta$ -mercaptoethanol, 0,6 gram PVP (Polyvinyl Prolidone), 0,04 gram BSA (Bovine Serum Albumin) dan aquades 20 ml.

## 2. Elektroforesis

Elektroforesis ialah penyingkapan enzim bersama dengan aliran listrik. Tingkat migrasi dalam bidang elektrik dipengaruhi oleh bentuk dan ukuran molekul, viskositas, dan temperatur dari media atau tempat molekul bergerak (Fatchiyah *et al.*, 2011 dalam Salasa, 2013). Perbedaan antar isoenzim dapat terjadi karena adanya gen-gen yang berbeda dalam melakukan kodifikasi untuk masing-masing isoenzim dan zona-zona yang berbeda dapat mewakili rantai polipeptida yang terkandung dalam enzim tersebut (Lakitan, 2007).

Prinsip kerja elektroforesis pada isoenzim 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 isoenzim 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). Analisis molekuler merupakan pemaparan bahan genetik menggunakan alat elektroforesis. Prinsip dasar elektroforesis yaitu bahwa setiap gemon tumbuhan (enzim/protein dan DNA) mempunyai berat yang berbeda-beda sehingga kecepatan Bergeraknya pada media gel juga berbeda-beda dan hal ini dapat dilihat melalui pewarnaan (Sudarmono, 2006 dalam Hastuti, 2009).

### 3. Pewarnaan

Tahap selanjutnya dalam analisis isoenzim ialah pewarnaan menggunakan pewarna enzim. Pewarnaan ini bertujuan untuk membangkitkan aktivitas enzim dengan cara merendam lempengan gel yang mengandung enzim yang telah dilakukan elektroforesis di dalam larutan pewarna agar mendapatkan kenampakan pola pita isoenzim yang jelas. Jelas atau tidaknya kenampakan pola pita isoenzim sangat berpengaruh dalam pengidentifikasian genetik. Pita isoenzim 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 dalam Ariestin 2014).

## 2.6 Enzim Esterase dan Peroksidase

Terdapat beberapa enzim yang digunakan pada analisis isoenzim antara lain peroksidase, esterase, alkohol dehidrogenase, asam pospate alkalin, pospatase, asparat amino transferase, phosphoglucomutase, dan lain-lain (Wendel dan Weden, 1989 dalam Ariestin, 2014).

Teknik isoenzim telah banyak digunakan untuk mengkaji keragaman genetik, sistem perkawinan dan hubungan kekerabatan pada tanaman meranti, aksesori nenas, bakau bandul, durian, salak, dll. Selain itu (Fatimah dan Sucipto, 2011 dalam Ariestin 2014) menggunakan analisis isoenzim untuk mengetahui hubungan kekerabatan sebelas jenis salak Bangkalan dengan pewarnaan *peroksidase*, *dehidrogenase*, dan *catalase*. Identifikasi keragaman genetik varietas lokal kedelai di Jawa berdasarkan analisis isoenzim dengan pewarnaan *esterase*

dan *peroksidase* memberikan kenampakan pola berkas isoenzim yang jelas (Cahyarini *et al.*, 2004).

Enzim esterase 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. Sedangkan untuk enzim peroksidase merupakan anggota enzim oksidoreduktase. Adanya enzim peroksidase mudah di deteksi karena memiliki aktivitas dan stabilitas yang tinggi serta dapat menguunakan sejumlah substrat sebagai donor hidrigen (Cahyarini, 2004 *dalam* Suranto *et al.*, 2014).

Enzim-enzim *esterase* dan *peroksidase* mempunyai pola pita yang jelas dan polimorfis dan juga telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi tanaman nanas, jeruk besar, *Ramunculus nanus*, dan tebu. Pada tanaman Esterase (EST) ialah 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* Acquuah, 1992). Peroksidase (PER) pada tanaman ialah 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 enzim yang berperan dalam pertumbuhan, diferensiasi, dan pertahanan (Burnette, 1997, *dalam* Ariestin, 2014). Enzim PER berfungsi menambah atau mengurangi air ( $H_2O$ ) dari senyawa tertentu tanpa menyebabkan terurainya senyawa yang bersangkutan. Menurut (Touti, 1988 *dalam* Ariestin 2014) aktivitas isoenzim peroksidase mudah dideteksi karena aktivitasnya yang luar biasa pada jaringan. Enzim peroksidase (PER) tergolong dalam kelompok oksido reduktase, peroksidase mengkatalis  $H_2O_2$  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 *dalam* Ariestin, 2014).

Golongan enzim berdasarkan jenis senyawa yang diuraikannya:

1. Golongan enzim karbohidrase: golongan enzim yang berfungsi memecah rantai sakarida dalam proses pencernaan karbohidrat : selulose, amylase, pektinase, maltosa, sukrosa, laktosa.
2. Golongan enzim protase : golongan enzim yang berfungsi dalam proses pencernaan protein : pepsin, tripsin, entokinase, peptidase, renin, galaktase.
3. Golongan enzim esterase yang berfungsi dalam mengurai senyawa-senyawa ester: lipase dan fostatase.

Golongan enzim berdasarkan proses metabolisme atau tipe reaksi kimia : enzim katalase, oksidase, karboksilase, desmolase, peroksida, hidrase, dehidrogenase dan transphosforilase.

### 2.7 Keunggulan Analisis Isoenzim

Penggunaan isoenzim sebagai penanda genetik dalam identifikasi genetik tanaman memiliki banyak kelebihan karena isoenzim memiliki karakter yang diatur oleh gen tunggal, produk langsung dari gen, dan bersifat kodominan dalam pewarisan sifat yang berarti gen-gen se alel yang sifatnya sama-sama tidak dominan atau tidak resesif sehingga jika berada bersama-sama akan memunculkan fenotipe dari sifat keduanya. Isoenzim ialah produk dari alel yang berbeda bergerak pada posisi yang berbeda dalam gel, seringkali posisi pita merupakan produk dari suatu lokus sehingga memungkinkan untuk mendeteksi jumlah gen yang mengkode suatu enzim dengan menganalisis pola pita enzim tersebut. pada analisis isoenzim peralatan dan bahan yang diperlukan relatif murah dan percobaan dapat dilakukan dengan mudah di laboratorium serta dapat menganalisis sampel dalam jumlah banyak dengan waktu singkat dan dapat dilakukan pada fase bibit sehingga menghemat waktu, tempat dan biaya. Selain itu isoenzim ini bersifat stabil karena tidak terpengaruh oleh faktor lingkungan (Cahyarini *et al.*, 2004; Hadiati dan Sukmadjaja, 2002).

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada April-Juni 2016. Pengambilan sampel daun durian merah dan dua dugaan tetua *D. zibethinus* putih dan kuning dilaksanakan di Banyuwangi. Sedangkan untuk dugaan tetua *D. kutejensis* dan *D. graveolens* sampel daun berasal dari Kalimantan Timur. Analisis isoenzim dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan ialah 10 jenis yang terdiri dari 6 jenis durian merah (Dubang, Wayut, Musang Merah, Tretes Benel, Red King dan Balqis) dan 4 jenis dugaan tetua (*D. zibethinus* putih dan kuning, *D. graveolens*, *D. kutejensis*). Sedangkan bahan kimia yang digunakan ialah buffer pengestrak, nitrogen cair, gel poliakrilamida (separating gel 7 % dan stacking gel 5 %), *Reducing Sample Buffer* (RSB), aquades, kertas aluminium foil, serta pewarna esterase (EST) dan peroksidase (PER).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah kamera digital, gunting/cutter/pisau, spidol, plastik label, *ice box* untuk pengambilan sampel, satu set alat elektroforesis, *high voltase power supply*, pemanas air atau *microwave*, lemari es atau ruang pendingin, nampan tempat pewarnaan, mortar dan pestel, tabung eppendorf, *yellow tip*, *blue tip*, kertas saring, plastik, *tissue*, pipet, timbangan elektrik, pengaduk elektrik, gelas ukur, erlenmeyer, dan penggaris.

#### 3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini sesuai metode Wendel dan Weeden (1989) dengan beberapa modifikasi menurut prosedur Ariestin (2014).

#### 3.4 Pelaksanaan

##### 3.4.1 Pengambilan Sampel Daun Durian Merah

Kriteria daun yang diambil ialah daun ketiga dari ujung helai daun yang segar, sudah berkembang sempurna dan sehat. Masing-masing sampel daun dicuci dengan menggunakan aquades atau air bersih lalu dibungkus dengan *tissue* yang telah dibasahi kemudian dimasukkan ke dalam plastik, dan diberi label. Sampel daun dimasukkan dalam *ice box* (Lampiran 6).

### 3.4.2 Analisis Isoenzim

Analisis isoenzim dilakukan menggunakan teknik elektroforesis pada sampel durian merah dan dugaan tetuanya. Tahapan kegiatan analisis isoenzim terdiri dari pembuatan buffer pengeksrak, ekstraksi enzim daun durian, pembuatan gel akrilamid, elektroforesis, pewarnaan dan pencucian, serta dokumentasi (Lampiran 6).

#### 1. Pembuatan buffer pengeksrak

Buffer pengeksrak ini berfungsi membantu menghancurkan sel dalam suatu jumlah minimum tanpa menimbulkan panas terhadap ekstrak dan perubahan warna terhadap daun yang diekstrak. Buffer pengeksrak sebanyak 50 ml dibuat dengan melarutkan 0,01 M EDTA (Ethylene Diamine tetra Asetat) pH 8 sebanyak 1 ml, 0,1 M KCl sebanyak 3,725 ml ditambahkan aquades hingga 50 ml, 0,1 M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  sebanyak 5 ml, 2,5% PVP sebanyak 1,25 gram dalam 20 ml aquades, 0,2 % BSA sebanyak 0,1 gr, 0,1 M-Tris-Cl pH 7,5 sebanyak 2,5 ml, dan 0,1 %  $\beta$ -mercaptoetanol sebanyak 0,05 ml.

#### 2. Ekstraksi enzim daun durian

Sampel daun durian ditimbang sebanyak 0,15 gram lalu digerus pada mortar steril dengan ditambahkan nitrogen cair dan digerus hingga halus menjadi bubuk. Setelah itu tambah dan campurkan 0,8 ml buffer ekstrak. Kemudian masing-masing sampel dimasukkan ke dalam tube steril berukuran 1,5 ml dan di inkubasi pada suhu 4°C. Setelah itu disentrifugasi dalam suhu dingin 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Hasil dari sentrifugasi ialah supernatan yang merupakan ekstrak enzim. Supernatan di pisahkan dari pellet dan dipindah ke tube steril baru dengan menambahkan buffer ekstrak sebanyak 20 ml. Kemudian masing-masing sampel di homogenkan dengan vorteks dan ekstrak enzim disimpan pada suhu -20°C untuk menghindari kerusakan enzim apabila tidak langsung di elektroforesis.



Gambar 5. Tube 1,5 ml untuk tempat menyimpan ekstrak enzim

### 3. Pembuatan gel akrilamid

Pembuatan gel terdiri dari separating gel 7% dan stacking gel 5%.

- Pembuatan larutan separating gel 7% dilakukan dengan mencampur aquadest 6 ml, akrilamid 2,84 ml, 1 M tris pH 8,8 3 ml, APS (Amonium Persulfat) 10% 0,06 ml dan TEMED (Ethylenediamine) 0,006 ml kemudian dihomogenkan dengan vorteks. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam plate sampai batas dan ditambahkan aquades pada bagian atasnya. Larutan didiamkan hingga menjadi gel  $\pm 30$  menit lalu aquades dibuang setelah larutan memadat (menjadi gel).
- Pembuatan stacking gel 5%, dilakukan dengan mencampur aquades 36 ml, akrilamid 0,84 ml, 1 M tris pH 6,8 15 ml, APS (Amonium Persulfat) 10% 0,06 ml dan TEMED (Ethylenediamine) 0,006 ml. Setelah itu sisiran dipasang pada plate dan larutan dituangkan ke dalam plate. Larutan didiamkan hingga memadat (menjadi gel)  $\pm 30$  menit.

### 4. Elektroforesis

Gel diletakkan secara vertikal pada *flow migration chamber* yang telah berisi larutan running buffer. Pada sumuran yang telah terbentuk, supernatan yang telah dipersiapkan di masukkan ke dalam masing-masing sumuran yang sebelumnya telah ditambahkan RSB. Sumuran terbentuk dengan bantuan sisiran yang dapat membentuk sumuran sebelum gel memadat. Sumuran tersebut merupakan tempat untuk menaruh supernatant yang akan di elektroforesis. Supernatan kemudian dimasukkan ke dalam sumuran dengan batuan mikro pipet 0,02 ml. Kemudian di elektroforesis dengan tegangan listrik 200 volt selama 1-2 jam.



Gambar 6. Set elektroforesis untuk running isoenzim

5. Pewarnaan (staining)

Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan pewarna enzim esterase dan peroksidase.

a. Pembuatan pewarna esterase

Melarutkan  $\alpha$ -naphtyl acetate 0,025 gr,  $\beta$ -naphtyl acetate 0,025 gr, dan Fast Blue RR salt 0,05 gr yang masing-masing dilarutkan dengan aseton dingin hingga 0,025 ml yang dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml. Setelah itu campurkan dengan 100 mM Na-phospate pH 6 sebanyak 50 ml,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  sebanyak 43,85 ml, dan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sebanyak 6,15 ml.

b. Pembuatan pewarna peroksidase

Dengan cara mencampurkan 50 mM Na-acetate buffer pH 5,0,  $\text{CaCl}_2$  sebanyak 50 mg,  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% sebanyak 0,25 ml, 3-amino-9-ethlearbazole sebanyak 25 ml, dan DMF sebanyak 2 ml.

Setelah proses running selesai, gel dipindahkan ke dalam wadah yang telah berisi masing-masing pewarna esterase dan peroksidase. Setelah itu tutup wadah dan dimasukkan ke dalam water bath pada suhu  $40^\circ\text{C}$  selama  $\pm 45$  menit hingga pola pita isoenzim nampak jelas.



Gambar 7. *Water Bath* yang digunakan untuk memunculkan pola pita isoenzim

6. Pencucian dan fiksasi

Setelah pewarnaan gel dicuci dengan aquades sampai bersih, setelah itu di fiksasi dengan larutan destaining dan diletakkan pada shaker. Selanjutnya potongan gel yang berisi garis-garis atau pita-pita kemudian diamati dan ditentukan pola. Larutan destaining dibuat dengan mencampurkan 100 ml metanol, 75 ml asam asetat glasial. Kemudian diencerkan dengan aquades hingga volume 1 liter.

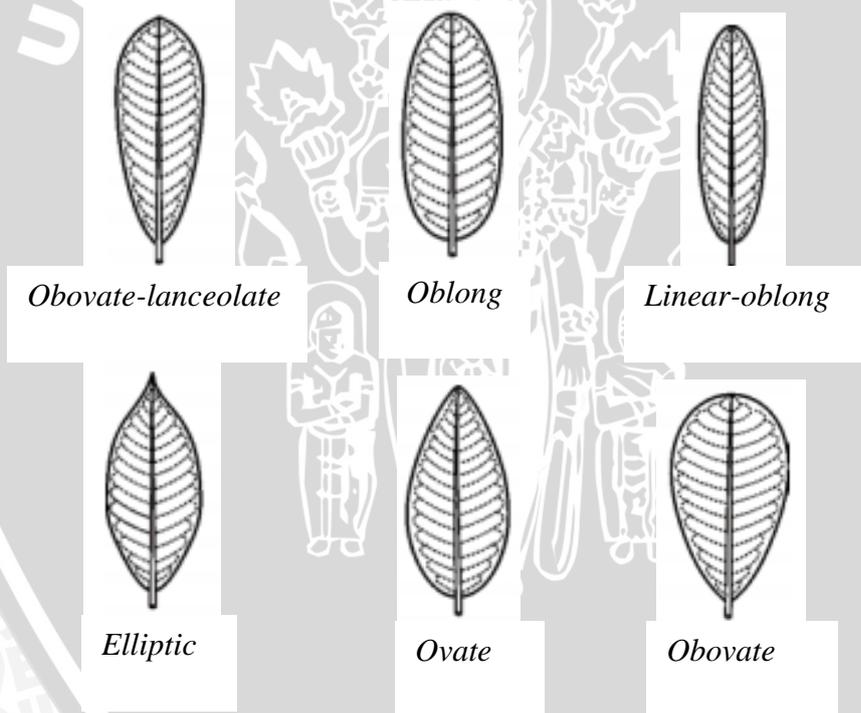
7. Dokumentasi pola pita enzim

Daya tahan gel ini tidak bisa disimpan terlalu lama, maka sebaiknya setelah proses pencucian segera di gambar dan di dokumentasikan. Gel diletakkan di atas plastik bening dan di amati pada ruangan yang terang atau bercahaya, diambil data untuk melihat pola pita yang muncul dan dokumentasi.

**3.4.3 Pengamatan Morfologi Daun**

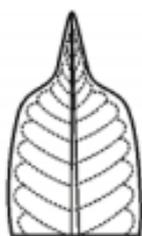
Pengamatan morfologi daun dilakukan pada daun ketiga dari ujung helai yang sehat dan sudah membuka sempurna. Analisis morfologi kualitatif daun durian dibantu dengan buku panduan *Biodiversity International Descriptors for Durian (D. zibethinus Murr.)*, 2007. Sedangkan untuk analisis morfologi kuantitatif daun durian diukur panjang dan lebar daun menggunakan penggaris.

A. Bentuk Helai Daun



B. Bentuk Daun Atas



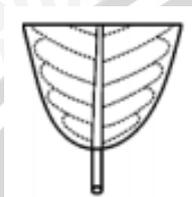


Caudate

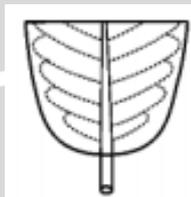


Cuspidate

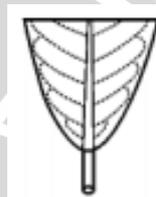
### C. Bentuk Daun Bawah



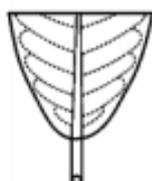
Round



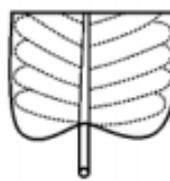
Obtuse



Acute



Cuneate



Cordate

### 3.5 Analisis Data

Data hasil analisis isoenzim yang berupa pola pita kemudian di Gambar zimogramnya (pola pita isoenzim) untuk memperjelas visualisasi pola pita pada gel hasil elektroforesis. Data zimogram selanjutnya diterjemahkan menjadi data biner dengan cara memberi nilai 0 untuk pita yang tidak muncul dan nilai 1 untuk nilai pita yang muncul. Pada data biner pola pita isoenzim selanjutnya di analisis matriks kemiripannya dengan program NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) versi 2.02 melalui prosedur SIMQUAL (*Similarity for Qualitative Data*) dan dilanjutkan analisis pengelompokan menggunakan prosedur SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarchical Nested Cluster Analysis*) (Rohlf, 2004). Untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat ketiga parameter pengamatan (isoenzim esterase, peroksidase dan analisis morfologi) diintegrasikan kedalam satu gambar dendrogram.

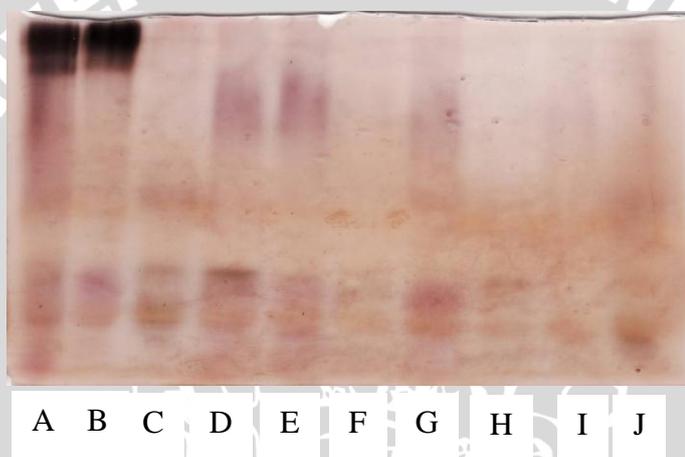
## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil

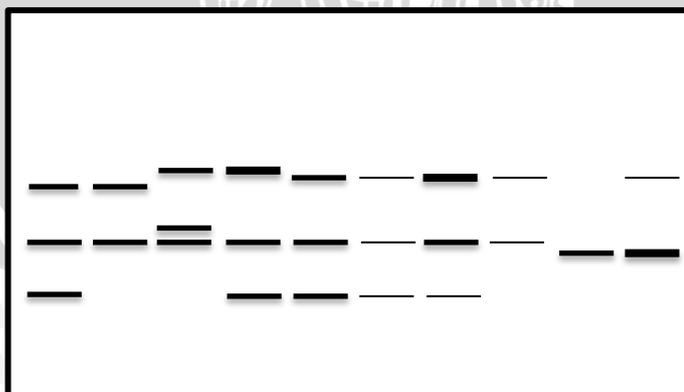
#### 4.1.1 Analisis Isoenzim dengan Enzim Esterase

Berdasarkan hasil analisis isoenzim menggunakan enzim esterase menunjukkan bahwa migrasi pita isoenzim tidak terlalu baik sehingga mengakibatkan hasil pola pita yang dihasilkan tidak terlalu jelas terbaca. Terdapat pola pita yang tebal dan tipis serta jumlah pola pita yang dihasilkan pada masing-masing sampel juga beragam.

Gambar pola pita setelah elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 8, sedangkan untuk zimogram enzim esterase dapat dilihat pada Gambar 9.

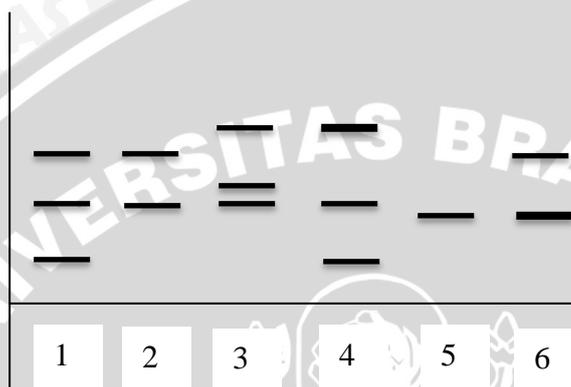


Gambar 8. Hasil elektroforesis isoenzim EST, dimana A = *D. graveolens*, B = *D. kutejensis*, C = *D. zibethinus* kuning, D = *D. zibethinus* putih, E = Dubang, F = Wayut, G = Musang Merah, H = Tretes Benel, I = Red King, J = Balqis



Gambar 9. Hasil zimogram dihasilkan oleh Enzim Esterase

Berdasarkan hasil elektroforesis isoenzim Esterase, menunjukkan bahwa terdapat 6 pola pita yang ditemukan pada 10 jenis durian. Hal tersebut menandakan jumlah gen yang terkespresikan oleh enzim pada tanaman durian. Keenam pola pita tersebut dapat dilihat pada Gambar 10. Sedangkan untuk keragaman pola pita yang dihasilkan oleh enzim esterase dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 10. Keragaman pola pita isoenzim EST pada 10 sampel daun durian

**Tabel 1. Keragaman Pola Pita Isoenzim EST pada 10 Sampel Daun Durian**

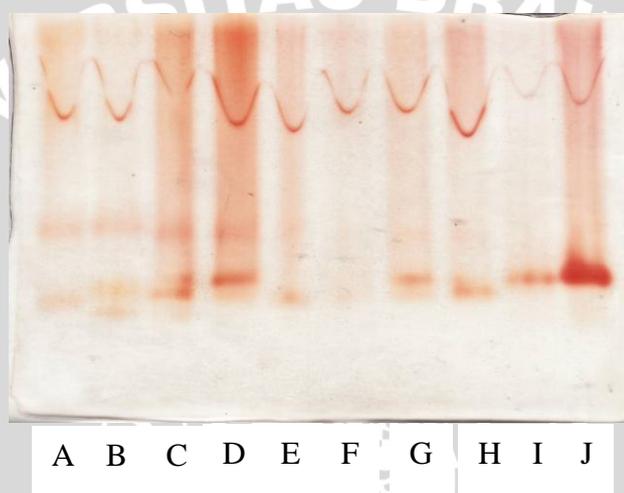
No.	Aksesi	Pola Pita					
		1	2	3	4	5	6
1.	<i>D. graveolens</i>	√					
2.	<i>D. kutejensis</i>		√				
3.	<i>D. zibethinus</i> kuning			√			
4.	<i>D. zibethinus</i> putih				√		
5.	Dubang	√					
6.	Wayut	√					
7.	Musang Merah	√					
8.	Tretes Benel		√				
9.	Red King					√	

Berdasarkan Tabel 1, maka terdapat 6 jenis pola pita yang terbentuk. Dimana pola pita pertama adalah durian *D. graveolens*, Dubang, Wayut dan Musang Merah. Pola pita kedua adalah durian *D. kutejensis* dan Tretes Benel. Pola pita ketiga adalah durian *D. zibethinus* kuning. Pola pita ketiga adalah durian *D. zibethinus* putih. Pola pita kelima adalah durian jenis Red King, pola pita keenam adalah durian Balqis.

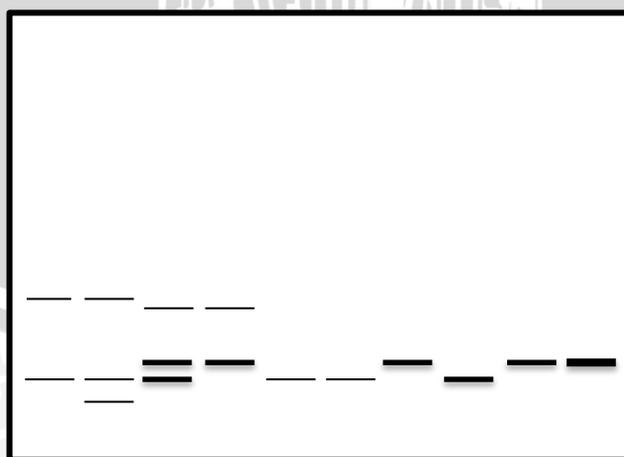
#### 4.1.2 Analisis Isoenzim dengan Enzim Peroksidase

Berdasarkan hasil analisis isoenzim menggunakan enzim peroksidase menunjukkan bahwa migrasi pita isoenzim berjalan baik sehingga mengakibatkan hasil pola pita yang dihasilkan mudah terbaca dengan jelas. Terdapat pola pita yang tebal dan tipis serta jumlah pola pita yang dihasilkan pada masing-masing sampel juga beragam.

Gambar pola pita setelah elektroforesis dan zimogram menggunakan enzim peroksidase yang telah divisualisasikan dapat dilihat pada Gambar 11 dan 12.



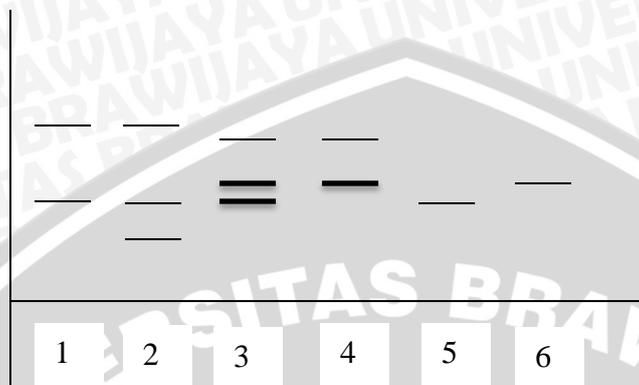
Gambar 11. Hasil elektroforesis isoenzim PER, dimana A = *D. graveolens*, B = *D. kutejensis*, C = *D. zibethinus* kuning, D = *D. zibethinus* putih, E = Dubang, F = Wayut, G = Musang Merah, H = Tretes Benel, I = Red King, J = Balqis



Gambar 12. Zimogram dihasilkan oleh Enzim Peroksidase

Berdasarkan hasil elektroforesis isoenzim Peroksidase menunjukkan bahwa terdapat 6 pola pita yang ditemukan pada 10 jenis durian. Hal tersebut

menandakan jumlah gen yang terkespresikan oleh enzim pada tanaman durian. Keenam pola pita tersebut dapat dilihat pada Gambar 13. Sedangkan untuk keragaman pola pita yang dihasilkan oleh enzim esterase dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 13. Keragaman pola pita yang dihasilkan oleh enzim PER

**Tabel 2. Keragaman Pola Pita isenzim PER pada 10 sampel tanaman durian**

No.	Aksesi	Pola Pita					
		1	2	3	4	5	6
1.	<i>D. graveolens</i>	√					
2.	<i>D. kutejensis</i>		√				
3.	<i>D. zibethinus</i> kuning			√			
4.	<i>D. zibethinus</i> putih				√		
5.	Dubang					√	
6.	Wayut					√	
7.	Musang Merah						√
8.	Tretes Benel					√	
9.	Red King						√
10.	Balqis						√

Sedangkan berdasarkan Tabel 2, maka terdapat 6 pola pita yang terbentuk. Dimana pola pita pertama *D. graveoelens*, pola pita kedua *D. kutejensis*, pola pita ketiga *D. zibethinus* kuning, pola pita keempat *D. zibethinus* putih. Pola pita kelima adalah durian Dubang, Wayut dan Tretes Benel, pola pita keenam adalah durian Musang Merah, Red King dan Balqis.

#### 4.1.3 Analisis Karakter Morfologi Kualitatif dan Kuantitatif

Pengamatan morfologi digunakan untuk mengidentifikasi suatu tanaman. selain itu fungsi lain ialah untuk mengetahui keragaman dan juga hubungan kekerabatan serta nilai kemiripan suatu tanaman dengan melihat morfologi daun

dari durian merah Banyuwangi dengan dugaan tetua. Pengamatan karakter morfologi kualitatif diamati berdasarkan acuan dari IPGRI dengan pengamatan meliputi bentuk helai daun, bentuk ujung dan pangkal daun, serta warna daun atas dan bawah. Berdasarkan hasil analisis karakter morfologi, tidak memiliki perbedaan yang signifikan dilihat pada (Tabel 3). Hal ini dapat dilihat pada beberapa bentuk helai daun, bentuk ujung dan pangkal daun serta warna daun atas dan bawah yang memiliki bentuk dan warna yang sama pada sampel satu dengan yang lainnya. Hasil pengamatan menunjukkan dugaan tetua *D. graveolens* memiliki bentuk helai daun yang sama dengan *D. zibethinus* putih, *D. zibethinus* kuning, Dubang, Wayut, Musang Merah, Tretes Benel, Red King dan Balqis yaitu *linier oblong*. Namun berbeda dengan yang lainnya *D. kutejensis* memiliki helai daun berbentuk *obovate lenceolate*. Pada karakter morfologi kualitatif bentuk ujung daun keseluruhan sampel tidak memiliki perbedaan yaitu berbentuk *acute*. Berbeda dengan bentuk ujung daun, untuk pengamatan morfologi bentuk pangkal daun jenis durian merah Banyuwangi Dubang dan Musang Merah memiliki kesamaan bentuk dengan dugaan tetua *D. graveolens* yaitu berbentuk *long acuminate*. Pada pengamatan warna daun atas dan bawah diperoleh hasil pada *D. zibethinus* kuning, putih dan Red King memiliki warna daun atas yaitu hijau tua. Sedangkan pada pengamatan warna daun atas *D. graveolens*, *D. kutejensis*, Dubang, Wayut, Musang Merah, dan Tretes Benel memiliki warna daun bawah hijau. Kemudian pada pengamatan warna daun bawah diperoleh hasil bahwa keseluruhan sampel daun durian memiliki warna daun bawah yang sama yaitu tembaga.

**Tabel 3. Karakter Morfologi Kualitatif Daun**

Sampel	Bentuk ujung daun	Bentuk pangkal daun	Bentuk helai daun	Warna daun atas	Warna daun bawah
<i>D. graveolens</i>	<i>Long acuminate</i>	<i>Acute</i>	<i>Linier oblong</i>	Hijau	Tembaga
<i>D. kutejensis</i>	<i>Acuminate</i>	<i>Acute</i>	<i>Obovate lanceolate</i>	Hijau	Tembaga
<i>D. zibethinus</i> kuning	<i>Acuminate</i>	<i>Acute</i>	<i>Linier oblong</i>	Hijau tua	Tembaga
<i>D. zibethinus</i> putih	<i>Acuminate</i>	<i>Acute</i>	<i>Linier oblong</i>	Hijau tua	Tembaga
Dubang	<i>Long acuminate</i>	<i>Acute</i>	<i>Linier oblong</i>	Hijau	Tembaga
Wayut	<i>Acuminate</i>	<i>Acute</i>	<i>Linier oblong</i>	Hijau	Tembaga
Musang Merah	<i>Long acuminate</i>	<i>Acute</i>	<i>Linier oblong</i>	Hijau	Tembaga
Tretes Benel	<i>Acuminate</i>	<i>Acute</i>	<i>Linier oblong</i>	Hijau	Tembaga
Red King	<i>Acuminate</i>	<i>Acute</i>	<i>Linier oblong</i>	Hijau tua	Tembaga
Balgis	<i>Acuminate</i>	<i>Acute</i>	<i>Linier oblong</i>	Hijau	Tembaga

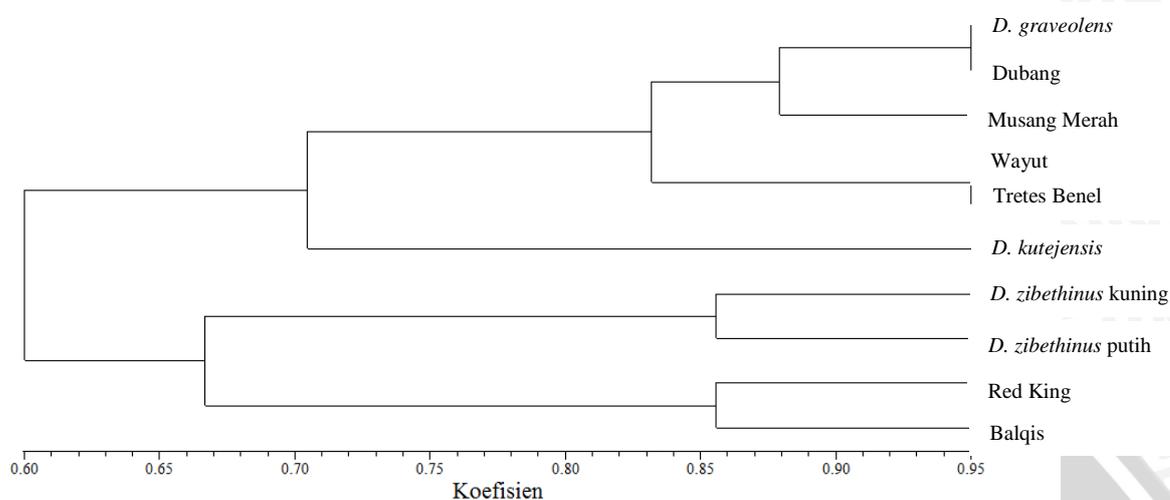
Berikut ialah pengamatan karakter morfologi kuantitatif pada 6 jenis durian merah Banyuwangi dan 4 dugaan tetua. Karakter morfologi kuantitatif yang diamati ialah panjang daun, lebar daun dan rasio p/l daun durian. Hasil pengamatan karakter morfologi kuantitatif dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Karakter Morfologi Kuantitatif Daun**

Sampel daun	Panjang daun (cm)	Lebar daun (cm)	Rasio P/L daun (cm)
<i>D. graveolens</i>	16,15	6,25	2,58
<i>D. kutejensis</i>	13	4,25	3,05
<i>D. zibethinus</i> kuning	15,75	5,65	2,79
<i>D. zibethinus</i> putih	15,25	4,00	3,81
Dubang	15,5	3,80	4,08
Wayut	12,25	3,60	3,40
Musang Merah	13	4,30	3,02
Tretes Benel	10,8	3,85	2,80
Red King	18,25	6,65	2,74
Balqis	16	5,25	3,05

Berdasarkan pengamatan karakter morfologi kuantitatif pada rasio p/l daun diperoleh hasil sebagai berikut, setiap daun masing-masing memiliki panjang yang berbeda-beda. Daun yang memiliki panjang daun terpanjang terdapat pada jenis durian merah Banyuwangi Red King sebesar 18,25 cm sedangkan untuk panjang daun terkecil terdapat pada jenis durian merah Banyuwangi jenis Wayut sebesar 12,25 cm. Selanjutnya untuk pengukuran lebar daun, daun yang terlebar terdapat pada jenis durian merah Banyuwangi Red King sebesar 6,65 cm sedangkan lebar daun terkecil terdapat pada jenis durian merah Banyuwangi Wayut sebesar 3,6 cm. Berdasarkan hasil pengukuran panjang dan lebar kemudian dapat diperoleh rasio panjang lebar daun. Rasio panjang lebar daun diperoleh dari hasil pembagian dari nilai panjang dibagi nilai lebar. Dari perhitungan tersebut diperoleh rasio daun 10 sampel rata-rata memiliki nilai rasio panjang lebar daun sebesar 3 cm.

Berikut ialah hasil dendogram menggunakan enzim esterase, peroksidase dan morfologi daun dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Dendogram hasil analisa isoenzim esterase, peroksidase dan morfologi daun 10 sampel daun durian

Berdasarkan pola pita isoenzim dan analisis morfologi yang dihasilkan, kemudian divisualisasikan dalam bentuk zimogram dan diinterpretasikan menjadi data biner (Lampiran 8). Data skoring dengan nilai 0 untuk pola pita yang tidak muncul pada tiap lokus, sedangkan nilai 1 untuk pita yang berhasil muncul pada tiap lokus. Selanjutnya data di masukkan dan diolah dengan menggunakan program NTSYS versi 2.02 melalui prosedur SIMQUAL (*Similarity for Qualitative Data*) dan dilanjutkan analisis pengelompokan menggunakan prosedur SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarical Nested Klaster Analysis*). Hasil akhir berupa dendogram yang akan dianalisis hubungan kekerabatan dan matriks kemiripannya.

Berdasarkan hasil dendogram koefisien jarak genetik ditentukan berdasarkan kesamaan koefisien kemiripan *vearsion* pada jarak 0,775. Penentuan pengelompokan dilakukan berdasarkan pada nilai rata-rata jarak terendah dan jarak tertinggi yaitu  $(0,06+0,95):2=0,775$ . Sehingga pada jarak tersebut aksesori dibagi menjadi 4 klaster. Klaster pertama ialah jenis durian Red King dan Balqis yang mengelompok sendiri diduga memiliki kemiripan sebesar 86%. Klaster kedua *D. zibethinus* putih dan kuning yang mengelompok sendiri diduga memiliki kemiripan sebesar 80%. Klaster ketiga yaitu *D. graveolens* yang diduga memiliki kemiripan dengan durian merah jenis Dubang, Musang Merah, Wayut

dan Tretes Benel. Sedangkan klaster keempat *D. kutejensis* yang mengelompok sendiri.

Hasil dugaan tetua dan hubungan kekerabatan dengan durian merah Banyuwangi disajikan pada Tabel 5.

**Tabel 5. Hasil Dugaan Tetua dan Hubungan Kekerabatan dengan Durian Merah Banyuwangi**

Analisis	Dugaan Tetua	Durian Merah Banyuwangi	Koefisien Kemiripan
Enzim esterase, peroksidase, morfologi	<i>D. Graveolens</i>	Dubang, Musang Merah, Wayut dan Tretes Benel	83%

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1 Analisis Isoenzim menggunakan Enzim Esterase, Peroksidase dan Morfologi Daun

Berdasarkan hasil zimogram menggunakan enzim esterase menunjukkan bahwa Gambar 9 memiliki kenampakan pita yang tampak kurang jelas untuk di analisis dan di interpretasikan. Munculnya pita ini berasal dari pergerakan enzim pada media gel sewaktu dilakukan elektroforesis menyebabkan terbentuknya pola pita. Pola pita tersebut sebenarnya adalah enzim-enzim yang memiliki berat molekul dan muatan yang berbeda. Ketika diberi aliran listrik, enzim dengan berat molekul yang lebih besar akan bergerak lebih lambat pada media gel sedangkan enzim dengan berat molekul lebih kecil dapat bergerak lebih cepat, sehingga sewaktu dilakukan pewarnaan terlihat seperti pita-pita (Mayasari, 2014). Hasil elektroforesis isoenzim menggunakan esterase terbentuk 6 pola pita. Keragaman pola pita tersebut secara tidak langsung menunjukkan susunan genetik yang berbeda pula pada tiap jenis tanaman, karena enzim merupakan produk langsung dari gen dengan asam amino sebagai penyusunnya. Asam amino tersebut disandi oleh basa nukleotida DNA yang khas untuk setiap jenis enzimnya (Purwanto *et al.*, 2002). Hal tersebut menunjukkan bahwa adanya sifat polimorfis pada beberapa sampel yang di uji. Perubahan susunan asam amino yang membentuk protein akan merubah pula fenotipe tanaman sehingga mengakibatkan munculnya keragaman genetik (Suryo, 2005).

Pada pola pita yang dihasilkan oleh enzim esterase memiliki pola pita yang beragam. Perbedaan ukuran pita yang dihasilkan ialah karena adanya perbedaan berat molekul yang di kandung. Berat molekul yang berbeda mengakibatkan munculnya pita dengan ukuran tebal dan tipis. Semakin berat muatan molekul yang dikandungnya maka semakin lambat pula proses migrasi pada saat elektroforesis sehingga mengakibatkan penebalan pada pita yang terbentuk. Begitu pula sebaliknya, semakin ringan berat molekul yang dikandungnya maka pergerakan atau migrasi pada saat elektroforesis dapat terjadi dengan mudah dan cepat sehingga terbentuklah pita yang tipis. Pernyataan tersebut didukung oleh Achmad *et al.*, (2009) yang menyatakan bahwa perbedaan kecepatan migrasi atau jarak migrasi dan ketebalan pola pita ini ditentukan oleh besar dan beratnya molekul. Perbedaan jarak migrasi menunjukkan perbedaan muatan atau berat molekul protein, yang berarti adanya perbedaan struktur molekulnya.

Kenampakan pola pita hasil analisis isoenzim menggunakan enzim esterase tidak begitu dapat divisualisasikan dan diinterpretasikan dengan baik. Menurut Syafitri (2013) mengemukakan bahwa visualisasi pita pada gel terkait dengan resolusinya. Resolusi yang baik akan memperlihatkan pita yang jelas dan dipengaruhi oleh kualitas bahan dan sampel yang digunakan. Pita-pita yang terpisah terbentuk dari molekul protein yang bergerak bersama dan mempunyai densitas muatan yang sama. Pita akan terdeteksi jika individu makromolekul mempunyai ukuran yang berbeda dan molekul dalam satu pita pada jarak migrasi yang sama tersebut cukup untuk berikatan dengan pewarna (Acquaah, 1992 *dalam* Syafitri, 2013). Sehingga perlu dilakukan identifikasi pada morfologi daun untuk menunjang hasil. Kesalahan pada saat pengambilan sampel juga dapat berpengaruh pada kerja isoenzim. Waktu yang tepat saat pengambilan sampel ialah sebelum matahari terbit. Hal ini dikarenakan enzim tidak tahan terhadap suhu panas dan akan mengakibatkan denaturasi (kerusakan enzim akibat suhu panas). Diduga kandungan fenol yang sangat tinggi akan mudah rusak karena suhu atau lingkungan yang tidak sesuai (Fatimah, 2011). Lingkungan yang terlalu dominan dapat mempengaruhi aktivitas enzim, seperti panas, temperatur dan pH (Claudia *et al.*, 2002 *dalam* Rahmawati *et al.*, 2010). Hal ini menyebabkan

kerusakan enzim oleh keadaan lingkungan (Falconer dan Mackay, 1996 dalam Rahmawati *et al.*, 2010).

Berdasarkan hasil dendrogram gabungan menggunakan enzim esterase, peroksidase dan morfologi daun (Gambar 15) pada 10 sampel yang diuji pada koefisien jarak genetik 0,775 terbagi menjadi empat klaster. Berdasarkan dendrogram (Gambar 15) durian merah Banyuwangi jenis Dubang, Musang Merah, Wayut dan Tretes Benel diduga memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *D. graveolens*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada 10 aksesi yang diuji memiliki hubungan kekerabatan yang dekat. Menurut Cahyarini *et al.*, (2004) dua varietas atau lebih dapat dikatakan mirip apabila jarak kemiripannya atau tingkat similaritasnya tidak kurang dari 60%. Wijayanto *et al.*, (2013) menambahkan bahwa semakin kecil nilai koefisien kemiripan (mendekati nol), maka hubungan kekerabatannya semakin jauh dan sebaliknya semakin besar nilai koefisien kemiripan (mendekati satu), maka hubungan kekerabatannya semakin dekat. Terbentuknya klaster tersebut berdasarkan kemiripan pada jumlah pita yang terbentuk pada setiap lokusnya. Pada hasil elektroforesis menggunakan enzim peroksidase dan esterase terbentuk 6 pola pita, hal tersebut menandakan bahwa 10 sampel tanaman durian tersebut bersifat polimorfis. Menurut Hadiati (2003) semakin besar nilai derajat kemiripan genetik berarti semakin besar kemiripan genetiknya. Ditambahkan pula oleh Rahmawati *et al.*, (2010) menyatakan bahwa semakin jauh hubungan kekerabatan antar sampel, maka semakin kecil keberhasilan persilangan, tetapi kemungkinan untuk memperoleh genotip unggul lebih besar jika persilangan berhasil. Semakin beragam genetik, maka semakin besar kemungkinan diperoleh genotip unggul. Perkawinan antara individu dengan jarak genetik dekat atau hubungan kekerabatannya sama mempunyai efek peningkatan homozigositas, sebaliknya perkawinan antara individu berjarak genotip besar atau kekerabatannya jauh mempunyai efek peningkatan keterozigositas.

Pengamatan morfologi dilakukan dengan melihat bentuk helai durian, bentuk ujung dan pangkal daun, warna daun atas dan bawah, mengukur panjang dan lebar daun serta menghitung rasio p/l daun durian. Pada pengamatan morfologi kualitatif seperti bentuk daun ini biasanya dikendalikan oleh gen satu

atau dua gen sehingga peluang adanya pengaruh lingkungan ialah sedikit. Menurut Poespodarsono (1988) menyatakan bahwa pengelompokan berdasarkan sifat kualitatif lebih mudah, karena sebarannya deskriptif (tegas) dan sifat kualitatif dikendalikan oleh gen sederhana serta faktor lingkungan kurang berpengaruh.

Pengamatan morfologi kualitatif dan kuantitatif digunakan selain untuk mengetahui keragaman suatu tanaman tetapi juga untuk mengetahui hubungan kekerabatan dan tingkat kemiripan genetik 6 sampel durian merah Banyuwangi dengan 4 dugaan tetua. Hal tersebut juga diungkapkan oleh Ariestin *et al.*, (2015) bahwa data morfologi kualitatif digunakan untuk mengidentifikasi suatu tanaman berdasarkan sifat-sifat yang terekspressi dalam fenotipe tanaman. Selain itu, untuk mengetahui kedekatan kekerabatan dan tingkat kemiripan genetik antar tanaman.

Menurut Sitompul dan Guritno 1995 dalam Rahmawati *et al.*, 2010 menyatakan bahwa penampilan bentuk tanaman dikendalikan oleh sifat genetik tanaman dibawah pengaruh faktor-faktor lingkungan. Sifat-sifat kuantitatif biasanya dikontrol oleh banyak gen dan sangat dipengaruhi oleh lingkungan, sedangkan untuk sifat-sifat kualitatif hampir tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan, sehingga sifat kualitatif lebih diutamakan karena berhubungan dengan ada atau tidaknya pita pada jarak migrasi tertentu yang mencerminkan ada atau tidaknya asam amino penyusun enzim yang merupakan produk gen itu sendiri (Bailey, 1983 dalam Cahyarini, 2004).

Beberapa pendugaan hubungan kekerabatan yang dekat antara durian merah Banyuwangi dengan dugaan tetua tersebut dimungkinkan karena asal mula persebaran *D. graveolens* yang diduga karena adanya perdagangan atau adanya migrasi masyarakat yang pertama kali membawa bibit jenis tersebut ke Banyuwangi. Terdapat pohon durian merah jenis Wayut dan Dubang yang ternyata sudah ada di Banyuwangi sejak ratusan tahun lalu menurut petani dan merupakan hasil turun temurun dari kakek buyut mereka. Hal tersebut didukung dengan adanya pohon durian merah Banyuwangi jenis Dubang dan Wayut yang memiliki tinggi dan diameter lebih dari 50 m. Berdasarkan informasi tersebut diduga persebaran durian merah yang ada di Banyuwangi ialah karena adanya perdagangan dan migrasi masyarakat yang membawa bibit dari Kalimantan.

Kalimantan ialah salah satu pulau yang banyak memiliki plasma nutfah durian. Sehingga dimungkinkan secara genetik durian merah Banyuwangi diduga memiliki kesamaan dengan *D. graveolens*. Durian jenis tersebut ialah durian endemik Kalimantan (Uji, 2005). Dilaporkan bahwa dari sekitar 27 jenis *Durio* di seluruh dunia, 18 jenis diantaranya tumbuh di Kalimantan, 11 jenis di Malaysia, dan 7 jenis di Sumatera (Kostermans, 1958). Tingginya jumlah jenis *Durio* yang tumbuh di Kalimantan memberikan gambaran bahwa kawasan ini merupakan pusat persebaran terpenting untuk kerabat durian (Uji, 2005). Oleh karenanya Kalimantan disebut sebagai *center of diversity Durio*. Menurut (Vavilov, 1992 dalam Hummer and Hancock, 2015) menyatakan bahwa *centers of origin* ialah dimana keragaman genetik dari spesies tanaman yang paling tertinggi. *Center of diversity* ialah dimana tingkat tertinggi dari keragaman genetik pada spesies tanaman tertentu daripada *center of origin*. Menurut Fowler and Mooney (1990) menambahkan bahwa dengan penanda molekuler dan teknik yang lain dapat mengidentifikasi asal atau persebaran awal tanaman tersebut. Sehingga dapat diduga bahwa Kalimantan merupakan *center of diversity Durio (primary centers)*.

Selain itu keberadaan durian merah Banyuwangi yang memiliki jenis beragam diduga karena adanya silang alami dengan durian spesies lainnya seperti *D. zibethinus* kuning dan putih. Hal ini diperkuat dengan keberadaan pohon *D. zibethinus* kuning dan putih yang letaknya berdekatan dengan durian merah Banyuwangi. Menurut Tomlinson, 1986 (dalam Hamzah, 2009) mengemukakan bahwa tanaman yang memiliki bunga hermaphrodit (berumah satu) yaitu bunga sempurna (bunga jantan dan betina dalam satu bunga yang sama). Kemungkinan bersifat protandri lemah, yang artinya serbuk sari masak sedikit lebih awal dibandingkan dengan sel telur, dan *self-compatible* (serbuk sari bunga sendiri dapat menyerbuki sel telur bunga sendiri, sehingga dengan demikian tidak ada fenomena *self-incompatible*). Penyerbukannya dilakukan oleh bantuan angin, dalam hal ini menunjukkan bahwa dapat terjadi penyerbukan silang maupun sendiri. Pada penyerbukan oleh angin maka serbuk sari suatu bunga secara acak dapat menyerbuki sel telur bunga sendiri, sehingga terjadi penyerbukan sendiri maupun sel terluar dari bunga tanaman lain, sehingga terjadi penyerbukan silang. Menurut Hamzah (2009) adanya inkompatibilitas silang dalam mencegah tanaman

mengadakan penyerbukan sendiri, sehingga tumbuhan cenderung melakukan penyerbukan silang.

Dalam persilangan, semakin jauh jarak genetik antar tetua, maka peluang dihasilkan kultivar baru akan menjadi besar. Sebaliknya, persilangan antar tetua yang berkerabat dekat menghasilkan terjadinya variabilitas genetik yang sempit (Hadiati, 2002). Genotip yang berasal dari daerah yang sama tidak selalu berada dalam kelompok yang sama. Semakin banyak persamaan karakter morfologi yang dimiliki menunjukkan semakin dekat hubungan kekerabatannya, sebaliknya semakin jauh persamaan karakter maka semakin jauh pula hubungan kekerabatannya (Jose *et al.*, 2005 dan deZousa, 2008 *dalam* Warhamni *et al.*, 2013). Menurut Hasfah *et al.*, (2014) menambahkan hubungan kekerabatan yang jauh akan meningkatkan variasi dalam persilangan.



## 5. PENUTUP

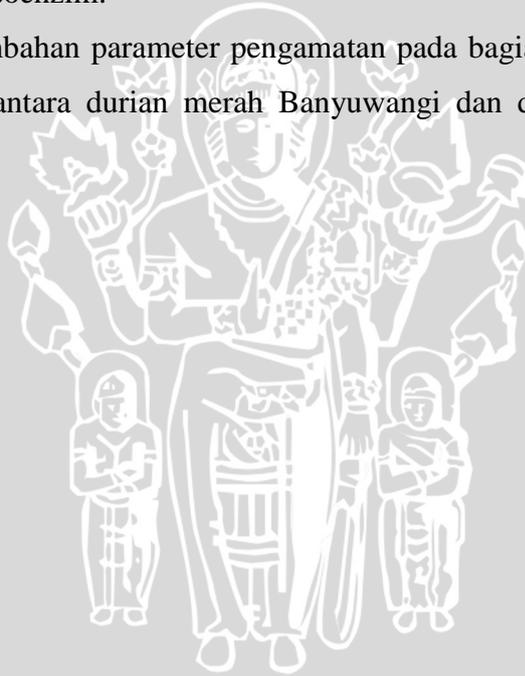
### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

Durian merah Banyuwangi jenis Dubang, Musang Merah, Wayut dan Tretes Benel diduga merupakan keturunan dari *D. graveolens* diduga pada koefisien kemiripan 83%.

### 5.2 Saran

- Perlu dilakukan analisis yang langsung mengarah pada struktur DNA seperti RAPD, mikrosatelit dan lain-lain.
- Penggunaan enzim lain yang dapat memunculkan pola pita yang cocok dan jelas pada analisis isoenzim.
- Perlu adanya penambahan parameter pengamatan pada bagian tanaman durian lainnya agar sifat antara durian merah Banyuwangi dan dugaan tetua lebih dapat diidentifikasi.



## DAFTAR PUSTAKA

- Achmad., E.N. Herliyana., F.R. Agustian. 2009. Hubungan Kekerabatan Jamur Pelapuk Putih *Pleurotus* spp. Dengan Analisis Isoenzim. Jurnal AgroBiogen. 5 (2): 78-83.
- Acquah, G. 1992. Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research. Dioscorides Press. Portland Oregon. 127 pp.
- Anonimous, 2012<sup>b</sup>. Klasifikasi *Durio zibethinus*, *graveolens*, *kutejensis*. <http://plantamor.com>. Diakses pada 16 Juli 2016.
- Anonimous. 2007. *Durio* sp. <http://toptropical.com>. Diakses tanggal 18 Desember 2015.
- Anonimous. 2012<sup>a</sup>. Durian Research Centre Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. <http://drc.fp.ub.ac.id>. Diakses tanggal 7 Desember 2015.
- Anonimous. 2013<sup>a</sup>. Budidaya Durian. <http://infopekalongan.com>. Diakses tanggal 20 April 2015.
- Anonimous. 2013<sup>b</sup>. Durian. <http://id.wikipedia.org>. Diakses tanggal 20 April 2015.
- Anonimous. 2013<sup>c</sup>. Mengenal Ragam dan dan Potensi Pemanfaatan Sumberdaya Genetik Durian. Litbang Penelitian. 9 pp.
- Anonimous. 2014<sup>a</sup>. <http://banyuwangiapi.blogspot.com/2014/05/nikmatnya-durian-merah-khas-Banyuwangi.html>. Diakses tanggal 23 April 2015.
- Anonimous. 2014<sup>b</sup>. [www.banyuwangibagus.com/nikmatnya-durian-merah-khas-banyuwangi.htm](http://www.banyuwangibagus.com/nikmatnya-durian-merah-khas-banyuwangi.htm). Diakses 11 Desember 2015.
- Anonimous. 2014<sup>c</sup>. Durian Monthong. [www.infoagribisnis.com](http://www.infoagribisnis.com). Diakses tanggal 18 Desember 2015.
- Anonimous. 2015. Teknik Menyilangkan Durian. [www.langkahbisnis.com](http://www.langkahbisnis.com). Diakses tanggal 7 Desember 2015.
- Ariestin, Y. 2014. Keragaman Jenis Salak Bangkalan (*Salacca zalaca* (Gaertner) Voss) Menggunakan Penanda Morfologi dan Analisis Isoenzim. Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Ariestin, Y., Kuswanto., S. Ashari. 2015. Keragaman Jenis Salak Bangkalan (*Salacca zalacca* (Gertner) Voss) menggunakan Penanda Morfologi dan Analisis Isoenzim. J. Hort. Tan 1 (3): 35-42
- Ashari, S. 2006. Hortikultura Aspek Budidaya. UI Press. Jakarta. 490 pp.
- Bansir, L., S. Ashari, M. S. Awaluddin. 2010. Persilangan Durian Antar Spesies (*Durio zibethinus* x *Durio kutejensis*). Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. 8 pp.
- Cahyarini, R.T., A. Yunus., E. Purwanto. 2004. Identifikasi Keragaman Genetik Beberapa Varietas Lokal Kedelai di Jawa berdasarkan Analisis Isoenzim. Agrosains 6 (2): 79-83.

- Fajriani, S. 2008. Identifikasi Salak Jantan dan Betina Menggunakan Morfologi dan Analisis Isoenzim. Tesis. Universitas Brawijaya.
- Farooq, S., N. Iqbal and A. A. Zaidi. 1991. Isozyme markers in cotton breeding-I. Standardization of different isozyme system for the identification of different cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum*). Pakistan Journal of Botany. 31 : 5-20.
- Fatimah, S. dan Sucipto. 2011. Hubungan Kekerbatan Sebelas Jenis Tanaman Salak (*Salacca zalacca* (Gertner) Voss) Bangkalan berdasarkan Analisis Isoenzim. Seminar Nasional Reformasi Pertanian Terintegrasi Menuju Kedaulatan Pangan. 1-13pp.
- Fowler, C. And P. Mooney. 1990. Shattering: Food, Politics, and The Loss of Genetic Diversity. University of Arizona Press, Tucson, AZ.
- Freytag, G.F. 1979. Xenian Effects on Pod Size Development in the Common Bean, *Heredity*. 70 (6): p. 444-446.
- Hadiati, S. 2003. Pendugaan jarak Genetik dan Hubungan Kekerbatan nanas berdasarkan Analisis Isoenzim. *J. Hort.* 13 (2): 87-94.
- Hadiati, S. Dan D. Sukmadjaja. 2002. Keragaman Pola Pita Aksesori Nenas Berdasarkan Analisis Isoenzim. *J. Bioteknologi Pertanian* 7 (2): 62-70.
- Hasfah, T. Hidayat, Kusdianti. 2014. Hubungan Kekerbatan Kultivar Talas (*Colocasia esculenta*) berdasarkan Karakter Morfologi Organ Vegetatif. *J. Bioslogis* 4 (1): 25pp.
- Hasnah, T.M. 2014. Keragaman Genetik Meranti (*Shorea leprosula* Miq.) Asal Kalimantan dengan Analisis Isoenzim. *Jurnal Penelitian Dipterokarpa* 1 (8) : 35-46.
- Hastuti, D., Suranto, P. Setyono. 2009. Variasi Morfologi, Karyotipe dan Pola Pita Protein pada Berbagai Varietas Kamboja Jepang (*Adenium obesum*). *Nusantara Bioscience* 1: 83pp.
- Hummer, K.E. And J.F. Hancock. 2015. Vavilovian Centers of Plant Diversity: Implications and Impacts. *Hort Science* 50 (6). 783pp.
- Julisaniah, N.I., L. Sulistyowati, A. N. Sugiharto. 2008. Analisis Kekerbatan Mentimun (*Cucumis sativus* L.) Menggunakan Metode RAPD-PCR dan Isoenzim. *Biodiversitas*. 9 (2): 102pp.
- Krismawati, A. 2012. Keunggulan dan Potensi Pengembangan Sumber Daya Genetik Durian Kalimantan Tengah. *J. Buletin Plasma Nurfa* 18 (2): 75pp.
- Lakitan, B. 2007. Dasar-dasar Fisiologi Tumbuhan. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. p. 91-103.
- Mansur, M. 2007. Penelitian Ekologi Jenis Durian (*Durio spp.*) di Desa Intuh Lingau, Kalimantan Tengah. *J. Tek. Ling.* 3 (8): 216 pp.
- Mayasari, I., Fitmawati., Minarni. 2014. Analisis Fenetik Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex A. Juss) Mull. Arg.) berdasarkan Penanda Isoenzim di Lima Kabupaten Sentra Perkebunan Karet Riau. 1-9pp

- Na'im. 2000. Aplikasi Isoenzim Sebagai Penanda Molekuler untuk Program Konservasi dan Pemuliaan Pohon. Lokakarya ITTO Yogyakarta.
- Nandariyah, E. Purwanto, Sukaya, S. Kurniadi. 2000. Pengaruh Tetua Jantan dalam Persilangan terhadap produksi dan Kandungan Kimiawi Buah Salak Pondoh Super. Zuriat 11: p. 33-38.
- Nugraheni, Y.M. M.A. 2006. Studi Variasi Genetik Tanaman Uji *Provenans Glirisida sepium* (Jacq.) steud di Wanagama I dengan Analisis Isoenzim. Skripsi S1 Fakultas Kehutanan UGM. Yogyakarta.
- Purwani, S. 2003. Xenia pada Biji Jagung. Tesis. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Purwanto, E., Sukaya and P. Merdekawati. 2002. Study on Germplasm Diversity of Pummelo at Magetan East Java based in Isozyme Markers. Agrosains 6 (2).
- Rahmawati, B., Suratno, E. Mahajoeno. 2010. Studi Variasi Morfologi dan Pola Pita Isoenzim pada Varietas Buah Naga (*Hylocereus sp.*). Seminar Nasional Pendidikan Biologi FKIP UNS. 40pp.
- Ranu, N. L. 2009. Program Pengembangan Durian. Direktorat Jenderal Hortikultura. Jakarta. p. 1-6.
- Rouf, A. 2007. Studi Keragaman Genetik Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*) di Jawa Tengah. Tesis S2 Program Pasca Sarjana UNS. Surakarta.
- Rukmana, R. 1996. Durian Budidaya dan Pasca Panen. Kanisius. Yogyakarta.
- Rusmiati. 2013. Eksplorasi, Inventarisasi dan Karakterisasi Durian Merah Banyuwangi. Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung. 29 pp.
- Salasa, K.A.N. Identifikasi Tanaman Durian (*Durio zibethinus* Murray) Mirip Durian Varietas Bido di Kecamatan Wonosalam Kabupaten Jombang dengan Metode Isoenzim dan Morfologi. Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Salasa, K.A.N., S. Ashari., N. Herlina. 2013. Identifikasi Tanaman Durian (*Durio zibethinus* Murray) Mirip Durian Varietas Bido di Kecamatan Wonosalam Kabupaten Jombang dengan Metode Isoenzim dan Morfologi. J. Prod. Tan. 5 (1): 427-433.
- Sari, I.A., Agung, W.S. 2011. Indikasi Pengaruh Xenia pada Tanaman Kakao (*Theobroma cacao L.*). Pelita Perkebunan 27 (3): p. 181-190.
- Setiadi. 2008. Bertanam Durian. Penebar Swadaya. Jakarta. p. 7-8.
- Sunaryo, W. 2015. Aplikasi DNA Barcoding untuk Analisis Keragaman Genetik Lai-Durian (*Durio zibethinus x kutejensis*) Asal Kalimantan Timur. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (6): p. 1273-1277.
- Suranto, F.T. Putri., A. Budiharjo. 2014. Studi Tentang Morfometrik dan Isoenzim pada *Arachis hypogaea L.* Terinfeksi Peanut Stripe Virus. J. El-Vivo 2 (1): 69pp.
- Suryo. 2005. Genetika Strata I. Universitas Gadjah Mada Press. Yogyakarta. p. 97-115.

- Syafitri, M. N.N. Wahibah, S. Fatonah. 2013. Keanekaragaman Genetik Ramin (*Gonystylus bancanus* Miq. Kurz) di Cagar Biosfer Giam Siak Kecil Bukit Batu Kabupaten Bengkalis Provinsi Berdasarkan Pola Pita Isoenzim. 10pp.
- Uji, T. 2005. Keanekaragaman Jenis dan Sumber Plasma Nutfah *Durio* (*Durio spp.*) di Indonesia. Buletin Plasma Nutfah 11 (1). 32pp.
- Warhamni, D. Boer, Muzini. 2013. Keragaman Morfologi Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) Asal Kabupaten Muna. J. Agrotekonos 3 (2): 126pp.
- Widiyanti, Suranto dan Sugiayarto. 2006. Keragaman padi (*Oriza sativa*) Varietas Rojolele berdasarkan Morfologi Biji dan Pola Pita Isoenzimnya. Puslitbang Bioteknologi dan Biodiversitas LPPM UNS. Surakarta.
- Wijayanto, T., D. Boer, L. Ente. 2013. Hubungan Kekerbatan Aksesori Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* Formatypica) di Kabupaten Muna berdasarkan Karakter Morfologi dan Penanda RAPD. J. Agroteknos 3 (3): 170pp.
- Wiryanta. 2008. Sukses Bertanam Durian. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Yuniastuti, E., S. Hartati., S.R. Widodo. 2010. Karakterisasi Morfologi Tanaman Durian Sukun (*Durio zibethinus* Murr.). Seminar Nasional Pendidikan Biologi FKIP UNS. 48pp.



## Lampiran 1

**Kelompok 1. Corak warna merah diduga persilangan *Durio zibethinus* putih x *Durio graveolens***

### 1. Red Blood / DB Maron



Rasa dominan manis legit, daging lembek

### 2. SI. Hotlady / Serat



Sangat produktif, rasa manis gurih pulen legit aroma harum kuat, buah kecil

### 3. Pink White / Si Gio Talun Jeruk1



Daging padat kering aroma kurang, daging tebal agak pahit manis

## 4. Talun Jeruk 2



Rasa sama dengan si Gio Talun Jeruk 1 hanya dagingnya lebih tebal dan biji kempes

### 5. Pink Cros White / si Serat Pink



Daging sangat tebal, empuk, gurih dan rasa manis yang sangat kuat, aroma cukup wangi, bagian kulit daging seperti ada ari yang agak tebal dan agak lembek berair, sangat enak. Bagian yang berserat adalah pada kulit ari daging buah

### 6. Sexy Pink / Musang Merah



Daging cukup manis, rasa gurih sangat kuat dan lengket di mulut, tekstur daging sangat kesat, pulen dan legit, 60% biji kempes, aroma sedang dan tidak terlalu kuat

### 7. Red Pink Cros Yellow / Minak Jinggo



Daging agak kering, aroma sedang berserat, rasa dominan manis pahit, buah cukup produktif, ukuran kecil

### 8. Red Glosy / si Mail Panggang



Rasa manis tidak pahit, daging tidak terlalu tebal

### 9. Red Pink / si Dubang Baru



Rasa lebih kuat gurih manis, daging lembek lengket

### 10. Red Pink / F1. Strain Dubang



Rasa sama dengan dubang hanya agak pahit setelah selesai makan, tampilan daging lebih tebal dan menarik

### 11. Red Pink Glosy / Lady Gaga



Rasa daging buah sangat manis sedikit pahit berserat panjang, aroma wangi dan pulen empuk setelah tiga hari rasa pahit makin kuat dan kadar alkohol tinggi

### 12. Red Pink Dove



Paling produktif buahnya, rasa manis asin pahit jadi satu, aroma wangi sangat kuat daging empuk agak tipis tidak berserat, kadar air sedang, berbunga dan berbuah tidak perlu pejantan lain

### 13. Pink Cros White Glosy / si Tretes



Buah dalam satu pohon banyak rasa, banyak tekstur warna, aroma sangat wangi, rasa dominan manis dan pahit terkadang sangat pahit, daging bisa

padat bahkan lembek, pohon induk tumbuh rapat dengan pohon lainnya

#### 14. Pink / si Pink Lembanyung Telemung



Warna merah muda sangat kuat, daging cukup tebal, biji banyak, berlapis rasa gurih asin lebih dominan dari rasa manis, aroma wangi tetapi tidak kuat, daging berserat tetapi tidak kasar lembut dan banyak berair

gurih tetapi daging empuk sedikit bertepung dan berserat, aroma tidak begitu kuat daging tidak berair

#### 16. Pink Soul



Rasa sangat manis gurih asin ada sedikit pahit di sekitar biji, daging cukup tebal

#### 15. Red Pink / si Rose



Pohon sangat produktif, rasa buah paling manis tidak pahit dan tidak

#### 17. Pink Dove



Rasa manis agak kering aroma lembut tidak berserat, daging sedang tidak terlalu tebal

## Lampiran 2

### Kelompok 2. Corak warna pelangi diduga Silangan *Durio zibethinus* kuning x *Durio graveolens*

#### 1. Sunrise of Java



Rasa manis daging tebal biji multi dan sangat eksklusif degradasi warnanya

#### 4. Red Horn / si Prabon



Rasa manis lengket di lidah, pahit yang cukup dan pulen

#### 2. Red King / Pesaing Monthong Merah



Sangat manis daging tebal ukuran buah bisa mencapai 5 kg, kulit tebal tahan 2 minggu

#### 5. Red Pink Yellow / si Jamella



Rasa manis pulen legit dan daging kering

#### 3. Red Rainbow / si Pelangi Banyuwangi



Rasa manis legit daging cukup lumayan ada aroma pandan

#### 6. Petank / Red Heart

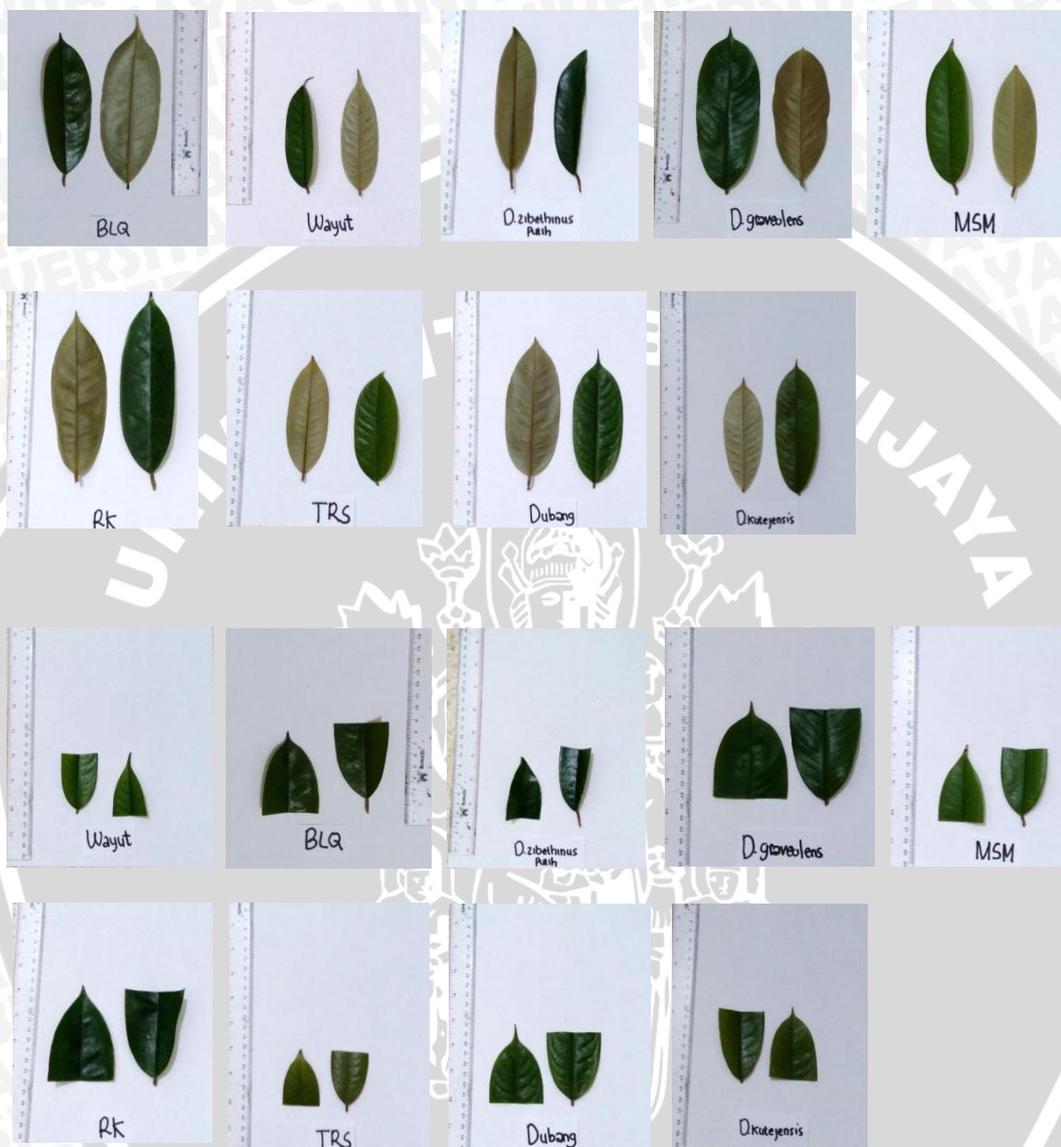


Rasa yang sangat menarik manis gurih legit dan sedikit pahit serta kulitnya tebal

(Rusmiati *et al.*, 2013)

### Lampiran 3

#### Lampiran Morfologi Daun



**Lampiran 4**

**1. Alat dan bahan yang digunakan saat ekstraksi daun durian**



Gunting dan pinset untuk memotong dan memasukkan bahan



Timbangan elektrik untuk menimbang bahan



Aluminium foil sebagai wadah bahan



Daun yang digunakan sebagai bahan isoenzim yang dilapisi *tissue* basah

**2. Sterilisasi alat sebelum isoenzim**



Botol yang digunakan untuk meletakkan larutan



Autoclave yang digunakan untuk sterilisasi botol



Alat dan botol isoenzim dimasukkan ke dalam oven

**Lampiran 5****Alur Kerja Analisis Isoenzim****Pengambilan sampel**

Mengambil sampel daun dari 10 jenis durian merah Banyuwangi dan dugaan tetuanya

Sampel daun di cuci dengan aquades

Masing-masing sampel daun durian di bungkus dengan *tissue* yang telah dibasahi dan dibungkus dengan plastik yang telah diberi label

Sampel daun disimpan ke dalam *ice box*

**Ekstraksi enzim daun durian**

Sampel daun durian 0,15 gr ditambahkan nitrogen cair

Digerus dengan mortar steril hingga menjadi bubuk

Ditambahkan buffer ekstrak 0,8 ml

Dimasukkan ke dalam tube ukuran 1,5 ml

Di inkubasi 24 jam

Disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit

Supernatan

Ditambahkan buffer ekstrak 20 ml

Ekstraksi enzim daun durian

## Elektroforesis

Pembuatan separating gel 7%



Pembuatan stacking gel 5% dan pemasangan sisir elektroforesis



Pemasangan set elektroforesis



Penambahan running buffer



Masukkan sampel ke dalam sumuran



Loading sampel



Running dengan tegangan listrik 200 volt selama 1-2 jam



Staining esterase dan peroksidase



Destaining



Dokumentasi



Zimogram

**Lampiran 6**  
**Skema Proses Elektroforesis**



Ekstraksi daun durian di simpan pada tube 1,5 ml, diluar tube diberi potongan es untuk menjaga ekstraksi daun durian tetap dalam kondisi dingin



Plate yang digunakan untuk mencetak gel



Setelah gel dimasukkan, set elektroforesis di pasang dan dinyalakan



Peletakkan gel pada plate menggunakan mikro pipet yang telah terpasang pada flow migration chamber

## Lampiran 7

### Pembuatan Larutan Isoenzim

#### 1. Buffer ekstrak

Larutan	Bahan	Jumlah
Buffer ekstrak	0,01 M EDTA (Asam Etilen Diamin Tetraasetat)	1 ml dari stock 0,5 M
	0,1 M KCl	3,725 gr ditambah aquades hingga 50 ml
	0,1 M MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5 ml dari stock 1 M
	2,5 % PVP	1,25 gr dalam 20 ml aquades
	0,2 % BSA	0,1 gr
	0,1 M-tris pH 7,5	2,5 ml dari stock 2 M
	0,1 % β-mercaptoetanol	0,05 ml

#### Cara pembuatan :

Melarutkan EDTA 0,01 M, 0,1 M KCl, 0,1 M MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 2,5 % PVP, 0,2 % BSA, 0,1 M-tris pH 7,5, dan 0,1 % β-mercaptoetanol dengan aquades sampai 50 ml. Kemudian dihomogenkan menggunakan stirer.

#### 2. RSB (Reducing Sample Buffer) dan Running Buffer pH 8,3

Larutan	Bahan	Jumlah
RSB	1 M Tris-Cl pH 6,8	0,03 ml
	Gliserol 50%	0,25 ml
	2-mercaptoetanol	0,025 ml
	Bromophenol blue	0,005 gr
	Aquades hingga	0,5 ml
Running buffer	Tris-base	0,75 gr
	Glisin	1,8 gr
	Aquades	Hingga 1 liter

#### Cara pembuatan :

##### a. RSB (Reducing Sample Buffer)

Melarutkan 1 M Tris-Cl pH 6,8, Gliserol 50%, 2-mercaptoetanol, dan Bromophenol blue ke dalam tube berukuran 1,5 ml yang telah dibungkus aluminium foil pada bagian luarnya. Kemudian campurkan aquades menggunakan mikro pipet agar tercampur.

##### b. Running Buffer (Buffer Elektrolit)

Melarutkan Tris-base dan Glisin dengan aquades hingga volume 1L.

### 3. Separating Gel 7% dan Stacking Gel 5%

Bahan	Komposisi	Jumlah
Separating gel 7%	Aquades	6 ml
	Akrilamid	2,84 ml
	1 M tris pH 8,8	3 ml
	APS 10%	0,06 ml
	TEMED	0,006 ml
Stacking gel 5 %	Aquades	3,6 ml
	Akrilamid	0,84 ml
	1 M tris pH 6,8	1,5 ml
	APS 10 %	0,06 ml
	TEMED	0,006 ml

#### Cara pembuatan :

##### a. Separating gel 7%

Mencampurkan aquades, Akrilamid, 1 M tris pH 8,8, dan APS 10%, homogenkan. Tambahkan TEMED dan homogenkan lagi, kemudian tuang larutan separating gel 7% ke dalam plate pada bagian bawah hingga mencapai garis batasnya. Tambahkan aquades pada bagian permukaan atas gel dan diamkan hingga membentuk gel.

##### b. Stacking gel 5%

Mencampurkan aquades, akrilamid, 1 M tris pH 6,8, dan APS 10% kemudian dihomogenkan menggunakan mikro pipet. Selanjutnya ditambahkan TEMED dan dihomogenkan lagi. Dituangkan ke dalam plate pada bagian atas setelah separating gel memadat menggunakan mikro pipet.

### 4. Pewarna Esterase dan Peroksidase

Pewarna	Komposisi	Jumlah
Esterase	100 mM-phosphate pH 6	50 ml
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	43,85 ml
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,15 ml
	α- naphthyl acetate	0,025 gr
	β- naphthyl acetate	0,025 gr
	Fast blue RR salt	0,05 gr
Peroxidase	50 mM Na-acetate buffer pH 5,0	50 ml
	CaCl <sub>2</sub>	0,05 gr
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 %	0,25 ml
	3-amino-9-ethlearbazole	0,025 gr
	DMF (N,N-Dimethylformamide)	2 ml

**Cara pembuatan :**

## a. Pewarna Esterase

Melarutkan masing-masing  $\alpha$ - naphthyl acetate,  $\beta$ - naphthyl acetate, dan Fast blue RR salt dalam 0,25 ml aseton dingin. Kemudian masukkan ke dalam tube berukuran 1,5 ml yang telah dilapisi aluminium foil pada bagian luarnya dan di vortex. Tambahkan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  kemudian vortex lagi. Masukkan larutan tersebut ke dalam gelar ukur dan homogenkan dengan stirer.

## b. Pewarna Peroksidase

Melarutkan 3-amino-9-ethlearbazole dan DMF menggunakan mikro pipet. Tambahkan  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  3 % dan Na-acetate buffer pH 5,0, kemudian campurkan lagi menggunakan mikro pipet. Homogenkan larutan dengan stirer.



## Lampiran 8

Tabel 6. Data Skoring Hasil Analisa Pita Isoenzim dengan Enzim Esterase

Jenis durian	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Data Zimogram	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0

Keterangan : 1 = ada pita, 0 = tidak ada pita, A = *D. graveolens*, B = *D. kutejensis*, C = *D. zibethinus* kuning, D = *D. zibethinus* putih, E = Dubang, F = Wayut, G = Musang Merah, H = Tretes, I = Red King, J = Balqis

Tabel 7. Data Skoring Hasil Analisa Pita Isoenzim dengan Enzim Peroksidase

Jenis durian	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Data Zimogram	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan : 1 = ada pita, 0 = tidak ada pita, A = *D. graveolens*, B = *D. kutejensis*, C = *D. zibethinus* kuning, D = *D. zibethinus* putih, E = Dubang, F = Wayut, G = Musang Merah, H = Tretes, I = Red King, J = Balqis

Tabel 8. Data Skoring Hasil Analisa Morfologi Kuantitatif Daun

Jenis Durian	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
U1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
U2	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
P1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
H2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
W1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
W2	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
W3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
W4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0