



**IDENTIFIKASI DUPLIKASI AKSESI DURIAN LOKAL
MENGUNAKAN
PENANDA *INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT***

Skripsi

disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

Program Studi Biologi

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

oleh
Ronawati
4411412033

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG**

2017

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya menyatakan bahwa skripsi ini bebas plagiat, dan apabila di kemudian hari terbukti terdapat plagiat dalam skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan perundang-undangan.

Semarang, 17 Februari 2017



Ronawati
4411412033

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul

Identifikasi Duplikasi Aksesori Durian Lokal Menggunakan Penanda *Inter Simple Sequence Repeat*

disusun oleh

Ronawati

4411412033

telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang pada tanggal 24 Februari 2017.

Panitia Ujian



Dr. Zennuri, S.E., M.Si., Akt.
NIP. 19641223 198803 1001

Sekretaris

Dra. Endah Peniati, M.Si.
NIP. 19651116 199103 2001

Penguji Utama

Dr. drh. R. Susanti, M.P.

NIP. 19690323 199703 2001

Anggota Penguji/
Pembimbing I

Prof. Dr. Ir. Amin Retnoningsih, M.Si.
NIP. 19600712 199003 2001

Anggota Penguji/
Pembimbing II

Dr. Enni Suwarsi Rahayu, M.Si.
NIP. 19600916 198601 2001

MOTTO

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan

(QS. Al Insyirah: 6)

Tidak ada usaha yang sia-sia, ujian dan cobaan yang diberikan Allah membuat kita lebih banyak berpikir, menuntut kita supaya lebih banyak belajar mencari sesuatu yang belum kita mengerti

(Prof. Dr. Ir. Amin Retnoningsih, M.Si.)

Tawadhu'lah kalian terhadap orang yang mengajari kalian

(HR. Imam Al-baihaqi)

The logo of Universitas Negeri Semarang (UNNES) is a large, stylized yellow emblem with a central white circle and a red flame-like shape at the top. Below the emblem, the text "UNNES" is written in large, bold, blue capital letters, and "UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG" is written in smaller, blue capital letters below it.

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

PERSEMBAHAN

Untuk Ibu, Ayah, Dosen-dosen,

Adik, Teman-teman

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat, taufiq serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Identifikasi Duplikasi Aksesori Durian Lokal Menggunakan Penanda *Inter Simple Sequence Repeat*”.

Dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, kerjasama dan sumbangan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang bertanggung jawab terhadap penyelenggaraan pendidikan di Universitas Negeri Semarang.
2. Dekan FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan ijin penelitian.
3. Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan pengarahan, saran dan bimbingan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
4. Prof. Dr. Ir. Amin Retnoningsih, M.Si. dan Dr. Enni Suwarsi Rahayu M.Si. selaku dosen pembimbing yang dengan sabar telah memberikan bimbingan, pengarahan, masukan, kemudahan dan motivasi kepada penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik
5. Dr. drh. R. Susanti, M.P. selaku penguji yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam pengujian skripsi.

6. Dr. Ning Setiati, M.Si. selaku Kepala Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan ijin penelitian dan senantiasa memberikan dukungannya.
7. Teknisi Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang yang senantiasa memberikan dukungannya.
8. Keluargaku tercinta, Rohyadi Ruslim (Bapak), Witri (Ibu) dan Sunarti (Adik) yang selalu memberikan doa, dukungan, motivasi, nasehat, semangat bagi penulis.
9. Teman dekatku Mohamad Irfan B. yang selalu memberikan dukungan, motivasi bagi penulis untuk tidak patah semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.
10. Sahabat-sahabat satu bimbingan Silvi, Ahmad, Mba Tuti, Mba Novita yang telah memberikan bantuan, dukungan dan motivasi bagi penulis.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, baik yang secara langsung maupun tidak yang telah membantu penyusunan skripsi.

Penulis menyadari bahwa dalam menyusun skripsi masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu penyusun memohon pada semua pihak untuk memberikan saran dan kritik yang sekiranya membangun demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya, dengan segala kerendahan hati penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca demi kebaikan di masa yang akan datang.

Semarang, 17 Februari 2017

Penulis

ABSTRAK

Ronawati. 2016. Identifikasi Duplikasi Aksesori Durian Lokal Menggunakan Penanda *Inter Simple Sequence Repeat*. Skripsi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Pembimbing Utama Prof. Dr. Ir. Amin Retnoningsih, M.Si. dan Pembimbing Pendamping Dr. Enni Suwarsi Rahayu, M.Si.

Katakunci: Duplikasi, Durian, Identifikasi, ISSR

Durian merupakan salah satu komoditas buah-buahan yang mempunyai nilai ekonomi cukup penting di pasar perdagangan dan menjadi komoditas unggulan. Indonesia seperti Kalimantan menjadi pusat keanekaragaman durian Indonesia. *Agrocenter Hortimart* yang berlokasi di Bawen, Kabupaten Semarang memiliki koleksi durian sebanyak 105 aksesori dan belum diidentifikasi secara molekuler. Oleh karena itu perlu identifikasi aksesori durian berdasarkan penanda *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). Selain menganalisis identitas setiap aksesori durian di Hortimart Bawen, penelitian ini juga mengidentifikasi adanya duplikasi aksesori.

Isolasi DNA genom menggunakan metode CTAB mengikuti prosedur Doyle & Doyle yang sudah sedikit dimodifikasi. Hasil isolasi DNA dimurnikan menggunakan *RNase*. Proses PCR dilakukan dengan 35 siklus, diawali predenaturasi pada 94 °C selama 4 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik. Suhu penempelan primer PKBT 7, ISSR 808, ISSR 1 dan ISSR 4 berturut-turut adalah 54 °C, 54 °C, 49,5 °C dan 50 °C selama 30 detik. Suhu pemanjangan sebesar 72 °C selama 1 menit, perpanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit dan pendinginan pada suhu 15 °C selama 10 menit. Produk ISSR dipisahkan menggunakan agarosa 2%, elektroforesis pada 500 mA 100 V selama 30 menit dalam 0,5X bufer TBE. Hasil pita DNA dianalisis menggunakan NTSYSpc versi 2.0 untuk mendapatkan dendrogram.

Hasil analisis berdasarkan pita ISSR pada koefisien kemiripan 0,70 memisahkan 41 genotipe durian menjadi dua kelompok besar yaitu kelompok A dan kelompok B. Sebagian besar genotipe dikelompokkan ke dalam kelompok B, sedangkan kelompok A hanya beberapa genotipe saja yakni Jagal Bilowo, Ajimah, Suryo dan Pasopati. Kelompok A terdiri atas dua subkelompok pada koefisien kemiripan 0,718 yakni kelompok A 1 dan kelompok A 2. Sebagian besar mengelompok pada kelompok A 1, hanya genotipe Ponconoko yang memisah dengan yang lain. Kelompok B pada koefisien kemiripan 0,75 terdiri atas dua subkelompok yakni kelompok B 1 dan B 2. Sebagian besar genotipe mengelompok pada kelompok B 1, kelompok B 2 hanya terdiri atas genotipe Ngalengko. Hasil analisis dendrogram menunjukkan bahwa terdapat duplikasi antara genotipe Arjuno dan Jangkarbumi pada koefisien kemiripan 1,00 yang ditunjukkan oleh 4 primer.

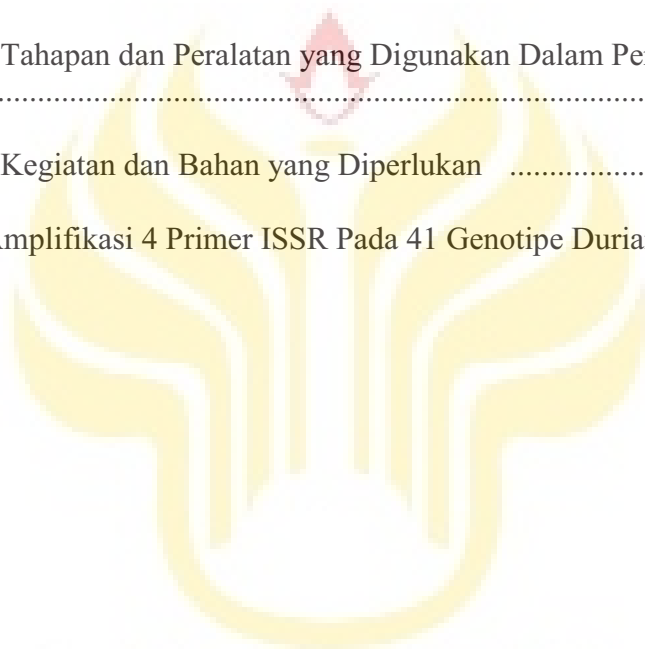
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB	
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	5
1.3 Penegasan Istilah	5
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Keanekaragaman Durian di Indonesia	8
2.2 Identifikasi Duplikasi Aksesori Durian	9

2.3 Keunggulan Penanda ISSR dalam Mengungkap Identitas Duplikasi	11
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	14
3.2 Subjek Penelitian	14
3.3 Variabel yang Diamati	15
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	16
3.5 Prosedur Penelitian	16
3.6 Data dan Metode Pengumpulan Data	20
3.7 Metode Analisis Data	20
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil	22
4.2 Pembahasan	31
5. SIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Simpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Daftar Aksesori Durian Lokal Koleksi <i>Ex Situ</i> Hortimart Bawen	15
3.2 Primer dan Sekuensnya, Suhu <i>Annealing</i> , Nilai <i>Temperature Melting</i> (TM) serta <i>Product Size</i>	15
3.3 Uraian Tahapan dan Peralatan yang Digunakan Dalam Penelitian	16
3.4 Uraian Kegiatan dan Bahan yang Diperlukan	16
4.1 Hasil Amplifikasi 4 Primer ISSR Pada 41 Genotipe Durian	28



UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1 Daun-Daun Durian (Sampel) Pada Ujung Ranting	14
3.2 Skema Tahapan Penelitian	17
4.1 Elektroforegram Pita DNA Genom Durian	22
4.2 Pola Pita Hasil Amplifikasi 41 Genotipe Durian Oleh 4 Primer ISSR	26
4.3 Dendrogram Hasil Analisis 41 Genotipe Durian Koleksi <i>Ex Situ</i> Hortimart Bawen Berdasarkan 4 Primer ISSR	29
4.4 Rangkuman Hasil Analisis Dendrogram 41 Genotipe Durian Berdasarkan 4 Primer ISSR	31
4.5 Perbedaan Karakter Morfologi Antara Aksesori Durian Arjuno dan Jangkarbumi	40
4.6 Analisis Morfologi 41 Aksesori Durian Lokal Koleksi <i>Ex Situ</i> Hortimart Bawen	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Daftar Komposisi Bahan Penelitian	50
2 Peralatan Penelitian	51
3 Dokumentasi Penelitian	52
4 Analisis Data Skoring Keberadaan Alel Pada 41 Genotipe Durian Menggunakan Program NTSYSpc	56
5 Matriks Kesamaan Genetika 41 Genotipe Durian	57
6 Profil Pita DNA 41 Genotipe Durian Hasil Amplifikasi 4 Primer ISSR	59
7 Informasi Ukuran Marker 50 bp	62
8 Daftar Nama Aksesori Durian yang Diteliti	63



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Durian merupakan salah satu komoditas buah-buahan yang mempunyai nilai ekonomi cukup penting di pasar perdagangan dan menjadi komoditas unggulan. Setiap tahun pemasaran durian di Indonesia selalu meningkat, hal ini menandakan bahwa durian makin digemari oleh masyarakat. Peluang pasar durian di Indonesia sangat menjanjikan, karena permintaan masyarakat terhadap buah durian ini sangat tinggi. Konsumsi durian pada tahun 2002 hingga 2013 rata-rata sebesar 1,18 kg/kapita/tahun, mengalami peningkatan rata-rata sebesar 28,89% per tahun (BPS, 2013). Sementara itu volum impor durian sangat besar dibandingkan volum ekspor. Setiap tahun volum ekspor durian terjadi penurunan sebesar 13,47% dari volum total (PDSIP, 2014).

Indonesia lebih banyak mengimpor durian luar negeri. Tahun 2013, impor durian dari Thailand sebesar 4.734 ton atau 96,99% dari total volum impor durian Indonesia. Impor dari Malaysia sebesar 66 ton atau 1,34% dan dari Vietnam sebesar 81 ton atau 1,67% (PDSIP, 2014). Kalimantan memiliki berbagai macam kultivar durian dengan warna, tekstur, rasa dan aroma yang beranekaragam pula, sehingga berbagai selera konsumen dapat terpenuhi. Kekayaan keanekaragaman tersebut belum dimanfaatkan secara optimal (Uji, 2005).

Pemanfaatan yang kurang optimal tersebut antara lain karena Indonesia sampai sekarang belum memiliki kebun durian yang luas. Durian Indonesia tidak dikedirikan secara massal, hanya sebagai tanaman di pekarangan maupun kebun dalam skala yang kecil. Hal ini menyebabkan variabilitas produksi tinggi namun produktivitasnya rendah, sehingga belum mencukupi permintaan konsumen baik dari dalam maupun luar negeri (Mukminatn & Harisudin, 2012). Langkah awal untuk menyelesaikan masalah tersebut adalah dengan identifikasi aksesori durian Indonesia. Identitas aksesori tersebut diharapkan dapat membantu dalam penentuan aksesori/kultivar yang unggul. Aksesori yang unggul secara genotipe tersebut dapat dikedirikan, sehingga impian memiliki perkebunan durian seperti negara-negara tetangga dapat terwujud.

Identifikasi duplikasi dapat dilakukan melalui penanda morfologi, isozim maupun molekuler. Identifikasi secara morfologi tidak membutuhkan teknologi yang mahal seperti molekuler. Kelemahan dari penanda ini yakni tidak dapat dijadikan acuan karena selalu berubah-ubah dipengaruhi oleh lingkungan (Mondini *et al.*, 2009). Penanda isozim adalah penanda yang cepat untuk analisis dan hanya membutuhkan sedikit bahan biologi (Mondini *et al.*, 2009). Kelemahan penanda ini adalah jumlahnya sedikit, sehingga kurang efisien jika digunakan dalam identifikasi duplikasi genotipe dalam suatu koleksi plasma nutfah (Pandini, 2010). Penanda isozim dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Misalnya, profil yang diperoleh dari suatu penanda isozim tertentu dapat berubah bergantung pada tipe dan umur jaringan yang digunakan untuk identifikasi (Kumar *et al.*, 2009). Identifikasi secara molekuler memiliki keuntungan yakni bersifat stabil dan

tidak dipengaruhi faktor lingkungan. Selain itu sampel yang dideteksi dapat dari semua jaringan dan pada fase pertumbuhan manapun (Mondini *et al.*, 2009; Govindaraj *et al.*, 2014). Kelemahan dari penanda ini memerlukan biaya yang tinggi (Mondini *et al.*, 2009).

Ada beberapa penanda molekuler yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi varietas/kultivar, setiap penanda tersebut memiliki kelebihan dan kelemahan. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) adalah penanda untuk identifikasi organisme berdasarkan analisis pola potongan DNA. Kelemahan penanda ini memerlukan DNA yang cukup banyak untuk setiap kali *digesti*. RFLP dapat diterapkan dalam studi keanekaragaman dan filogenetika dari individu dalam populasi maupun spesies. Penanda *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) cepat dan mudah untuk analisis, memerlukan sedikit DNA yakni umumnya antara 5 sampai 50 ng per reaksi. RAPD memiliki kelimpahan genom yang acak dan sangat tinggi yang didistribusikan ke seluruh genom, namun demikian penanda ini memiliki kelemahan. Salah satu kelemahannya adalah rendahnya nilai kestabilan amplifikasi alel (*low reproducibility*) (Kumar *et al.*, 2009). Aplikasi penanda RAPD telah banyak digunakan, salah satunya untuk membedakan antara subspecies *Mugo* dan *Uncinata* (Monteleone *et al.*, 2006).

Identifikasi dan klasifikasi durian di Thailand menggunakan *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) telah dilakukan oleh Sukhotu *et al.* (2008). Beberapa aksesori menunjukkan duplikasi (sinonim) satu sama lain. Penanda AFLP memiliki reproduktivitas yang cukup, aplikasinya luas dan

kelimpahan genomnya tinggi. Kelemahan utamanya, penanda AFLP merupakan penanda yang dominan (Kumar *et al.*, 2009). Penanda AFLP telah berhasil digunakan untuk menganalisis keanekaragaman genetika di beberapa tanaman spesies lain seperti kacang (Herselman, 2003) dan kedelai (Ude *et al.*, 2003).

Penanda *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) adalah daerah di DNA yang panjangnya sangat bervariasi dalam suatu spesies yang sama (Salimath *et al.*, 1995). Penanda ISSR memiliki sifat semi acak yang diamplifikasi oleh PCR dengan adanya satu primer yang komplementer terhadap suatu target mikrosatelit. Penanda ini dikembangkan dari daerah di antara lokus mikrosatelit atau yang disebut juga *Simple Sequence Repeat* (SSR). Amplifikasi daerah tersebut tidak membutuhkan informasi sekuens genom dan menghasilkan pola multilokus dan sangat polimorfik (Nagaoka & Ogihara, 1997). Setiap pita mewakili sekuens DNA yang dibatasi oleh dua mikrosatelit yang berbeda.

Penanda ISSR sangat polimorfik bahkan untuk spesies yang berkerabat dekat (mampu mendeteksi variasi genetika pada level sangat rendah). Penanda ini memerlukan DNA dalam jumlah kecil, bersifat universal, kodominan, mudah dalam penggunaan, tingkat keberhasilan tinggi dan tidak perlu lebih dahulu mengetahui susunan basa (*sequence*) dari genom tanaman (Wahyuni *et al.*, 2004). Penanda ISSR lebih sensitif dibandingkan penanda molekuler lain dalam mendeteksi keanekaragaman genetika di tingkat bawah jenis dan relatif mudah dan ekonomis (Bradford, 2008). Penanda ISSR sudah digunakan untuk analisis keanekaragaman beberapa genotipe durian oleh Syahrudin (2012). Sebagian

besar jumlah pita menunjukkan polimorfisme, namun demikian beberapa menunjukkan duplikasi.

1.2 Permasalahan

Permasalahan yang akan dikaji dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Bagaimana identitas molekuler setiap aksesori durian lokal menggunakan penanda ISSR?
2. Apakah terdapat duplikasi aksesori durian lokal, diidentifikasi menggunakan penanda ISSR?

1.3 Penegasan Istilah

Penegasan istilah dalam penelitian ini sebagai berikut.

1.3.1 Aksesori

Aksesori adalah tanaman-tanaman yang didapat dari area tertentu.

Aksesori pada penelitian ini adalah kultivar-kultivar tanaman durian yang diambil dari Hortimart, Bawen, Jawa Tengah.

1.3.2 Duplikasi Aksesori

Duplikasi aksesori adalah aksesori-aksesori tanaman yang secara genetika sama. Aksesori-aksesori tersebut mungkin secara genetika memang sangat dekat satu dengan yang lainnya, walaupun dikoleksi dari lokasi yang berjauhan (Tasma 2013). Duplikasi aksesori pada penelitian ini hanya diidentifikasi berdasarkan penanda ISSR.

1.3.3 Penanda ISSR

Penanda ISSR dikembangkan dari daerah di antara lokus mikrosatelit atau yang disebut juga SSR (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Penanda ISSR yang digunakan pada penelitian ini empat lokus dengan 4 primer tunggal yakni PKBT 7, ISSR 808, ISSR 1 dan ISSR 4.

1.3.4 Identitas

Identitas atau jatidiri dapat diartikan sebagai ciri-ciri yang melekat pada diri seseorang atau sebuah benda. Identitas yang diteliti pada penelitian ini adalah ciri-ciri genotipe setiap aksesori pada analisis pengelompokan berdasarkan ISSR.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini sebagai berikut.

1. Menganalisis identitas molekuler aksesori durian lokal menggunakan penanda ISSR.
2. Mengidentifikasi adanya duplikasi aksesori durian lokal menggunakan penanda ISSR.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi identitas molekuler setiap aksesori durian lokal melalui koefisien kemiripan dan analisis pengelompokan. Identitas tersebut diharapkan dapat membantu dalam penentuan

aksesi/kultivar durian yang unggul yang nantinya sebagai acuan dalam dasar pemuliaan tanaman durian.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Keanekaragaman Durian di Indonesia

Durian (*Durio zibethinus*) merupakan salah satu kekayaan plasma nutfah Indonesia. Durian Indonesia sangat beraneka ragam baik dalam rasa, aroma dan warna daging buahnya, ditemukan pula buah durian tanpa biji (Uji, 2005). Sekitar 30 spesies durian terdapat di dunia (Kimman, 2002). Indonesia sendiri, diperkirakan terdapat 27 spesies durian (Astaman, 2007), 14 spesies durian endemik di Borneo dan 5 spesies di Kalimantan Timur (Kimman, 2002). Sebagian besar masih tumbuh liar di hutan.

Durian merupakan salah satu anggota genus *Durio*. Durian yang dapat dimakan terdapat sembilan jenis, yakni *D. zibethinus*, *D. kutejensis* (lai), *D. excelsus* (apun), *D. graveolens* (tuwala), *D. dulcis* (lahong), *D. grandiflorus* (sukang), *D. testudinarum* (sekura), *D. lowianus* (teruntung) dan *D. oxleyanus* (kerantungan). Satu dari sembilan jenis durian tersebut yang paling banyak dibudidayakan adalah *D. zibethinus* (Uji, 2005). Menurut *United States Department of Agriculture* (2008) kedudukan taksonomi durian sebagai berikut.

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malvales
Famili	: Bombaceae
Genus	: <i>Durio</i>
Spesies	: <i>Durio zibethinus</i> Murr.

2.2 Identifikasi Duplikasi Aksesori Durian

Penanda genetica dapat dibedakan menjadi tiga yakni (1) penanda morfologi, (2) isozim dan (3) molekuler. Penanda morfologi tidak membutuhkan teknologi yang mahal seperti molekuler. Penanda ini tidak dapat dijadikan acuan karena selalu berubah-ubah dan sangat dipengaruhi oleh lingkungan serta interaksi antara genetika dan lingkungan. Penanda isozim adalah penanda yang cepat untuk analisis dan hanya membutuhkan sedikit bahan biologi. Kelemahan dari penanda ini adalah enzim yang dapat digunakan jumlahnya terbatas (Mondini *et al.*, 2009), polimorfisme terbatas, mahal karena setiap sistemnya unik, harus tahu lokasi jaringan yang diambil (Kumar *et al.*, 2009).

Penanda molekuler dapat mengidentifikasi duplikasi karena penanda molekuler tidak terpengaruh oleh lingkungan (Moura *et al.*, 2013) dan bersifat stabil. Sampel yang dideteksi dapat dari semua jaringan dan pada fase pertumbuhan manapun (Mondini *et al.*, 2009; Govindaraj *et al.*, 2014). Kelemahan dari penanda ini memerlukan biaya yang tinggi, penanda yang berbeda memiliki kualitas analisis genetika yang berbeda (Mondini *et al.*, 2009).

Penanda ISSR adalah penanda molekuler di DNA yang panjangnya sangat bervariasi dalam suatu spesies yang sama (Salimath *et al.*, 1995). Penanda ini dikembangkan dari daerah di antara lokus mikrosatelit atau yang disebut juga SSR. Kelebihan penanda ini antara lain tidak membutuhkan informasi sekuens genom, menghasilkan pola multilokus serta sangat polimorfik (Nagaoka & Ogihara, 1997).

Setiap pita mewakili sekuens DNA yang dibatasi oleh dua mikrosatelit yang berbeda. Penanda ISSR lebih sensitif dalam mendeteksi keanekaragaman genetika di tingkat bawah jenis dan relatif mudah dan ekonomis (Bradford, 2008). Kelemahan penanda antara lain bersifat dominan, dibutuhkan DNA yang murni dan konsentrasi yang sama antar aksesori untuk standarisasi reaksi, optimasi reaksi awal diperlukan, estimasi keanekaragaman genetika didasarkan pada sifat dialelik (Kumar *et al.*, 2009).

Identifikasi molekuler durian menggunakan masing-masing penanda molekuler tersebut sudah dilakukan. Penanda RFLP untuk identifikasi durian telah dilakukan oleh Hikmah (2013). Amplifikasi 11 aksesori durian menggunakan primer ITS 1-4 kemudian *digesti* dengan enam enzim restriksi *Alu1*, *Bsp1431*, *BsuR1*, *Eco471*, *Ade1* dan *Mph11301*. Dendrogram hasil analisis mengidentifikasi adanya duplikasi pada tiga aksesori durian.

Identifikasi molekuler durian menggunakan penanda RAPD juga telah dilakukan. Penanda RAPD dapat mengidentifikasi genotipe antar 14 kultivar durian di provinsi Nonthaburi Thailand. Hasil analisis sembilan primer menunjukkan tidak terdapat duplikasi antar aksesori durian (Vanijajiva, 2011). Identifikasi menggunakan AFLP pada durian telah dilakukan Sukhotu *et al.* (2008). Delapan pasangan primer mengidentifikasi adanya duplikasi antar aksesori durian.

Penanda ISSR sudah digunakan untuk analisis keanekaragaman beberapa genotipe durian oleh Syahrudin (2012). Sebagian besar jumlah pita menunjukkan polimorfisme. Analisis dendrogram menunjukkan adanya duplikasi aksesori durian

Pingku dengan Pasir Jati, Kendil dengan Sunan, Kuning Garing dengan Sikoclak, Aseupan dengan Kim, dan Bulan dengan Tanjung Mabah.

2.3 Keunggulan Penanda ISSR dalam Mengungkap Identitas Duplikasi

Penanda molekuler ISSR merupakan salah satu penanda dengan motif sekuen berulang. Ada kalanya terdapat penambahan sekuen nukleotida pada ujung 3' maupun ujung 5', sebagai contoh (CA)₈RG dan (CA)₈RY. Penanda ISSR berukuran antara 100-3000 *basepair* (bp) berlokasi di antara wilayah mikrosatelit (SSR). Wilayah amplifikasi yaitu pada inter-SSR, bagian yang diapit oleh sekuen berulang (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Penanda ISSR berkembang lebih akhir dibanding penanda RAPD dan RFLP. Penanda tersebut memiliki *reproducibility* yang tinggi dibandingkan penanda RAPD. Primer yang lebih panjang (16-25 mers) bila dibanding dengan RAPD (10 mers), memungkinkan menggunakan suhu *annealing* yang tinggi. Suhu *annealing* bergantung juga pada kandungan GC, semakin tinggi kandungan GC maka semakin tahan terhadap suhu tinggi. Produk amplifikasi primer ini berukuran 200-2000 bp dan dapat dideteksi menggunakan agaros maupun elektroforesis gel poliakrilamid (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Keuntungan menggunakan penanda ISSR antara lain yakni lebih cepat dan memerlukan jumlah DNA yang sedikit (5-50 ng) per reaksi (Nalini *et al.*, 2003). Penanda ini mampu melakukan pendeteksian genetika polimorfisme tanpa perlu lebih dahulu mengetahui susunan basa (sekuens) dari genomik tumbuhan diantara

susunan basa yang berulang. Syaratnya jika susunan basa berulang tersebut sudah mewakili secara luas dan menyebar di seluruh genom (Wahyuni *et al.*, 2004) serta memiliki polimorfisme yang tinggi (Manimekalai *et al.*, 2003).

Penanda ISSR sudah banyak digunakan untuk mengidentifikasi spesies, kultivar ataupun populasi suatu spesies yang mirip dengan level variasi genetika yang rendah, dan sangat berguna sebagai alat pendeteksi keanekaragaman genetika suatu spesies tanaman yang mempunyai variasi genetika yang sangat luas. Penggunaan penanda ISSR telah berhasil mengidentifikasi keanekaragaman dan duplikasi 14 aksesori yang dikoleksi dari Provinsi Nonthaburi. Hasil analisis dendrogram menunjukkan duplikasi antara aksesori *Kop Chainam* dengan *Kop Takum*, *Kop Saonoi* dengan *Kop Maethao*, *Thongyoichat* dengan *Kampan*, *Luang* dengan *Chanee* serta *Yurmawad* dengan *Chatsrithong* (Vanijajiva, 2012).

Penanda ISSR juga telah berhasil mengidentifikasi keanekaragaman dan duplikasi beberapa genotipe durian koleksi plasma nutfah durian Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP), Kebun Percobaan Cipaku. Hasil analisis berdasarkan pola pita ISSR pada koefisien kemiripan 0,68 menunjukkan duplikasi antara aksesori Pangkalan dengan Hepe, Pingku dengan Pasir Jati, Kendil dengan Sunan, Kuning Garing dengan Sikoclak, Aseupan dengan Kim serta Bulan dengan Tanjung Mabah (Syahrudin, 2012).

Kelemahan penanda ISSR mirip dengan penanda RAPD, yaitu (1) dibutuhkan DNA yang murni dan konsentrasi yang sama antar aksesori untuk standarisasi reaksi, (2) optimasi reaksi awal diperlukan, (3) penanda ini bersifat dominan (Kumar *et al.* 2009) dan (4) estimasi keanekaragaman genetika

didasarkan pada sifat dialelik. Bahkan dengan beberapa keterbatasan penanda tersebut, ISSR memberikan suatu alternatif yang menarik untuk penanda RAPD. Teknik ini jauh lebih mudah diimplementasikan dibanding AFLP (Wolfe & Liston, 1998).



BAB 5

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Hasil analisis dendrogram menunjukkan kemiripan yang cukup tinggi antara genotipe, yakni bervariasi dari 0,7 sampai 1,00. Genotipe satu dengan yang lainnya dapat dengan mudah dibedakan berdasarkan hasil analisis dendrogram.

Hasil analisis dendrogram menunjukkan bahwa terdapat duplikasi antara genotipe Arjuno dan Jangkarbumi pada koefisien kemiripan 1,00 berdasarkan 4 primer. Adanya duplikasi antara genotipe Arjuno dengan Jangkarbumi yang ditandai dengan munculnya alel yang sama antara kedua genotipe tersebut yakni 140 bp, 167 bp, 263 bp, 275 bp, 320 bp, 342 bp, 375 bp, 425 bp, 533 bp dan 664 bp. Hal ini mengindikasikan kemungkinan asal-usul tetua yang sama.

5.2 Saran

Warna coklat pada pelet DNA dapat dikurangi dengan penggunaan β -merkaptoetanol tiga kali lipat lebih banyak. Optimasi suhu penempelan dengan cara PCR gradien perlu dilakukan untuk mendapatkan suhu yang optimal saat penempelan. Apabila pita hasil PCR kurang tebal, maka metode *Nested-PCR* bisa digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Amid, T.B., H. Mirhosseini, & S. Kostadinovic. 2012. Chemical composition and molecular structure of polysaccharide-protein biopolymer from *Durio zibethinus* seed: extraction and purification process. *Chemistry Central Journal*, (6).
- Angeles, J.G.C., A.C. Laurena, & E.M. Tecson-Mendoza. 2005. Extraction of genomic DNA from the lipid, polysaccharide, and polyphenol-rich Coconut (*Cocos nucifera* L). *Plant Mol Biol Rep*, 23: 297a-297i.
- Astaman, M. 2007. *Durian Bukan Buah Terlarang*. Online. Tersedia di <http://web.ipb.ac.id> [diakses tanggal 16 Desember 2015].
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2013. *Produksi Buah Durian di Indonesia Tahun 2002-2013*. Jakarta: Publikasi BPS.
- Bradford, K. 2008. Comparing the ability of two PCR based techniques, RAPD and ISSR to detect low level of genetic diversity. In *Chicago botanic Garden*. Tersedia di <http://www.chicagobotanic.org/downloads/conservation> [diakses tanggal 9 Oktober 2010].
- Diyasree, P., K.A. Lokesh, P.L. John, T. Joy, T. Ramachandran, A.T. Muttakulath, T.M. Manila, V.T.K. Sandhya Rajan & D. Mathew. 2014. A simplified protocol for the recovery of high quality DNA from nutmeg. *J Trop Agric.*, 52 (1): 79-85.
- Doyle J.J. & J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Govindaraj, M., M. Vetriventhan & M. Srinivasan. 2014. Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. *Genetic Research International*: 1-14.
- Heidarinejad, H., M. Ebadi & H. Abbaspour. 2014. DNA extraction of almond without phenol and liquid nitrogen. *J Nuts.*, 5 (2): 33–37.
- Herselman, L. 2003. Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. *Euphytica*, 133 (3): 319-327.
- Hikmah, R.U. 2013. *Keanekaragaman Molekuler Durian Berdasarkan Fragmen Internal Transcribed Spacers (ITS) DNA Ribosomal Melalui Analisis PCR-RFLP*. Skripsi. Semarang: Jurusan Biologi FMIPA UNNES.

- Kimman, P. 2002. *Biodiversity Survey Of The Proposed Kelian Protection Forest*. PT. Kelian Equatorial Mining.
- Kumar, P., V.K. Gupta, A.K. Misra, D.R. Modi & B.K. Pandey. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2 (4): 141-162.
- Kusumadewi, S.Y. & M. Muna. 2010. Keragaman genetik beberapa klon durian (*Durio zibethinus* Murray) asal Jawa barat berdasarkan sidik random amplified polimorphic DNA. *Berita biologi*, 10 (3): 269-275.
- Lina, M.R., B. Budiman & S. Dadang. 2004. *Uji PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk deteksi virus hepatitis C*. Jakarta: Batan.
- Maltas, E., H.C. Vural, S. Yildiz. 2010. Extraction of genomic DNA from polysaccharide-, phenolics-rich Ginkgo biloba. *J Medicinal Plants Res.*, 5(3): 332-339.
- Manimekalai, R., P. Nagarajan, M. Bharathi & S.N. Kumar. 2003. DNA polymorphism among coconut (*Cocos nucifera* L.) cultivars and reciprocal cross derivatives differing in drought tolerance. *J. Plant Crop.*, 32.
- Michiels, A., W.V. Ende, M. Tucker, L.V. Riet & A.V. Laere. 2003. Extraction of high quality genomic DNA from latex-containing plants. *Anal Biochem.*, 315: 85-89.
- Millati, T. & Udiantoro. 2005. *Pencegahan reaksi pencoklatan pada kulit buah langsung dengan berbagai jenis dan konsentrasi zat penghambat*. Laporan Penelitian. Kalimantan Selatan: Fakultas Pertanian Universitas Lambung Mangkurat.
- Mondini, L., A. Noorani & M.A. Pagnotta. 2009. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. *Diversity*, (1): 19-35.
- Monteleone, I., D. Ferrazzini & P. Belletti. 2006. Effectiveness of neutral RAPD markers to detect genetic divergence between the subspecies *uncinata* and *mugo* of *Pinus mugo* Turra. *Silva Fennica*, 40 (3): 391-406.
- Moura, E.F., J.T.F. Neto, J.E. Sampaio, D.T.D. Silva & G.F. Ramalho. 2013. Identification of duplicates of cassava accessions sampled on the North Region of Brazil using microsatellite markers. *Acta Amazonica*, 43 (4): 461-468.
- Mukminatin, S.N. & M. Harisudin. 2012. Strategi Pemasaran Durian Sanggaran (*Durio zibethinus* Murr.) di Kecamatan Matesih Kabupaten Karanganyar dengan Metode Competitive Profile Matrix (Cpm). *Jurnal Sosial Ekonomi Pertanian*, 1 (1):15-32.

- Nagaoka, T. & Y. Ogihara. 1997. Applicability of Inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical applied Genetics*, 94: 597-602.
- Nalini, E., N. Jawali & S.G. Bhagwat. 2003. A Simple Method for Isolation of DNA from Plants Suitable for Long Term Storage and DNA Marker Analysis. *BARC Newsletter*, 249: 208.
- Nei, M. & W.H. Lei. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76: 5269-5273.
- Pandin, D.S. 2010. Penanda DNA Untuk Pemuliaan Tanaman Kelapa (*Cocos nucifera* L.). *Perspektif*, 9 (1): 21-35.
- [PDSIP] Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian. 2014. *Outlook Komoditi Durian*. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian.
- Peakall, R. & P.E. Smouse. 2006. Genalex 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Poerba, Y.S. & Yuzammi. 2008. Pendugaan Keragaman Genetik *Amorphopallustitanum* Becc. berdasarkan Marka Random Amplified Polymorphic DNA. *Biodiversitas*, 9 (2): 103-107.
- Purwantara, A., T.M. Nurita, A. Hajrial & H. Nurhaimi. 2003. Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) berdasarkan metode Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP). *Menara Perkebunan*, 71(1): 1-15.
- Retnoningsih, A. 2009. *Molecular Based Classification and Phylogenetic Analysis of Indonesian Banana Cultivars*. Dissertation. Bogor: Bogor Agricultural University.
- Riupassa, P.A. 2016. *Keragaman Genetik Durian (Durio Spp) Berdasarkan Penanda Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)*. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Rohlf, F.J. 1998. *NTSYS pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.0. use guide*. New York: Exeter Software Applied Biostatistics Inc.
- Ruwaida, I.P., E. Yuniastuti & Supriyadi. 2009. Analisis keragaman tanaman durian sukun (*Durio zibethinus*) berdasarkan penanda RAPD. *Bioteknologi*, 6: 89-98.
- Sahu, S.K., S. Thangaraj, K. Kathiresan. 2012. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without

- using liquid nitrogen and phenol. *Int Scholarly Res Network Mol Biol.*, 2012: 1-6.
- Salimath, S., A.C. De Oliveira, I.D. Godwin & J.L. Bennetzen. 1995. Assessment of genomic origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome*, 38: 757-763.
- Sari, I.P. 2016. *Karakterisasi Morfologi dan Agronomi Durian (Durio zibethinus Murray) di Kebun Koleksi Plasma Nutfah PT Hortimart Agro Center Bawen Kabupaten Semarang*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Semagn, K., A. Bjørnstad, M.N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African J Biotechnol.* 5(25):2540-2548.
- Sukhotu, T., I. Jarupeng, P. Mojarin, A. Peampol, A. Srakoa, S. Teinmongkol, P. Parinyapong & P. Chuthamas. 2008. *Identification and classification of Durian (Durio zibethinus Murr.) using AFLP analysis*. Bangkok: Chanthaburi Horticultural Research Center.
- Syahrudin, K. 2012. *Analisis keragaman beberapa genotipe durian (Durio zibethinus Murr.) menggunakan penanda morfologi dan molekuler ISSR*. Tesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Tasma, I.M., A. Warsun, D. Satyawan, Syafarudin & B. Martono. 2013. Analisis Kekerabatan 50 Aksesori Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Asal Kamerun Berdasarkan Marka Mikrosatelit. *Jurnal Agro Biogen*, 9 (1): 19-27.
- Ude, G.N., W.J. Kenworthy, J.M. Costa, P.B. Cregan & J. Alvernaz. 2003. Genetic diversity of soybean cultivars from China, Japan, North America, and North American ancestral lines determined by amplified fragment length polymorphism. *Crop Science*, 43 (5): 1858-1867.
- Uji, T. 2005. Keanekaragaman Jenis dan Sumber Plasma Nutfah Durio (*Durio spp.*) di Indonesia. *Buletin Plasma Nutfah*, 11 (1) : 28-33.
- United States Department of Agriculture. 2008. Plants profile for durian. Online. Tersedia di <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=DURIO> [accessed 27 Desember 2016].
- Vanijajiva, O. 2011. Genetic variability among Durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand detected by RAPD analysis. *Journal of Agricultural Technology*, 7 (4): 1107-1116.
- Vanijajiva, O. 2012. The application of ISSR markers in genetic variance detection among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand. *Procedia Engineering*, 32: 155-159.
- Wahyuni, S., D.H. Xu, N. Bermawie, H. Tsunematsu & T. Ban. 2004. Skrining ISSR primer studi pendahuluan Kekerabatan antar jahe merah, jahe emprit dan jahe besar. *Buletin TRO*, 15: 33-40.

- Weising, K., H. Nybom, K. Wolffan & W. Meyer. 1995. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. *Florida*. CRC Press.
- Winarno, F.G. 2002. *Kimia pangan dan gizi*. PT Gramedia Pustaka Utama: Jakarta.
- Wolfe, A.D. & A. Liston. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. *Plant Molecular Systematics*, I: 43-86.
- Yulita, K.S. 2013. Identifikasi molekuler pohon induk beberapa varietas durian asal Jepara menggunakan Random Amplified Polymorphic DNA. *J Hort*. 23(2):99-106.
- Yulita, K.S. & M. Murnianjari. 2010. Keragaman genetik beberapa klon durian (*Durio zibethinus* Murray) asal Jawa Barat berdasarkan sidik random amplified polimorphic DNA. *Berita Biologi*. 10(3):269-275.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski & D. Labuda . 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. *Genomics*, 20: 176-183.