



**ANALISIS KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN
IDENTIFIKASI DURIAN UNGGUL PULAU KUNDUR
KEPULAUAN RIAU BERDASARKAN PENANDA
MOLEKULER *INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT* (ISSR)**

Skripsi

disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi

oleh

Anggi Angeliena

4411415053

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

2020

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul **“Analisis Keanekaragaman dan Identifikasi Durian Unggul Pulau Kundur Kepulauan Riau Berdasarkan Penanda Molekuler *Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)*”** disusun berdasarkan hasil penelitian saya dengan arahan dosen pembimbing. Sumber informasi atau kutipan yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini. Skripsi ini belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar dalam program sejenis di perguruan tinggi manapun.

Semarang, 30 April 2020



Anggi Angeliena

NIM. 4411415053

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul

Analisis Keanekaragaman dan Identifikasi Durian Unggul Pulau Kundur Kepulauan Riau Berdasarkan Penanda Molekuler *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR)

Disusun oleh

Anggi Angeliena

4411415053

Telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi FMIPA UNNES pada tanggal 30 April 2020

Panitia Ujian

Ketua



Dr. Sugianto, M.Si.

NIP. 196102191993031001

Sekretaris

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Nms', written over the text of the secretary's name.

Dr.dr. Nugrahaningsih WH, M. Kes

NIP. 196907091998032001

Penguji Utama

Penguji I

A long, horizontal handwritten signature in black ink, written over the text of the main examiner's name.

Dr. Yustinus Ulung Anggraito, M.Si.

NIP. 196404271990031003

Penguji II

A handwritten signature in black ink, written over the text of the second examiner's name.

Talitha Widiatningrum, S.Si., M.Si. Ph.D.

NIP. 198009292005012002

Anggota Penguji/Pembimbing

A handwritten signature in black ink, written over the text of the member examiner's name.

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

NIP. 196007121990032001

MOTTO

“Bersama kesulitan, ada kemudahan”

PERSEMBAHAN

Untuk Ibu, Bapak, dan Adikku
tercinta.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan karunia, rahmat, dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan baik. Penulis telah mendapatkan bantuan dan ilmu dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Rektor, Dekan, dan Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang atas kesempatan yang telah diberikan untuk menuntut ilmu, mengizinkan penelitian, dan membantu administasi dalam menyelesaikan tugas akhir.
2. Prof. Dr. Ir. Amin Retnoningsih, M.Si. selaku pembimbing dan ketua tim penelitian durian yang telah membiayai penelitian ini, memberikan ilmu, arahan, kritik, dan saran dalam menyelesaikan tugas akhir.
3. Ibu Talitha Widiatningrum, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku penguji pertama dan Dr. Yustinus Ulung Anggraito, M.Si. selaku penguji kedua yang telah memberikan masukan, kritik, dan saran dalam menyelesaikan tugas akhir.
4. Prof. Dr. R. Susanti, M.P. selaku dosen wali penulis yang telah memberikan doa, arahan, dan dukungan selama menempuh pendidikan di UNNES.
5. Bapak Suyitno, Ibu Siti Samsiyah, dan Adik Aura Amelia atas segala doa, dukungan, dan segala pengorbanannya.
6. Teman-teman yang telah membantu dan mendukung dalam penyelesaian tugas akhir (Tim Penelitian Durian, Keluarga Lab. Biomol, Kuljar, Keluarga Eksternal, Keluarga Himabio, dan Sahabat Biologi).
7. Anang Ma'ruf yang menjadi kawan seperjuangan yang telah mendukung, membantu, memotivasi, dan mendoakan selama ini.

Penulis mohon maaf apabila dalam tugas akhir ini masih jauh dari kesempurnaan. Semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat.

Semarang, 30 April 2020

Penulis

ABSTRAK

Angeliena, A. (2020). Analisis Keanekaragaman dan Identifikasi Durian Unggul Pulau Kundur, Kepulauan Riau Berdasarkan Penanda Molekuler *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). Skripsi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Prof. Dr. Ir. Amin Retnoningsih, M.Si.

Kata kunci: durian unggul, identifikasi, ISSR, keanekaragaman

Durian unggul di Pulau Kundur berpotensi untuk dikembangkan. Namun tingkat produktivitasnya rendah dan kepastian identitas belum jelas. Kepastian identitas perlu dilakukan untuk pengembangan secara komersial dengan menggunakan berbagai penanda, seperti morfologi, biokimia (isozim), dan molekuler. Penanda morfologi dan isozim memiliki beberapa kelemahan. Tujuan dari penelitian ini untuk menganalisis keanekaragaman dan mengidentifikasi durian unggul Pulau Kundur menggunakan penanda molekuler ISSR.

Sampel 25 daun durian unggul Pulau Kundur diisolasi dengan metode CTAB yang dimodifikasi. Sampel diamplifikasi dengan 7 penanda ISSR dengan teknik PCR dan dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 2%. Data dianalisis menggunakan program NTSYSpc versi 2.02.

Rentang alel yang dihasilkan berkisar antara 260 – 1780 bp. Frekuensi alel berkisar 0,040 – 0,800. Nilai PIC ketujuh primer ISSR berkisar antara (0,251 – 0,379). Analisis kemiripan bernilai 0,1 – 0,86 atau tingkat keanekaragaman 14 – 100%. Hal ini berarti bahwa tidak ada varietas durian yang identik. Varietas Asapan (K17) dan Mas Pear (K18) memiliki tingkat kemiripan paling tinggi dengan koefisien kemiripan 0,85. Alel spesifik ditemukan pada varietas GT (K14), Sumbat (K24), Te Lo Kha (K9), dan Phang Jing Lien (K30) yang dapat digunakan sebagai penciri dari varietas lain. Analisis keanekaragaman durian unggul Pulau Kundur menggunakan 7 penanda ISSR digolongkan tinggi (92,8 % alel polimorfik).

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN	ii
PENGESAHAN	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB	
I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Masalah Penelitian	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Ruang Lingkup Penelitian	4
II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Keanekaragaman Durian di Indonesia	5
2.2 Penanda Molekuler ISSR untuk Analisis Keanekaragaman Genetik dan Identifikasi Tumbuhan	7
2.3 Kerangka Berpikir Penelitian	9
III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Subyek Penelitian	11
3.3 Parameter Penelitian	11
3.4 Alat dan Bahan	12
3.5 Prosedur Penelitian	12

	Halaman
3.6 Analisis Data	15
IV HASIL DAN BAHASAN	
4.1 Hasil	17
4.2 Bahasan	27
V SIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Simpulan	37
5.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA RUJUKAN	38
LAMPIRAN	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1.1.Durian unggul Pulau Kundur dalam acara Tour De Kundur 2018: Durian Kesep, Gading, dan UNY	1
2.1. Kerangka berpikir penelitian	10
3.1. Contoh skoring pita DNA hasil amplifikasi	15
4.1. Elektroforegram hasil isolasi DNA genom 25 varietas durian unggul Pulau Kundur, Kepulauan Riau	17
4.2.Elektroforegram optimasi suhu <i>annealing</i> primer ISSR5 dengan suhu 35°C; 37,3°C; 39,6°C; 41,9°C; 44,1°C; 46,4°C; 48,7°C; 51°C	19
4.3. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR1.....	20
4.4. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR2.....	20
4.5. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR4.....	21
4.6. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR5.....	21
4.7. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer PKBT8.....	22
4.8. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer PKBT9.....	22
4.9. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer PKBT12.....	23
4.10.Matriks Kemiripan durian unggul Pulau Kundur	25
4.11.Dendogram Durian Unggul Pulau Kundur Berdasarkan 7 Primer ISSR	26
4.12.Peta Pulau Kundur, Malaysia, Sumatera, Singapore, Kalimantan dengan Rasio 1:200	33

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1. Daftar Nama Varietas dan Lokasi Sampel Durian Unggul Pulau Kundur	11
3.2. Alat dan Bahan Tiap-tiap Proses	12
3.3. Komposisi MasterMix PCR	14
3.4. Daftar Primer ISSR	14
3.5. Proses PCR	15
4.1. Data Kuantitas DNA Genom Durian Unggul Pulau Kundur	18
4.2. Ukuran Hasil Amplifikasi DNA Menggunakan Primer ISSR1, ISSR2, ISSR4, ISSR5, PKBT8, PKBT9, dan PKBT12	19
4.3. Hasil Amplifikasi Primer ISSR2, ISSR4, ISSR5, PKBT8, PKBT9, dan PKBT12 pada 25 Varietas Durian Unggul Pulau Kundur	24
4.4. Rekapitulasi Alel Spesifik pada Beberapa Varietas Durian Unggul Pulau Kundur	24
4.5. Hasil Analisis Frekuensi Alel dan <i>Polymorphisms Information Content</i> (PIC)	25

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Buffer CTAB	45
2. Pembuatan EDTA 0,5 M	45
3. Pembuatan Buffer TE	45
4. Tabel Pengamatan Pita Polimorfik	46
5. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR1	47
6. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR2	47
7. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR4	47
8. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR5	47
9. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer PKBT9	48
10. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer PKBT12	48
11. Skoring Pita DNA Hasil Amplifikasi Primer ISSR	49

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Tanaman durian hidup tersebar di wilayah yang memiliki hutan hujan tropis, seperti Indonesia. Hampir 70% dari jenis durian yang ada di seluruh dunia terdapat di Indonesia. Keanekaragaman jenis durian di Indonesia tertinggi ditemukan di Kalimantan sebanyak 19 jenis, diikuti Sumatera 7 jenis, dan Pulau Jawa, Bali, Sulawesi, Maluku, serta Papua masing-masing 1 jenis (Tirtawinata *et al.*, 2016). Salah satu jenis durian yang dapat dikonsumsi dan digemari masyarakat serta ditemukan pada setiap wilayah di Indonesia adalah *Durio zibethinus*.

Setiap wilayah di Indonesia memiliki durian unggul. Kriteria durian unggul ditentukan oleh sifat dan ciri buah terutama pada bagian yang dikonsumsi, yaitu arilusnya. Ashari (2017) menyatakan bahwa durian unggul adalah durian yang memiliki arilus sesuai selera konsumen. Karakter durian unggul adalah rasa arilus yang manis dan sedikit pahit; warna arilus kuning hingga kemerahan; arilus yang tebal; struktur arilus yang tebal, berserat halus, pulen, dan kering; dan biji yang kempes (Norjana & Azizah, 2011, Handayani & Ismadi, 2017, Yuniastuti *et al.*, 2018,).

Pulau Kundur merupakan salah satu wilayah di Kabupaten Karimun, Kepulauan Riau yang memiliki durian unggul dan keanekaragamannya tinggi (Habibah *et al.*, 2019). Hal ini sesuai dengan pernyataan Handayani & Rahayu (2017); Pratiwi *et al.* (2018) bahwa keanekaragaman *D. zibethinus* di Indonesia sangat tinggi. Beberapa varietas durian unggul Pulau Kundur disajikan pada Gambar.1. 1.



Gambar 1.1. Durian unggul Pulau Kundur dalam acara Tour De Kundur 2018: Durian Kesep (A), Gading (B), dan UNY (C) (Sumber: dokumen Amin Retnoningsih)

Durian Pulau Kundur memiliki potensi untuk dikembangkan secara komersial. Kendala yang dihadapi saat ini adalah kepastian identitas durian unggul Pulau Kundur belum jelas. Kepastian identitas dibutuhkan dan penting untuk mengembangkan komoditas durian secara komersial. Kekeliruan identitas akan merugikan petani karena setelah durian berbuah minimal empat tahun kemudian, varietas diketahui berbeda dengan yang diinginkan. Identitas varietas durian juga penting sebagai dasar kegiatan konservasi (Riupassa, *et al.*, 2015).

Identifikasi durian dapat dilakukan menggunakan penanda morfologi organ generatif (Yuniastuti, 2018), organ vegetatif (Retnoningsih *et al.*, 2016; Pratiwi *et al.*, 2018), maupun keduanya (Habibah *et al.*, 2019). Para petani durian di Pulau Kundur menggunakan penanda morfologi organ generatif untuk menandai varietas durian yang dimilikinya. Identifikasi menggunakan penanda morfologi sulit dilakukan karena fenotipe antar varietas sulit dibedakan dan tidak stabil karena dipengaruhi oleh lingkungan (Pratiwi, 2018).

Penanda lain yang dapat digunakan sebagai identifikasi variasi genetik adalah isozim (Fatchiyah, 2011). Isozim merupakan produk langsung dari gen yang memiliki struktur kimia berbeda namun mengkatalisis reaksi yang sama. Isozim merupakan ekspresi gen sehingga penggunaannya dibatasi oleh kondisi, waktu, dan jenis organ (Salasa *et al.*, 2013).

Kelemahan penanda morfologi dan isozim menjadi salah satu alasan penggunaan penanda yang lebih efektif, yaitu penanda molekuler. Penanda molekuler bersifat stabil dibandingkan penanda lainnya karena DNA tidak dipengaruhi oleh lingkungan. Varietas durian yang dianggap sama secara morfologi, ternyata memiliki sidik jari DNA yang berbeda (Siew *et al.*, 2018). Hal ini menunjukkan bahwa penanda molekuler mampu memberikan data yang akurat. Penanda molekuler telah digunakan untuk mengidentifikasi dan menganalisis berbagai jenis tanaman baik herba (Tapeh *et al.*, 2018), semak, maupun pohon (Purayil *et al.*, 2018; Wani *et al.*, 2018). Berbagai penelitian tentang analisis keanekaragaman durian dengan penanda molekuler telah banyak dilakukan, di antaranya dengan penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Ruwaida, *et al.*, 2009; Mursyidin dan Daryono, 2016), *Simple Sequence Repeats* (SSR) (Hafizah *et al.*, 2018), *Restriction Fragment Length Polymorphism*

(RFLP) (Fibriana dan Hadiyanti, 2016), dan *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) (Solikin, *et al.*, 2017).

Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) merupakan penanda molekuler yang tidak membutuhkan desain primer karena target penanda ini berada di antara dua lokus mikrosatelit (Cui, *et al.*, 2016). Kelebihan penanda molekuler lainnya adalah lokus tersebar di seluruh genom dan prosesnya relatif cepat dan stabil (Zhao, *et al.*, 2014). Penanda molekuler ISSR secara efektif dapat mengungkapkan keanekaragaman genetik durian Lai di Kalimantan (Handayani dan Rahayu, 2017).

Analisis keanekaragaman genetik dan identifikasi durian unggul Pulau Kundur menggunakan penanda ISSR perlu dilakukan sebagai langkah awal untuk mengembangkan durian unggul Pulau Kundur secara komersial. Identifikasi menggunakan penanda molekuler penting dilakukan untuk kepastian identitas durian tingkat varietas.

1.2 Masalah Penelitian

Masalah yang diteliti adalah “Bagaimana keanekaragaman genetik dan identitas durian unggul Pulau Kundur Kepulauan Riau berdasarkan penanda molekuler ISSR?”

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis keanekaragaman genetik dan identifikasi durian unggul Pulau Kundur Kepulauan Riau berdasarkan penanda molekuler ISSR.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Manfaat teoritis

Memberikan informasi tentang keanekaragaman genetik dan identitas durian unggul Pulau Kundur berdasarkan penanda ISSR.

2. Manfaat praktis

Penelitian ini bermanfaat bagi petani untuk mengetahui kepastian identitas sebagai acuan dasar dalam pengembangan durian secara komersial.

1.5. Ruang Lingkup Penelitian

1.5.1 Keanekaragaman genetik durian unggul Pulau Kundur

Keanekaragaman genetik dianalisis menggunakan data ukuran, jumlah, dan frekuensi alel; matriks kemiripan; dan dendogram. Durian unggul Pulau Kundur sebanyak 25 varietas hasil eksplorasi Yayasan Durian Indonesia dalam acara *Tour de Kundur* tahun 2018 digunakan sebagai sampel penelitian ini.

1.5.2 Identifikasi durian unggul Pulau Kundur

Identitas durian unggul Pulau Kundur ditentukan berdasarkan profil alel spesifik hasil amplifikasi DNA. Profil alel spesifik adalah profil alel dengan ukuran tertentu yang ditemukan pada satu varietas sehingga dijadikan sebagai identitas..

1.5.3. Penanda Molekuler Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

Penanda molekuler ISSR merupakan salah satu penanda multilokus yang dihasilkan dari amplifikasi fragmen DNA yang berada di antara segmen nukleotida SSR (mikrosatelit). Penanda ISSR yang digunakan meliputi primer ISSR1, ISSR2, ISSR4, ISSR5, PKBT8, PKBT9 dan PKBT12. Nilai PIC dihitung dan dianalisis untuk menentukan seberapa informatif suatu primer sebagai penanda molekuler.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Keanekaragaman Durian di Indonesia

Indonesia menjadi pusat biodiversitas durian di dunia yang berpusat di Kalimantan. Durian termasuk ordo *Malvales*, famili *Malvaceae*, dan genus *Durio*. Buah durian dikenal sebagai “*The King of Fruit*” merupakan salah satu buah yang digemari masyarakat Indonesia. Buah durian ini memiliki nama lokal yang berbeda di setiap daerah. Durian dikenal dengan nama duren (bahasa Jawa, bahasa Betawi, bahasa Gayo), duriang di Manado, duliang di Toraja, doriang di Ambon, dan rulen di Pulau Seram (Ashari, 2017).

Durio zibethinus merupakan salah satu spesies durian yang dapat dikonsumsi (*edible*). Kelompok durian *edible* yang lain adalah *D. dulcis*, *D. grandiflorus*, *D. excelsus*, *D. griffithii*, *D. graveolens*, *D. kutejensis* (Durian Lai), *D. lowianus*, *D. oxleyanus*, dan *D. testudinarum* (durian macan) (Uji, 2005). Sebagian *D. zibethinus* Murr. ini dikategorikan sebagai durian unggul. Durian unggul memiliki rasa manis agak pahit yang khas. Rasa ini disebabkan karena adanya kandungan lemak, gula, ester, thioasetal, thioester, tiolana, dan alcohol (Aziz dan Jalil, 2019).

Pengertian durian unggul menurut Keputusan Menteri Nomor 700/Kpts/UT.320/D/12/2011 adalah durian yang memiliki kelebihan dalam sifat maupun hasil produksi (Direktorat Jenderal Hortikultura, 2013). Ashari (2017) menyatakan bahwa durian dikatakan unggul apabila memiliki arilus yang berkualitas. Ciri-ciri arilus berkualitas adalah memiliki *edible portion* lebih dari 30%, rasanya manis sedikit pahit, tekstur pulen berserat halus, dan warna kuning hingga kemerahan (Santoso *et al.*, 2008; Handayani dan Ismadi, 2017; Yuniastuti *et al.*, 2018). Ukuran berat buah juga menjadi preferensi konsumen memilih buah durian (Norjana dan Azizah, 2011).

Pulau Sumatera bukan merupakan pusat keanekaragaman durian Indonesia, tetapi varietas durian unggul banyak ditemukan di pulau tersebut. Beberapa durian unggul yang berasal dari Pulau Sumatera, antara lain durian Setapak, durian Belimbing, dan durian Jantung yang berasal dari Kabupaten

Pasaman (Redaksi Trubus, 2012). Durian unggul Namlung dan Sutura Manis ditemukan berturut-turut di Bangka Barat dan Pulau Timah.

Keanekaragaman genetik durian tinggi karena durian memiliki sistem polinasi terbuka sehingga memungkinkan terjadi penyerbukan silang antar varietas (Indriyani *et al.*, 2012) yang umumnya dibantu kelelawar (Bumrungsri *et al.*, 2009, Aziz *et al.*, 2017). Sifat *self-incompabilty* pada bunga durian menyebabkan peluang penyerbukan sendiri rendah (Lim dan Luders, 1998).

Hasil analisis keanekaragaman 32 durian di Provinsi Riau menggunakan ciri morfologi menunjukkan tingkat keanekaragaman sebesar 36-65% (Baroroh *et al.*, 2014). Analisis pegelompokkan berdasarkan dendogram menunjukkan hasil bahwa terdapat dua grup yang mengelompok tidak berdasarkan asalnya melainkan dari persamaan beberapa ciri morfologi yang digunakan. Sama halnya dengan penelitian Lestari *et al.*, (2011) yang menunjukkan bahwa pengelompokkan 36 aksesori durian Pulau Bengkalis berdasarkan pada persamaan ciri morfologi antar aksesori. Tingkat keanekaragaman sebesar 34-58%. Penelitian lain dari Miswanti *et al.*, (2017) menunjukkan bahwa tingkat keanekaragaman 29 varietas durian yang berasal dari Kabupaten Bengkulu Tengah dan Kabupaten Lebong, Provinsi Bengkulu adalah 16-41%. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, tingkat keanekaragaman durian berdasarkan penanda morfologi memiliki rentang rendah dan tingkat keanekaragaman genetik berdasarkan penanda molekuler berpotensi menghasilkan rentang yang lebih tinggi.

Sepuluh kultivar durian lokal Provinsi Kalimantan Selatan (durian Balade, durian Enam Hapat, durian Kamundai, durian Lakatan, durian Likol, durian Sahang, durian Sihabuk, durian Silanjang, durian Sipisang, durian Sitik) dan durian Petruk sebagai pembandingan menunjukkan tingkat keanekaragaman genetik yang tinggi berdasarkan penanda molekuler *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Hasil penelitian Mursyidin dan Darhono (2016) menunjukkan bahwa tingkat polimorfisme 82,17%. Durian Petruk dari Jawa Tengah memiliki koefisien kemiripan 0,949 dibandingkan dengan durian Silanjung yang berasal dari Kalimantan Selatan. Diduga dua varietas ini sama namun faktor lingkungan yang membuat berbeda.

2.2 Penanda Molekuler ISSR untuk Analisis Keanekaragaman Genetik dan Identifikasi Tumbuhan

Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) adalah penanda molekuler yang diperoleh dari perbanyakan sekuen DNA target yang berada di wilayah antara SSR satu dengan SSR lainnya. Penanda ini terdiri atas satu primer yang komplemen dengan daerah mikrosatelit. Setiap pita hasil amplifikasi primer ISSR merupakan sekuen DNA yang dibatasi dua mikrosatelit berbeda. Sekuen DNA yang diamplifikasi dengan primer ISSR tidak terkait langsung dengan gen yang mengendalikan sifat morfologis (*non coding region*) (Handayani, 2016). Panjang primer ISSR berkisar antara 16-25 bp dengan produk amplifikasi 200-2000 bp. Penanda ISSR merupakan sekuen pendek DNA yang digunakan untuk membedakan suatu individu dengan adanya polimorfisme. Berbeda dengan penanda morfologi, penanda molekuler ini tidak dipengaruhi oleh lingkungan dan dapat menghasilkan tingkat polimorfisme yang tinggi (Riupassa, 2015).

Penanda molekuler ISSR telah digunakan oleh Riupassa *et al.* (2015) untuk menganalisis keanekaragaman genetik *D. tanjungpurensis* di Kalimantan. 10 primer ISSR digunakan dalam penelitian ini. ISSR1, ISSR3, ISSR4, ISSR5, ISSR9, PKBT2, PKBT3, PKBT7, PKBT8, PKBT12. Hasil menunjukkan bahwa keanekaragaman genetik *D. tanjungpurensis* berdasarkan persentase alel polimorfik tinggi (100% polimorfik). Ukuran alel berkisar 200-2000 bp.

Keanekaragaman genetik 14 kultivar *D. zibethinus* Murr. asal Provinsi Nonthaburi, Thailand berhasil diungkap menggunakan primer ISSR1, ISSR3, ISSR4, ISSR5, dan ISSR9. Lima primer tersebut mampu menghasilkan 50 pita DNA dan 38% polimorfik. Koefisien similaritas juga dihitung untuk memperkirakan variasi genetik. Matriks similaritas berdasarkan koefisien Nei dan Li berkisar 0,632-1,00. Dendogram dibangun dengan metode UPGMA dan menghasilkan 2 kelompok besar. Salah satu sub kelompok terdiri atas 6 kultivar Kop. Hal ini menandakan bahwa kultivar tersebut memiliki jarak genetik yang dekat (Vanijajiva, 2012).

Analisis keanekaragaman genetik 27 varietas durian koleksi Universiti Putra Malaysia menggunakan 12 primer ISSR menghasilkan 91,73% alel polimorfik (Siew *et al.*, 2018). Persentase alel polimorfik ini lebih tinggi dibanding dengan menggunakan penanda RAPD pada penelitian Vanijajiva

(2012). Hal ini menunjukkan bahwa ISSR mampu mengungkap keanekaragaman genetik lebih tinggi dibanding RAPD.

Keanekaragaman genetik yang tinggi (42-66%) ditemukan pada 8 varietas lokal durian Lai (*D. kutejensis*) di Batuah, Kalimantan berdasarkan 10 penanda ISSR (Handayani & Rahayu, 2017). Penanda ISSR mengamplifikasi 91,3% alel polimorfik. Alel spesifik ditemukan pada masing-masing primer. Alel spesifik dapat dikaji lebih lanjut terkait pengembangan penanda *Sequence Characterized Amplified Region* (SCAR) untuk identitas molekuler.

Durian lokal koleksi Hortimart Agro Centre Jawa Tengah sebanyak 41 varietas menunjukkan tingkat keanekaragaman genetik tinggi karena 100% alel polimorfisme. Tidak ada varietas yang memiliki profil alel sama. Artinya, tidak ada varietas yang memiliki identitas yang 100% sama. Profil alel ini dapat menjadi identitas setiap varietas. Identitas varietas juga dapat ditentukan berdasarkan alel spesifik. Alel spesifik koleksi Hortimart ditemukan pada varietas Petruk 2, Ontoseno, Semar, Arjuno, dan Gondomono (Solikin *et al.*, 2017).

Penanda molekuler ISSR telah mampu mengungkap keanekaragaman genetik tingkat jenis pada 10 jenis *Pandanus* Jawa Barat (Rahayu dan Handayani, 2010). Primer ISSR2 dan ISSR7 yang digunakan menghasilkan 91,5% pita polimorfik. Tingginya tingkat keanekaragaman genetik ini disebabkan sistem penyerbukan silang.

Keanekaragaman genetik *Myrcia lundiana* telah berhasil diungkap menggunakan penanda molekuler ISSR. *M. lundiana* merupakan salah satu tanaman obat penghasil minyak esensial yang tumbuh di wilayah tropis. Sebanyak 27 varietas *M. lundiana* berhasil diamplifikasi 20 primer ISSR dan menghasilkan 135 alel polimorfik dengan koefisien similaritas 0,15-0,87 dan keanekaragamannya 0,13-0,85. Nilai tingkat keanekaragaman genetik tersebut termasuk dalam kategori menengah (Alves, 2016).

Penanda molekuler ISSR juga dapat digunakan untuk identifikasi dengan mengetahui alel spesifik. Alel spesifik adalah alel yang hanya terdapat di satu varietas saja. Alel spesifik ditemukan pada *Cucumis* sp. yang diamplifikasi menggunakan primer UBC 812 berukuran 700bp dan 1000bp serta primer UBC 808 berukuran 650 bp (Parvathaneni *et al.*, 2011).

Penelitian Pereira *et al.* (2017) tentang analisis keanekaragaman genetik *Croton tetradenius* Baill. menggunakan penanda molekuler ISSR. *C. tetradenius* merupakan tanaman endemik Brazil. Sebanyak 40 sampel *C. tetradenius* diambil dari 4 wilayah yang berbeda dan diamplifikasi menggunakan 13 primer UBC. Hasilnya adalah tidak ada satupun sampel yang identik secara genetik. Penanda molekuler ISSR juga dapat mengungkapkan variasi genetik di dalam atau di antara populasi menggunakan uji *Analysis of Molecular Variance* (AMOVA). Pemisahan 40 individu *C. tetradenius* menjadi enam kluster menegaskan hasil Uji AMOVA yang mengungkapkan variasi genetik lebih besar di dalam populasi.

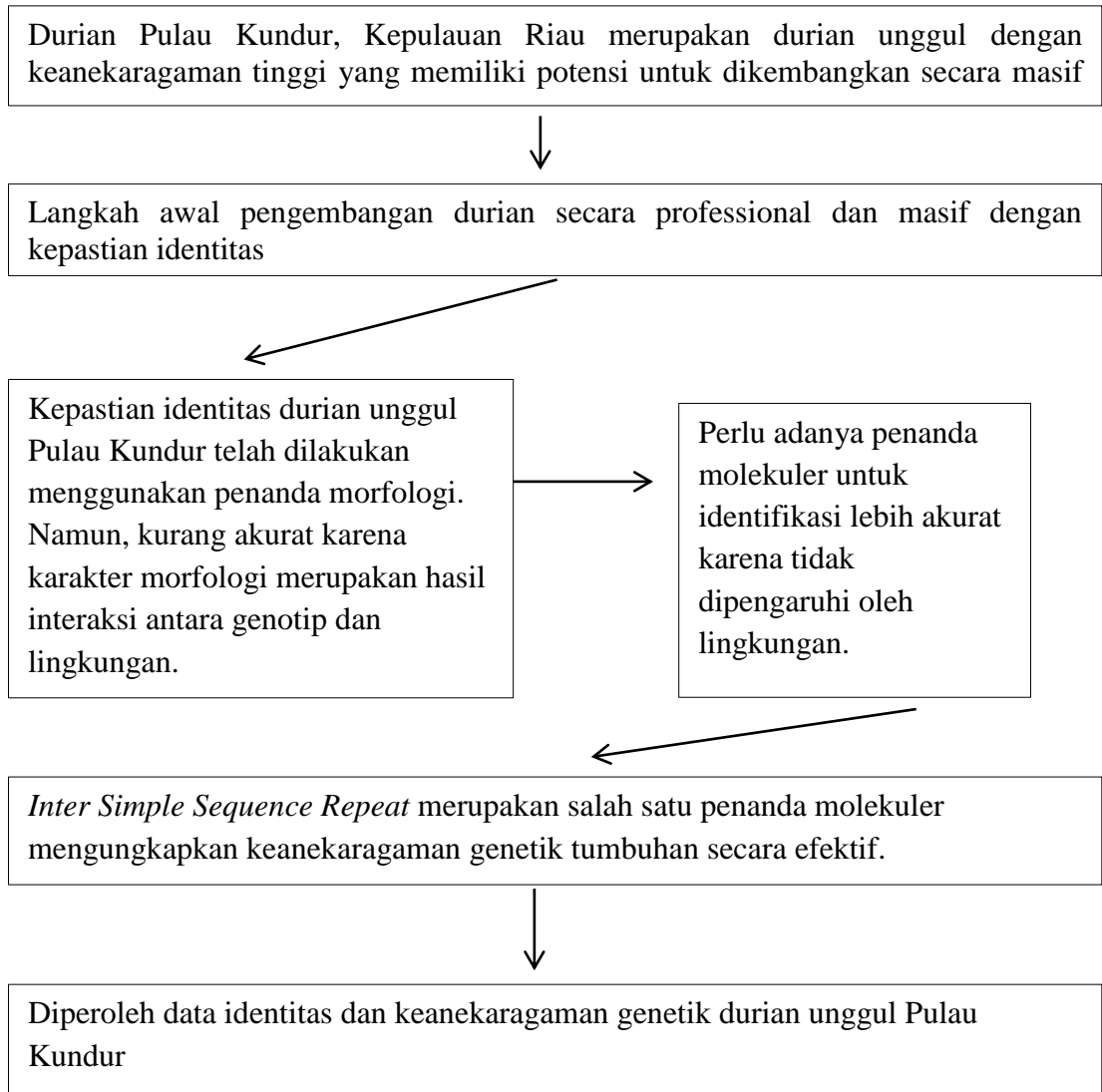
Penanda molekuler ISSR mampu mengungkapkan keanekaragaman genetik pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum*) yang diradiasi sinar gamma. Planlet empat sampel pisang ambon diradiasi sinar gamma dengan dosis berbeda (10gy, 20gy, 30gy). Kemudian, diamplifikasi menggunakan 6 primer, yaitu ISSR 835, ISSR 836, ISSR 846, ISSR 847, ISSR 848 dan ISSR 855. Namun, hanya 2 primer yang menghasilkan pita polimorfik. Matriks kemiripan 0,25-0,93. Hal ini berarti bahwa kedua primer ISSR mampu mengungkap keanekaragaman genetik pisang ambon hasil radiasi sinar gamma (Due *et al.*, 2019).

Abengmeneng *et al.* (2016) meneliti tentang hubungan genetik di antara 36 genotip *Ceiba pentandra* L. menggunakan penanda molekuler RAPD dan ISSR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa RAPD, ISSR, serta gabungan ISSR dan RAPD mengungkap aksesi dengan jumlah berturut-turut 14 (28,89%), 21 (58,33%), dan 4 (11,11%) memiliki koefisien kemiripan 1. Hal ini berarti bahwa ISSR berhasil mengungkap aksesi identik dengan jumlah paling tinggi.

Hasil penelitian Munankarmi *et al.* (2018) mengungkapkan bahwa *Citrus aurantifolia* memiliki tingkat keanekaragaman tinggi. Total pita amplifikasi dengan 21 primer ISSR sebanyak 234 pita dan 204 (87,18%) di antaranya polimorfik. Hal ini menunjukkan bahwa ketersediaan berbagai sumber gen *C. aurantifolia* untuk dimanfaatkan dalam program pemuliaan saat ini dan masa depan.

2.3 Kerangka Berpikir Penelitian

Kerangka berpikir penelitian ini disajikan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Kerangka berpikir penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

3.1.1. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan April 2018 – April 2020.

3.1.2. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Riset Jurusan Biologi FMIPA UNNES.

3.2. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah 25 varietas durian unggul Pulau Kundur, Kepulauan Riau hasil eksplorasi *Tour de Kundur* 2018 (Tabel 3.1)

Tabel 3.1. Daftar Nama Varietas dan Lokasi Sampel Durian Unggul Pulau Kundur

Kode	Varietas Durian	Kecamatan	Kode	Varietas Durian	Kecamatan
K1	GSG	Kundur Barat	K14	GT	Kundur Barat
K2	Cuhut	Kundur Barat	K15	Tongkat	Kundur Barat
K3	Angbak Tolo	Kundur Barat	K16	TR	Kundur Barat
K4	Angbak Kia 11	Kundur Barat	K17	Asapan	Kundur Barat
K5	Angbak Kia 03	Kundur Barat	K18	Mas Pear	Kundur Barat
K6	Huang Kwue Niam	Kundur Barat	K19	Jongkong	Kundur Barat
K7	Pheng Kwai	Kundur Barat	K22	Moncong	Kundur
K8	Angbak Outhut	Kundur Barat	K24	Sumbat	Kundur
K9	Te Lo Kha	Kundur Barat	K26	Empe	Kundur
K10	Phang Jing Lien	Kundur Barat	K27	Milah	Kundur
K11	HM	Kundur Barat	K28	Tiaulo Angibak	Kundur
K13	Pondok	Kundur Barat	K29	Pekan	Kundur
			K30	Layang	Kundur

3.3. Parameter Penelitian

Parameter yang diteliti adalah ukuran, jumlah, dan frekuensi alel berdasarkan penanda molekuler ISSR untuk mengungkap keanekaragaman genetik 25 varietas durian unggul Pulau Kundur.

3.4. Alat dan Bahan

Alat dan bahan penelitian disajikan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Alat dan Bahan Tiap-tiap Proses

Proses	Alat	Bahan
Penyimpanan sampel daun sebelum diisolasi	Plastik bersih, label nama, <i>freezer</i> , tisu, <i>marker</i> .	Sampel daun durian.
Isolasi DNA	<i>Disposable tissue grinder pestle</i> , <i>microtube</i> 2 ml, <i>micropipet</i> , tip pipet, sentrifus, <i>vortex</i> , <i>water bath</i> , sarung tangan.	Sampel daun durian, nitrogen cair, <i>buffer</i> ekstraksi (Tris-HCL 0,1 M pH 8, EDTA 0,02 M, NaCl 1,4 M, CTAB 2%, PVP 1%, β - <i>mercaptoethanol</i> 0,3%), PCI, RNase, isopropanol 100%, etanol 70%, TE <i>buffer</i> .
Uji Kuantitas DNA	Nanospektrofotometer, tip pipet, mikropipet.	<i>Tissue scientific</i> (tisu Kim Tech), hasil isolasi DNA genom.
Visualisasi DNA	Neraca analitik, <i>Microwave</i> , elektroforesis horizontal, <i>tray</i> , <i>comb</i> , tabung erlenmeyer, aluminium foil, <i>micropipet</i> , tip pipet, <i>gel documentation</i> , komputer.	<i>Buffer</i> TAE 1X, Gel agarose 1,2% dan 2%, <i>Ethidiumbromida</i> (EtBr), <i>loading dye</i> , GeneRuler 50 bp dan 100bp plus.
Amplifikasi DNA	<i>Thermocycler</i> , <i>microtube</i> 200 ul, <i>micropipette</i> , tip pipet, <i>spindown</i> , <i>plate</i> PCR.	Komposisi dalam proses PCR (<i>working DNA</i> , <i>primer</i> ISSR, <i>DreamTaq Green PCR Master Mix</i> (2X), <i>nuclease free water</i> .

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Daun

Sampel daun durian diambil dari daun ke-3 dari ujung tangkai. Sampel dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dibungkus dengan tisu. Sampel dimasukkan ke plastik dan diberi nama dan kode sampel. Sampel dimasukkan ke *ice box* yang sudah diberi *ice pack* di dalamnya untuk penyimpanan selama perjalanan. Penyimpanan sampel di *freezer* -20 °C.

3.5.2. *Isolasi DNA genom*

Isolasi DNA genom daun durian menggunakan metode Vanijajiva (2012) yang dimodifikasi oleh Solikin et al. (2017). Daun dibersihkan dari sisik dan kotoran menggunakan alkohol 70%. Daun ditimbang seberat 0,05 gram dimasukkan ke dalam *microtube*, ditambahkan nitrogen cair ± 1 ml, lalu dihancurkan dengan *disposable tissue grinder* sampai berbentuk seperti bubuk. Sampel ditambahkan dengan buffer ekstraksi (Tris-HCL 0,1 M pH 8, EDTA 0,02 M, NaCl 1,4 M, CTAB 2%, PVP 1%, β -mercaptoethanol 0,3%) sebanyak 1000 μ l. Larutan dihomogenkan menggunakan *vortex* lalu diinkubasi di *waterbath* dengan suhu 60°C selama 30 menit sambil dibolak-balik setiap 10 menit sekali.. Larutan di-*sentrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipindahkan ke *microtube* yang baru. Supernatan dicuci dengan larutan PCI dengan volume yang sama seperti volume supernatan. Larutan di-*sentrifuge* lagi dengan kecepatan 10.000 selama 15 menit. Setelah di-*sentrifuge*, larutan terdiri atas tiga lapisan yakni DNA dan air (lapisan atas), debris sel (lapisan tengah), dan senyawa organik yang terlarut (lapisan bawah) (Fatchiyah et al, 2011). Penambahan PCI dilakukan pengulangan 2 kali. Supernatan dipindah ke *microtube* yang baru dan ditambahkan dengan RNAse sebanyak 2,5 μ l. Larutan diinkubasi di inkubator dengan suhu 37°C selama 30 menit.

Setelah diinkubasi, larutan ditambahkan etanol absolut dingin sebanyak 1 ml. Larutan di-*invert* hingga membentuk presipitasi DNA. *Sentrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang terbentuk, dicuci dengan etanol 70% sebanyak 450 μ l kemudian di-*sentrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit dan dilakukan pengulangan 2 kali untuk mendapatkan DNA yang bersih. Pelet dikering anginkan, kemudian ditambahkan 100 μ l *buffer* TE.

3.5.3. *Uji Kualitas DNA*

Uji kualitas DNA menggunakan elektroforesis gel agarose 1%. Pembuatan gel agarose dengan cara melarutkan 0,4 gram agarose dalam 40 ml TAE *buffer* 1X. Kemudian dipanaskan di *microwave* selama 4-5 menit. Apabila sudah larut, larutan gel dituang ke cetakan yang sebelumnya sudah dibersihkan.

Sampel disiapkan untuk dicek kualitas DNA nya beserta *ladder*. Sampel yang diambil sebanyak 4 μ l. *Ladder* yang digunakan adalah GeneRuler 100 bp

Plus. Elektroforesis dijalankan pada 120 V selama 30 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, gel direndam di dalam *ethidium bromide* selama 2 menit. Visualisasi pita DNA menggunakan UV transiluminator lalu difoto untuk dokumentasi. Uji kualitatif menghasilkan pita DNA genom. Uji kuantitatif menggunakan nano spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

3.5.4. Amplifikasi DNA

Kegiatan amplifikasi DNA diawali dengan pembuatan komposisi *MasterMix* PCR yang disajikan pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3. Komposisi *MasterMix* PCR

No	Bahan	Volume
1.	DNA <i>template</i>	1 µl konsentrasi 30 ng/µl
2.	<i>Water nuclease free</i>	4,25 µl
3.	Primer ISSR	1 µl
4.	<i>DreamTaq Green PCR MasterMix (2X)</i>	6,25 µl
	Total	12,5 µl

Primer yang digunakan adalah tujuh macam primer ISSR yang memiliki suhu *annealing* yang berbeda (Tabel 3.4). Primer tersebut telah digunakan untuk menganalisis keanekaragaman genetik durian tingkat varietas.

Tabel 3.4. Daftar Primer ISSR

No	Nama Primer	Urutan Basa	Suhu Annealing (°C)	Referensi
1.	ISSR1	5'-AGGAGGAGGAGGAGG-3'	48,4	Riupassa, 2015
2.	ISSR2	5'-AGAAGAAGAAGAAGT-3'	36,7	Handayani dan Rahayu, 2017
3.	ISSR4	5'-GAGGAGGAGGAGGAGAC-3'	47,3	Vanijajiva, 2012
4.	ISSR5	5'-GAGGAGGAGGAGGAGAT-3'	44	Riupassa, 2015
5.	PKBT8	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	53,7	Riupassa, 2015
6.	PKBT9	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	50,9	Syahrudin, 2012
7.	PKBT12	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTT-3'	44,9	Riupassa, 2015

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan *peqSTAR 2X Thermocycler*. Tahap-tahap PCR meliputi *pre-denaturation*, *denaturation*, *annealing*, *extention*, dan *final extention* (Tabel 3.5).

Tabel 3.5. Proses PCR

No	Proses	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu
1.	<i>Pre-denaturation</i>	95	4 menit
2.	<i>Denaturation</i>	95	30 detik
3.	<i>Annealing</i>	36,7 – 53,7	30 detik
4.	<i>Extention</i>	72	1 menit
5.	<i>Final extention</i>	72	10 menit
6.	Jumlah siklus	35	

Produk PCR dielektroforesis pada agarose 2% selama 1 jam dengan voltase 75V. Pita yang akan dilihat, dibandingkan dengan GeneRuler 50 bp.

3.6. Analisis Data

Pita produk hasil PCR diterjemahkan ke dalam data biner (1 atau 0). Pengisian angka 1 atau 0 berdasarkan kemunculan pita. Jika pita muncul ditempat migrasi yang sama diberi angka 1, apabila tidak ada pita yang muncul diberi angka 0.

Pembacaan pita dilakukan secara manual dengan asumsi bahwa pita DNA dengan laju sama adalah homolog. Penetapan kode alel berdasarkan ukuran. Alel berukuran kecil diberi kode A, selanjutnya B, dan seterusnya. Data biner tersebut disajikan di *Microsoft Excel* dengan posisi alel sebagai kolom dan baris sebagai baris. Contoh *scoring* pita disajikan pada Gambar 3.1.

Alel	Kode Sampel							
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
A	—	—	—	—	—	—		—
B	—	—		—			—	
C			—	—		—	—	—
D	—				—			—
E			—	—	—	—	—	—

Alel	Kode Sampel							
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
A	1	1	1	1	1	1	0	1
B	1	1	0	1	0	0	1	0
C	0	0	1	1	0	1	1	1
D	1	0	0	0	1	0	0	1
E	0	0	1	1	1	1	1	1

Gambar 3.1. Contoh skoring pita DNA hasil amplifikasi

3.6.1. Frekuensi Alel

Frekuensi alel dihitung untuk menganalisis PIC. Frekuensi alel dihitung dengan rumus:

$$x = \frac{\text{Jumlah alel } i \text{ teramati}}{\text{Jumlah seluruh alel } i \text{ teramati dan alel } i \text{ tidak teramati}}$$

3.6.2. Analisis Polymorphism Information Content (PIC)

Nilai PIC menunjukkan kemampuan penanda molekuler untuk mengungkap keanekaragaman pada suatu sampel. Nilai PIC mencerminkan tingkat informativitas suatu penanda molekuler dan keanekaragaman gen (Nei's, 1973). Nilai PIC dapat dihitung dengan rumus:

$$PIC_i = 2f_i(1-f_i)$$

Keterangan:

PIC_i = PIC untuk primer ke-i

f_i = Frekuensi munculnya alel (alel yang dapat diamplifikasi)

$1-f_i$ = frekuensi alel 0 (tidak muncul alel)

Nilai PIC penanda dominan, seperti ISSR berkisar antara 0-0,5.

3.6.3. Analisis Similaritas

Koefisien kemiripan antar sampel berdasarkan penanda ISSR dianalisis menggunakan *Similarity of Qualitative Data* (SYMQUAL) pada *software Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSYSpc) versi 2.02 (Jamshidi & Jamshidi, 2011). Data dihitung berdasarkan koefisien *DICE*.

3.6.4. Analisis Pengelompokkan (Clustering)

Analisis pengelompokkan (*clustering*) menggunakan *sequential, agglomerative, hierarchical, and nested* (SAHN) – *Unweighted pair-group method, arithmetic average* (UPGMA) (Riupassa, 2015). Hasil analisis berupa dendogram.

BAB IV

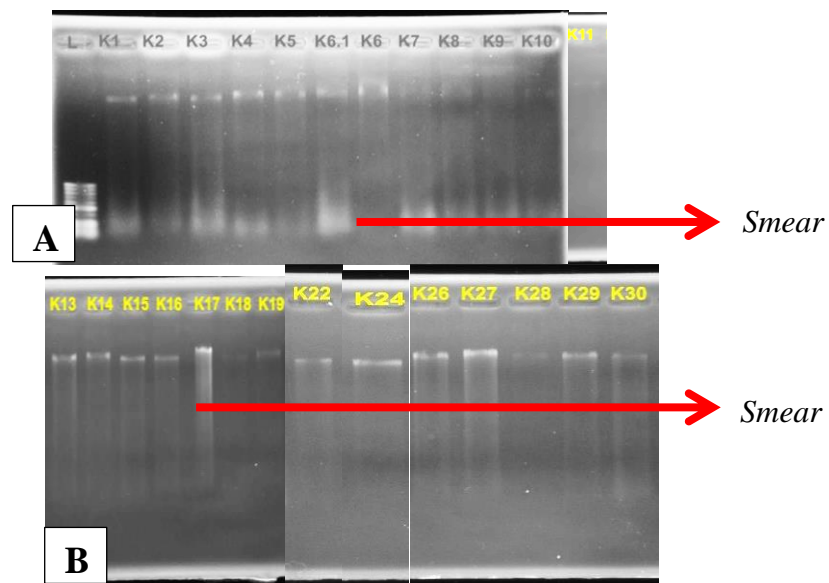
HASIL DAN BAHASAN

4.1. Hasil

DNA berkualitas dibutuhkan dalam analisis keanekaragaman genetik dan identifikasi berdasarkan penanda molekuler. Ciri-ciri DNA yang berkualitas adalah pita jelas dan tidak *smear*. DNA genom yang berkualitas kemudian diamplifikasi menggunakan beberapa primer ISSR. Optimasi primer perlu dilakukan untuk mendapatkan suhu *annealing* yang tepat sehingga DNA genom dapat teramplifikasi. Alel hasil amplifikasi dianalisis dan dikonstruksi menjadi dendogram untuk mengungkap keanekaragaman durian unggul Pulau Kundur.

4.1.1. Hasil Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolasi DNA Genom

DNA genom berhasil diisolasi menggunakan metode Vanijajiya (2012) yang dimodifikasi Solikin *et al.*, (2017). Kualitas DNA genom hasil isolasi diamati melalui elektroforesis *gel* agarose 1% dan dijalankan pada 120V selama 30 menit. Elektroforegram hasil isolasi DNA genom disajikan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Elektroforegram hasil isolasi DNA genom 25 varietas durian unggul Pulau Kundur, Kepulauan Riau: sampel K1-K11 (A) dan K13-K30 (B)
Keterangan: L= DNA *ladder* 50 bp

Uji kualitatif DNA genom durian unggul Pulau Kundur menunjukkan hasil yang berbeda. Pita DNA berkualitas dapat dilihat dari pita yang terlihat jelas dan tidak ada *smear*, seperti pada K11, K14, dan K19. Contoh pita terlihat *smear* pada

K7 dan K17, sedangkan pita yang lain tebal dan tipis serta sedikit *smear*. Uji kualitatif DNA diperkuat dengan uji kuantitatif menggunakan nano spektrofotometer untuk mengetahui kemurnian dan kontaminan DNA. Hasil uji kuantitatif DNA disajikan pada Tabel 4.1.

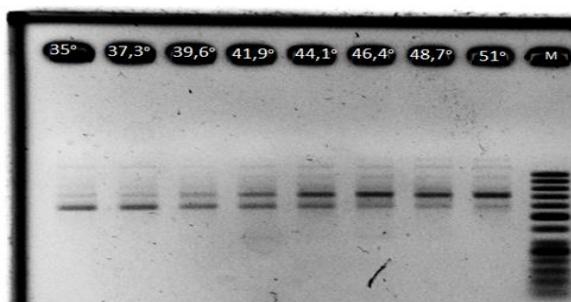
Tabel 4.1. Data Kuantitas DNA Genom Durian Unggul Pulau Kundur

Kode	Absorbansi $\lambda 260/\lambda 280$ nm	Konsentrasi (ng/ μ l)	Kode Sampel	Absorbansi $\lambda 260/\lambda 280$ nm	Konsentrasi (ng/ μ l)
K1	0,997	104,250	K15	1,021	94,350
K2	0,953	101,950	K16	1,289	127,250
K3	0,993	109,000	K17	1,168	96,850
K4	1,152	149,600	K18	1,224	42,400
K5	0,999	102,400	K19	1,127	45,300
K6	0,954	92,550	K22	1,338	67,950
K7	1,993	90,300	K24	1,349	53,300
K8	1,188	162,850	K26	1,190	53,550
K9	1,138	190,050	K27	1,176	57,500
K10	1,114	85,350	K28	1,465	43,950
K11	1,067	43,100	K29	1,170	126,00
K13	1,172	82,250	K30	1,374	72,900
K14	1,038	54,900			

Nilai absorbansi $\lambda 260/\lambda 280$ nm dan konsentrasi DNA bervariasi. Absorbansi $\lambda 260/\lambda 280$ nm bernilai 0,993-1,993 dengan rata-rata 1,186. Konsentrasi DNA bernilai 42-190,050 ng/ μ l dengan rata – rata 89,994.

4.1.2. Hasil Optimasi PCR-ISSR

DNA *template* dan suhu *annealing* kondisi tertentu dibutuhkan untuk keberhasilan tahap PCR. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi. Konsentrasi DNA *template* yang digunakan dalam tahap PCR sebesar 30 ng/ μ l (Sidiq, 2019). Optimasi suhu *annealing* dilakukan pada tiap primer ISSR dengan program PCR *gradient*. Suhu *annealing* primer ISSR5 optimal adalah suhu 44,1°C. Pada suhu tersebut, dihasilkan alel amplifikasi yang jelas dan tidak *smear* (Gambar 4.2.). Suhu optimal primer ISSR1 48,4°C, ISSR2 36,7°C, ISSR4 47,3°C, PKBT8 53,7°C, PKBT9 50,9°C, PKBT12 44,9°C.



Gambar 4.2 Elektroforegram optimasi suhu *annealing* primer ISSR5 dengan suhu 35°C; 37,3°C; 39,6°C; 41,9°C; 44,1°C; 46,4°C; 48,7°C; 51°C .

4.1.3. Hasil Keanekaragaman Genetik dan Identitas Durian Unggul Pulau

Kundur

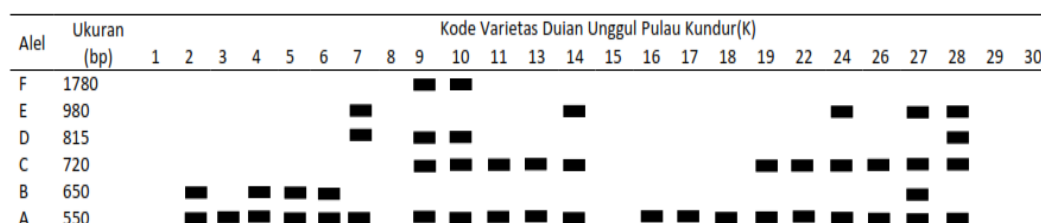
Keanekaragaman genetik dianalisis melalui jumlah alel hasil amplifikasi, frekuensi alel, adanya alel spesifik, nilai PIC, matriks kemiripan, dan dendogram. Identitas durian unggul Pulau Kundur dianalisis melalui alel spesifik dan profil alel. Hasil amplifikasi melalui PCR dielektroforesis pada gel agarose 2% selama 1 jam dengan voltase 75V. Amplifikasi DNA menggunakan primer ISSR1, ISSR2, ISSR4, ISSR5, PKBT8, PKBT9, dan PKBT12 menghasilkan ukuran alel bervariasi (Tabel 4.2) dan profil alel tertentu. Proyeksi visualisasi alel hasil amplifikasi primer ISSR1 disajikan pada Gambar 4.3., ISSR2 disajikan pada Gambar 4.4., ISSR4 disajikan pada Gambar 4.5., ISSR5 disajikan pada Gambar 4.6., PKBT8 disajikan pada Gambar 4.7., PKBT9 disajikan pada Gambar 4.8., dan PKBT12 disajikan pada Gambar 4.9.

Tabel 4.2. Ukuran hasil amplifikasi DNA menggunakan primer ISSR1, ISSR2, ISSR4, ISSR5, PKBT8, PKBT9, dan PKBT12.

No	Nama Primer	Ukuran (bp)
1.	ISSR1	260, 310, 400, 500, 700, 820, 890, 930, 980
2.	ISSR2	470, 525, 610, 700, 850, 1200, 1350, 1500.
3.	ISSR4	550, 650, 720. 815, 980, 1780.
4.	ISSR5	330, 575, 670, 775, 880, 1100, 1250.
5.	PKBT8	450, 525, 560, 625, 670, 820, 900, 1200
6.	PKBT9	290, 450, 540, 630, 700, 720, 800, 875, 980, 1500
7.	PKBT12	520, 620, 790, 1050, 1200, 1500

Ukuran alel hasil amplifikasi menggunakan primer ISSR dan PKBT bervariasi. Ketujuh primer ISSR menghasilkan alel berukuran 260-1780 bp. Primer ISSR1 menghasilkan 9 alel berukuran 260-980 bp. Primer ISSR2 menghasilkan 8 alel berukuran 470-1500 bp. Primer ISSR4 menghasilkan 6 alel berukuran 550-1780 bp. Primer ISSR5 menghasilkan 7 alel berukuran 330-1250

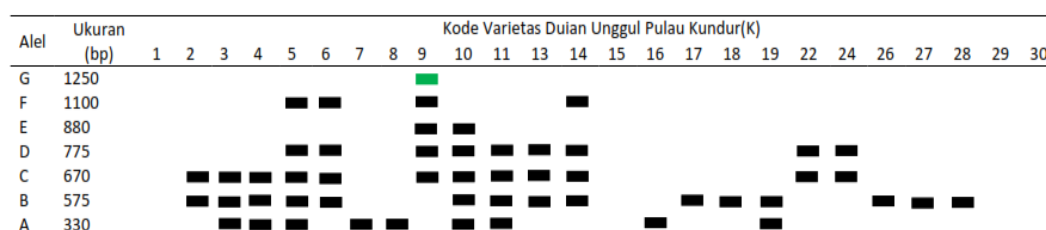
dan varietas Te Lo Kha (K9) dengan Layang (K30). Selain keempat varietas tersebut, profil alel setiap varietas berbeda. Angbak Kia 11 (K4) memiliki alel terbanyak sebesar 6 alel, sedangkan Empe (K26) dan Layang (K30) memiliki jumlah alel terendah sebesar 1 alel. Pada varietas Angbak Ouhut (K8), Tongkat (K15), Jongkong (K19), Tawa (K22), dan Pekan (K29) tidak terbentuk alel. Primer ISSR2 memiliki rata-rata alel 2,6 dan jumlah alel 8. Pada primer ISSR2 ditemukan alel spesifik ukuran 470 bp pada Durian Sumbat (K24).



Gambar 4.5. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR4

Keterangan: ■ = alel yang terdeteksi

Primer ISSR4 menghasilkan 6 alel berukuran 550-1780 bp (Gambar 4.5.). Varietas Te Lo Kha (K9) dan Phang Jing Lien (K10) memiliki profil alel yang sama dan jumlah alel terbanyak yaitu 4 alel. Profil alel yang sama ditemukan pada varietas HM (K11), Pondok (K13), Jongkong (K19), Moncong (K22), dan Empe (K26); Cuhut (K2), Angbak Kia 11 (K4), Angbak Kia 03 (K5), dan Huang Kwue Niam (K6); GT (K14) dan Sumbat (K24). Jumlah alel terendah (1 alel) dihasilkan oleh Angbak Tolo (K3), TR (K16), Asapan (K17), dan Mas Pear (K18). Keempat durian tersebut juga memiliki alel dengan profil sama. Pada varietas GSG (K1), Angbak Ouhut (K8), Tongkat (K15), Pekan (K29), dan Layang (K30) tidak terbentuk alel. Profil alel unik ditemukan pada varietas Pheng Kwai (K7), Milah (K27), dan Tiaulo Angibak (K28).

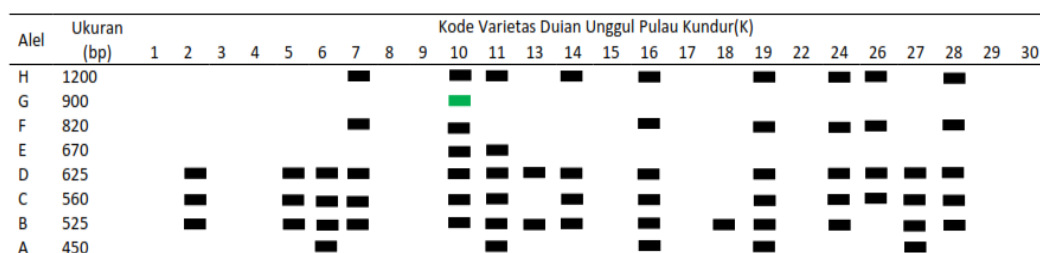


Gambar 4.6. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR5

Keterangan: ■ = alel yang terdeteksi ■ = alel spesifik

Primer ISSR5 menghasilkan alel berukuran 330-1250 bp. Jumlah rata-rata alel 2,08 dengan alel terbanyak berjumlah 5. Profil alel sama ditemukan pada

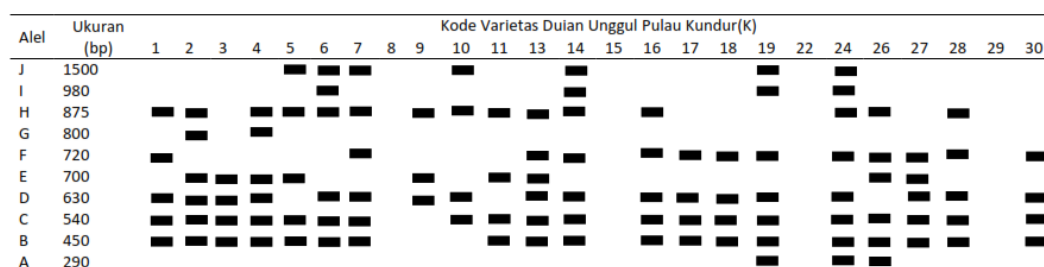
varietas Asapan (K17), Mas Pear (K18), Empe (K26), Milah (K27), dan Tiaulo Angibak (K28); Pheng Kwai (K7) dan Angbak Ouhut (K8), dan TR (K16); Angbak Tolo (K3) dan Angbak Kia 11 (K4); Moncong (K22) dan Sumbat (K24); Huang Kwue Niam (K6) dan GT (K14). Pada primer ISSR5, ditemukan alel spesifik pada varietas Te Lo Kha (K9) berukuran 1250 bp. Varietas GSG (K1), Tongkat (K5), Pekan (K29), dan Layang (K30) tidak terbentuk alel. Profil alel unik ditemukan pada varietas Cuhut (K2), Angbak Kia 03 (K5), Te Lo Kha (K9), Phang Jing Lien (K10), HM (K11), Pondok (K13), dan Jongkong (K19).



Gambar 4.7. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer PKBT8

Keterangan: ■ = alel yang terdeteksi ■ = alel spesifik

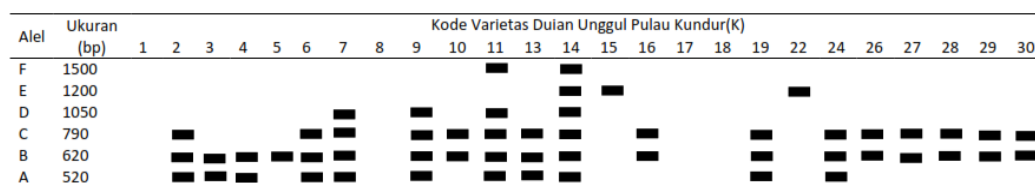
DNA genom yang diamplifikasi menggunakan primer PKBT8 menghasilkan alel berukuran 450-1200 bp dengan rata-rata jumlah alel 2,6 dan jumlah alel tertinggi 7 dimiliki oleh Durian Phang Jing Lien (K10). Varietas tersebut memiliki alel spesifik berukuran 900 bp. Profil alel sama dihasilkan oleh varietas Pheng Kwai (K7), Sumbat (K24), dan Tiaulo Angibak (K28); TR (K16) dan Jongkong (K19); Cuhut (K2) dan Angbak Kia 03 (K5). Profil alel unik ditemukan pada varietas Huang Kwue Niam (K6), Phang Jing Lien (K10), HM (K11), Pondok (K13), GT (K14), Mas Pear (K18), dan Empe (K26). Beberapa varietas seperti GSG (K1), Angbak Tolo (K3), Angbak Kia 11 (K4), Angbak Ouhut (K8), Te Lo Kha (K9), Tongkat (K15), Asapan (K17), Moncong (K22), Pekan (K29), dan Layang (K30) tidak terbentuk alel.



Gambar 4.8. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer PKBT9

Keterangan: ■ = alel yang terdeteksi

Primer PKBT9 menghasilkan 10 alel dengan rata-rata paling tinggi diantara primer lain yaitu 4,4 yang berukuran 290 – 1500 bp. Jumlah alel terbanyak dimiliki oleh Durian Sumbat (K24) dengan jumlah alel 8. Profil alel sama ditemukan pada varietas Cuhut (K2) dan Angbak Kia 11 (K4); GSG (K1), TR (K16), dan Tiaulo Angibak (K28); Asapan (K17), Mas Pear (K18), dan Layang (K30). Namun, pada varietas Angbak Ouhut (K8), Tongkat (K15), Moncong (K22), dan Pekan (K29) tidak ditemukan alel. Profil alel unik ditemukan pada varietas Angbak Tolo (K3), Angbak Kia 03 (K5), Huang Kwue Niam (K6), Pheng Kwai (K7), Te Lo Kha (K9), Phang Jig Lien (K10), HM (K11), Pondok (K13), GT (K14), Jongkong (K19), Sumbat (K24), Empe (K26), dan Milah (K27).



Gambar 4.9. Proyeksi Visualisasi Alel Hasil Amplifikasi Primer PKBT12

Keterangan: ■ = alel yang terdeteksi

Pada primer PKBT12 terbentuk 6 alel berukuran 520-1500 bp dengan rata-rata jumlah alel 2,24. Jumlah alel tertinggi dimiliki oleh Durian GT (K14) sebanyak 6 alel. Beberapa varietas memiliki profil alel sama, yaitu pada varietas Angbak Tolo (K3) dan Angbak Kia 11 (K4); Pheng Kwai (K7) dan Te Lo Kha (K9); Tongkat (K15) dan Moncong (K22); Phang Jig Lien (K10), TR (K16), Empe (K26), Milah (K27), Tiaulo Angibak (K28), Pekan (K29), dan Layang (K30); Cuhut (K2), Huang Kwue Niam (K6), Pondok (K13), Jongkong (K19), dan Sumbat (K24). Varietas GSG (K1), Angbak Ouhut (K8), Asapan (K17), dan Mas Pear (K18) tidak ditemukan alel. Beberapa varietas memiliki profil alel yang unik. Varietas Angbak Kia 03 hanya memiliki satu alel berukuran 620 bp. Profil alel varietas HM (K11) dan GT (K14) juga memiliki profil alel yang unik.

Rekapitulasi alel hasil amplifikasi seluruh primer disajikan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Hasil Amplifikasi Primer ISSR2, ISSR4, ISSR5, PKBT8, PKBT9, dan PKBT12 pada 25 Varietas Durian Unggul Pulau Kundur

Primer	Jumlah Alel	Total Jumlah Alel Polimorfik	Total Jumlah Alel Monomorfik	Presentase Alel
				Polimorfik (%)
ISSR1	9	8	1	88,9
ISSR2	8	7	1	87,5
ISSR4	6	6	0	100
ISSR5	7	6	1	85,7
PKBT8	8	7	1	87,5
PKBT9	10	10	0	100
PKBT12	6	6	0	100
Total	54	50	4	
Rata-rata	7,7	7,1	0,6	92,8

DNA durian Pulau Kundur berhasil diamplifikasi menggunakan primer tertentu dengan jumlah alel 6-10, total alel 54 dan rata-rata alel 7,7. Primer ISSR4, PKBT9, dan PKBT12 menghasilkan alel 100% polimorfik. Primer ISSR1, ISSR2, ISSR5, dan PKBT8 masing-masing menghasilkan 1 alel monomorfik.

Amplifikasi DNA 25 varietas durian unggul Pulau Kundur menggunakan primer ISSR1, ISSR2, ISSR5, dan PKBT8 menghasilkan alel spesifik pada beberapa varietas. Alel spesifik dapat menjadi ciri khas varietas karena alel spesifik hanya muncul pada satu varietas saja. Primer ISSR1, ISSR2, ISSR5, dan PKBT8 masing – masing memiliki 1 alel spesifik (Tabel 4.4).

Tabel 4.4. Rekapitulasi Alel Spesifik pada Beberapa Varietas Durian Unggul Pulau Kundur

Nama Varietas	Kode Varietas	Ukuran Alel (bp)			
		ISSR1	ISSR2	ISSR5	PKBT8
Durian GT	14	930			
Durian Sumbat	24		470		
Durian Te Lo Kha	9			1250	
Durian Phang Jing Lien	10				900

Parameter lain yang digunakan untuk mengungkap keanekaragaman durian adalah nilai PIC. Frekuensi alel dihitung untuk menganalisis nilai PIC. Frekuensi alel pada primer yang digunakan berkisar antara 0,04 (ISSR1, ISSR2, ISSR5, PKBT9) sampai 0,800 (ISSR1 & ISSR4). Rata-rata frekuensi alel tiap primer memiliki rentang 0,227-0,367. Nilai PIC ketujuh primer bervariasi dengan

rentang 0,251-0,379. Hasil analisis frekuensi alel dan PIC disajikan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5. Hasil Analisis Frekuensi Alel dan *Polymorphisms Information Content* (PIC)

Primer	Frekuensi Alel	Rata-rata Frekuensi Alel	PIC
ISSR1	0,040-0,800	0,227	0,251
ISSR2	0,040-0,640	0,325	0,379
ISSR4	0,080-0,800	0,313	0,311
ISSR5	0,040-0,640	0,297	0,329
PKBT8	0,080-0,560	0,287	0,350
PKBT9	0,040-0,560	0,325	0,362
PKBT12	0,080-0,760	0,367	0,324

Keanekearagaman genetik juga dianalisis melalui matriks kemiripan dan dendogram. Hasil analisis matriks kemiripan dan dendogram disajikan berturut-turut pada Gambar 4.10 dan Gambar 4.11.

	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K13	K14	K15	K16	K17	K18	K19	K22	K24	K26	K27	K28	K29	K30
K1	1.000																								
K2	0.485	1.000																							
K3	0.538	0.649	1.000																						
K4	0.625	0.744	0.833	1.000																					
K5	0.438	0.698	0.611	0.667	1.000																				
K6	0.412	0.756	0.632	0.636	0.727	1.000																			
K7	0.579	0.653	0.524	0.583	0.583	0.600	1.000																		
K8	0.154	0.083	0.235	0.174	0.174	0.080	0.138	1.000																	
K9	0.303	0.545	0.486	0.465	0.419	0.578	0.490	0.083	1.000																
K10	0.293	0.538	0.489	0.471	0.627	0.642	0.632	0.125	0.577	1.000															
K11	0.341	0.654	0.622	0.588	0.667	0.679	0.667	0.125	0.538	0.767	1.000														
K13	0.412	0.711	0.579	0.545	0.591	0.652	0.560	0.080	0.667	0.679	0.717	1.000													
K14	0.455	0.618	0.542	0.556	0.593	0.750	0.733	0.057	0.618	0.635	0.730	0.679	1.000												
K15	0.143	0.080	0.111	0.083	0.083	0.077	0.067	0.400	0.160	0.061	0.061	0.077	0.111	1.000											
K16	0.438	0.605	0.444	0.429	0.476	0.591	0.708	0.174	0.512	0.627	0.627	0.682	0.593	0.167	1.000										
K17	0.600	0.452	0.583	0.467	0.333	0.438	0.389	0.182	0.387	0.359	0.359	0.563	0.381	0.167	0.533	1.000									
K18	0.609	0.471	0.593	0.485	0.485	0.457	0.462	0.143	0.353	0.429	0.476	0.571	0.444	0.133	0.545	0.857	1.000								
K19	0.286	0.522	0.462	0.444	0.489	0.638	0.667	0.154	0.478	0.593	0.593	0.596	0.632	0.148	0.756	0.424	0.444	1.000							
K22	0.000	0.148	0.200	0.154	0.231	0.214	0.063	0.000	0.296	0.229	0.229	0.286	0.263	0.250	0.077	0.143	0.118	0.138	1.000						
K24	0.474	0.612	0.429	0.500	0.583	0.640	0.741	0.069	0.490	0.561	0.561	0.640	0.767	0.067	0.625	0.333	0.410	0.706	0.250	1.000					
K26	0.370	0.579	0.387	0.432	0.541	0.462	0.558	0.000	0.368	0.522	0.522	0.564	0.490	0.000	0.595	0.400	0.429	0.650	0.190	0.651	1.000				
K27	0.452	0.714	0.514	0.537	0.634	0.605	0.596	0.091	0.429	0.440	0.560	0.651	0.604	0.087	0.634	0.483	0.563	0.636	0.160	0.681	0.667	1.000			
K28	0.563	0.651	0.500	0.524	0.571	0.591	0.792	0.000	0.465	0.627	0.588	0.591	0.667	0.000	0.667	0.467	0.545	0.622	0.154	0.708	0.757	0.732	1.000		
K29	0.000	0.167	0.118	0.087	0.087	0.160	0.138	0.000	0.167	0.125	0.125	0.160	0.114	0.000	0.174	0.000	0.000	0.154	0.000	0.138	0.222	0.182	0.174	1.000	
K30	0.556	0.414	0.455	0.357	0.214	0.400	0.412	0.000	0.345	0.270	0.270	0.467	0.350	0.000	0.500	0.625	0.526	0.387	0.000	0.353	0.435	0.444	0.500	0.444	1.000

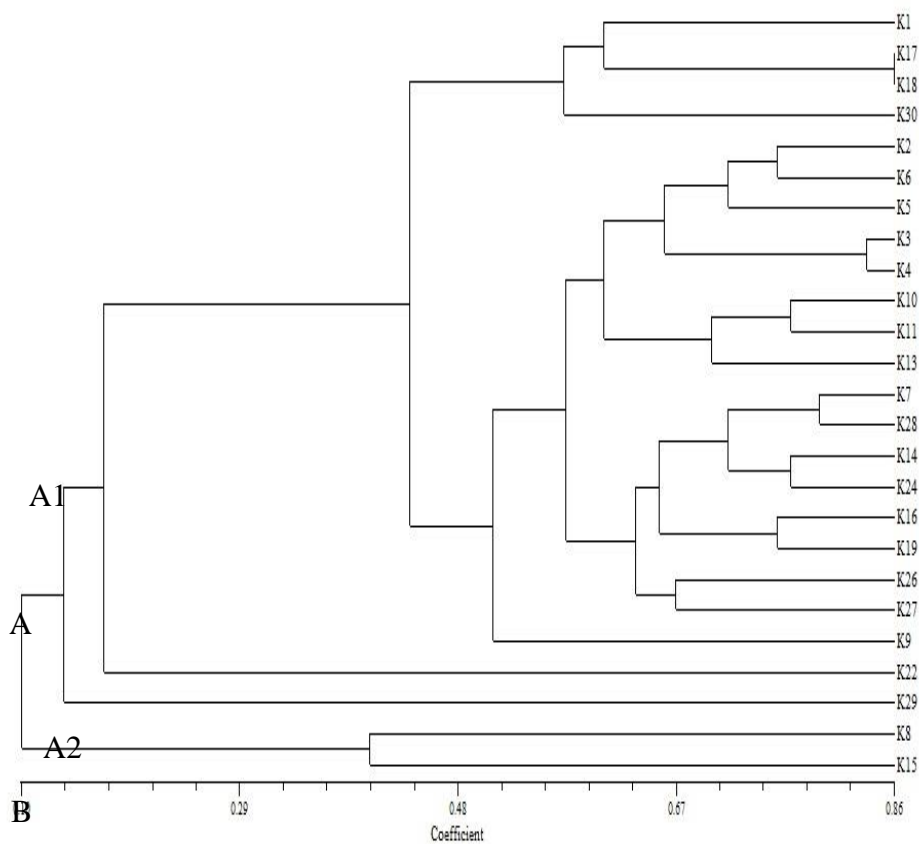
Gambar 4.10. Matriks Kemiripan durian unggul Pulau Kundur

Varietas Asapan (K17) dengan varietas Mas Pear (K18) memiliki koefisien matriks kemiripan paling tinggi sebesar 0,857. Koefisien matriks kemiripan terendah sebesar 0,000 dimiliki oleh varietas GSG (K1) dengan varietas Moncong (K22) dan varietas Pekan (K29); varietas Angbak Ouhut (K8) dengan

varietas Moncong (K22), varietas Empe (K26), varietas Tiaulo Angibak (K28), varietas Pekan (K29), dan varietas Layang (K30); varietas Tongkat (K15) dengan varietas Empe (K26), varietas Tiaulo Angibak (K28), varietas Pekan (K29), dan varietas Layang (K30); varietas Asapan (K17) dengan varietas Pekan (K29); varietas Mas Pear (K18) dengan varietas Pekan (K29); varietas Moncong (K22) dengan varietas Pekan (K29) dan varietas Layang (K30).

Hasil analisis kemiripan berdasarkan data amplifikasi 25 varietas durian unggul Pulau Kundur menggunakan primer tujuh ISSR menunjukkan nilai 0,1 hingga 0,86. Data ini menunjukkan bahwa keanekaragaman 25 varietas durian unggul Pulau Kundur sebesar 14-100%. Hal ini berarti bahwa tidak ada varietas durian yang sinonim.

Koefisien matriks kemiripan menunjukkan tingkat kekerabatan antar dua varietas. Koefisien matriks kemiripan tinggi menunjukkan bahwa kekerabatan antar dua varietas tinggi, sebaliknya koefisien matriks kemiripan rendah menunjukkan bahwa antar dua varietas tidak memiliki kedekatan.



Gambar 4.11. Dendrogram Durian Unggul Pulau Kundur Berdasarkan 7 Primer ISSR

Hasil analisis pengelompokkan berupa dendogram terbagi menjadi dua klaster, klaster A dan B pada koefisien kemiripan 0,1. Klaster A terbagi menjadi dua subklaster, A1 terdiri atas 23 varietas dan A2 terdiri atas 1 varietas yaitu durian Pekan (K29). Klaster B terdiri atas 2 varietas yaitu Durian Angbak Ouhut (K8) dan Durian Tongkat (K15). Durian Asapan (K17) dan Durian Mas Pear (K18) dengan koefisien kemiripan tertinggi sebesar 0,85.

4.2. Bahasan

4.2.1. Bahasan Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolasi DNA Genom

Kualitas pita DNA genom menunjukkan pita jelas, tipis, tebal, namun beberapa ada yang *smear*. *Smear* menunjukkan bahwa DNA sudah tidak utuh lagi atau terpotong akibat aktivitas enzim endonuklease (Pharmawati, 2009). DNA yang tidak utuh dapat menghambat reaksi PCR karena primer tidak dapat menempel pada tahap *annealing* (Sambrook&Russel, 2001, Sari&Murti, 2015). Namun, pita DNA genom yang tebal, jelas, dan sedikit *smear* masih dapat digunakan sebagai *template* untuk PCR. *Smear* menunjukkan adanya molekul yang memiliki berat bervariasi sebagai hasil degradasi DNA, seperti polisakarida dan fenol (Prayitno & Nuryandani, 2011, Handayani *et al.*, 2016). Polisakarida dan fenol disebabkan oleh ketidaksempurnaan metode isolasi.

Modifikasi metode isolasi DNA dilakukan untuk meminimalkan jumlah kontaminan. Modifikasi dilakukan dengan menambahkan bahan-bahan kimia atau proses tertentu dalam isolasi DNA. Tahap ekstraksi DNA dilakukan penambahan PVP 1% bertujuan menekan oksidasi polifenol dengan cara mereduksi senyawa fenolik yang dapat mengkontaminasi DNA (Syafaruddin&Santoso, 2011). Konsentrasi beta-mercaptoethanol lebih 0,3%, lebih tinggi daripada Vanijajiva (2012). Fungsi beta-mercaptoethanol sama dengan PVP yaitu menghilangkan polifenol. Selain bahan-bahan yang digunakan pada tahap metode isolasi, teknik isolasi juga dapat mempengaruhi kualitas DNA.

Ada beberapa teknik yang diperhatikan dalam mengisolasi DNA yaitu saat penghancuran sampel, pengaturan temperatur inkubasi, dan teknik ketika mengambil supernatan. Penghancuran sampel yang tidak sempurna menyebabkan dinding sel masih utuh sehingga DNA masih ada di dalam sel. Penghancuran sampel dimodifikasi dengan penambahan nitrogen cair. Langkah ini efektif dalam

pelilisan dinding sel (Sundari, 2017). Nitrogen cair juga berfungsi untuk melindungi DNA dari degradasi enzim DNase (Syafaruddin *et al.*, 2011). Penghancuran sel dan kerusakan RNA yang tidak maksimal kemungkinan disebabkan oleh temperature inkubasi yang kurang tepat sehingga berpengaruh terhadap kualitas DNA. Pengambilan supernatan juga menjadi salah satu teknik yang harus diperhatikan dalam metode ekstraksi DNA. Lapisan di bawah supernatan yaitu lapisan *interfase* dan lapisan organik. Jika lapisan di bawah supernatan terambil, maka dapat mempengaruhi kualitas DNA.

Hasil uji kuantitas pita DNA genom menunjukkan kemurnian dan konsentrasi yang berbeda-beda. Nilai kemurnian didapat berdasarkan nilai absorbansi $\lambda 260/\lambda 280$ nm (Sundari, 2017). DNA dapat menyerap sinar UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan, seperti protein dapat menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 280 nm. Nilai kemurnian DNA genom pada hasil penelitian ini berkisar 0,993-1,993. Nilai ini dikategorikan sebagai nilai kemurnian yang baik. Sambrook & Russel (2001) menyatakan bahwa kemurnian DNA genom yang baik berkisar antara 1,8-2,0. Kemurnian DNA rendah ($<1,8$) disebabkan tingginya kontaminan seperti fenol, protein, polisakarida, dan lendir.

Kemurnian dan konsentrasi DNA menjadi faktor penting dalam tahap PCR (Pharmawati, 2009). Konsentrasi DNA genom dalam penelitian ini bernilai 42-190,050 ng/ μ l. Konsentrasi terlalu tinggi atau rendah dapat menyebabkan kemungkinan primer menempel pada DNA juga rendah. Konsentrasi optimal untuk PCR adalah 30 ng/ μ l (Sidiq, 2019).

Faktor yang dapat mempengaruhi kemurnian dan konsentrasi DNA adalah massa dan usia sampel. Massa sampel yang terlalu tinggi kemungkinan menghasilkan kontaminan yang tinggi. Usia sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda dengan tujuan meminimalkan konsentrasi kontaminan yang terkandung di dalamnya. DNA genom yang kemurniannya kurang baik masih dapat digunakan sebagai *template* pada reaksi PCR. Hal ini dikarenakan kebutuhan DNA dalam analisis keanekaragaman genetik dengan penanda ISSR sedikit.

4.2.2. Bahasan Optimasi PCR-ISSR

Salah satu penentu keberhasilan proses PCR adalah suhu *annealing* yang optimal (Rychlik *et al*, 1990; Lorenz, 2012; Kurniawati & Hartati, 2018). Suhu *annealing* optimal pada ketujuh primer ISSR berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh *temperature melting* (TM) pada tiap primer juga berbeda. TM merupakan suhu yang dibutuhkan untuk melepas 50% untai DNA (Handoyo & Rudiretna, 2001). Primer ISSR2 memiliki TM dan *suhu annealing* terendah. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kandungan basa Guanin (G) dan Cytosin (C) paling rendah di antara primer yang lain. Ikatan hidrogen pada pasangan G dan C lebih banyak daripada pasangan Adenin (A) dan Timin (T). kondisi ini membutuhkan suhu lebih tinggi untuk menguraikannya, sebaliknya jika kandungan G dan C sedikit, maka dibutuhkan suhu rendah untuk menguraikannya.

Suhu *annealing* terlalu rendah dapat mengakibatkan primer menempel tidak spesifik pada DNA target, sedangkan suhu *annealing* terlalu tinggi dapat berakibat pada tidak menempelnya suatu primer. Suhu *annealing* paling optimal dipilih berdasarkan suhu tertinggi yang dapat menghasilkan pita paling tebal dan jelas pada hasil elektroforesis. Pita paling tebal dan jelas menunjukkan berhasilnya suatu primer dalam mengamplifikasi DNA.

4.2.3. Bahasan Keanekaragaman Genetik dan Identitas Durian Unggul Pulau Kundur

Jumlah dan rentang ukuran alel hasil amplifikasi berbeda setiap primernya. Rentang alel yang dihasilkan dalam penelitian ini berukuran 260-1780 bp. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Ng dan Tan (2015) bahwa produk primer ISSR berukuran 250-2000 bp. Penempelan primer pada daerah *template* DNA akan mempengaruhi jumlah alel yang dihasilkan. Makin banyak daerah penempelan primer yang digunakan, makin banyak jumlah alel yang dihasilkan (Poerba & Yuzammi, 2008). Perbedaan kualitas pita hasil amplifikasi menunjukkan perbedaan intensitas penempelan primer pada DNA *template*. Kualitas pita yang tebal mengindikasikan bahwa banyak fragmen yang teramplifikasi di daerah tersebut, sedangkan pita tipis mengindikasikan bahwa fragmen yang teramplifikasi sedikit.

Jumlah alel yang dihasilkan oleh primer ISSR 1 dan ISSR 5 pada sampel penelitian ini lebih tinggi daripada hasil penelitian Vanijajiva, 2012 pada primer

yang sama. Pada hasil penelitian Vanijajiva (2012), primer ISSR 1 menghasilkan 6 alel berukuran 150-450 bp dan primer ISSR 5 menghasilkan 5 alel berukuran 200-750 bp pada 14 kultivar durian Provinsi Nonthaburi, Thailand. Jumlah alel yang lebih tinggi pada durian Pulau Kundur menunjukkan adanya alel yang tidak ditemukan pada durian Provinsi Nonthaburi, Thailand sehingga keanekaragaman genetik durian unggul Pulau Kundur lebih tinggi.

Primer ISSR 4, PKBT8, dan PKBT12 pada sampel penelitian ini menghasilkan jumlah alel yang lebih rendah dibandingkan pada 60 sampel Durian Tengkurak, Kalimantan Barat dengan primer yang sama (Riupassa *et al.*, 2015). Hal ini dimungkinkan karena Kalimantan merupakan pusat keanekaragaman durian di Indonesia (Uji, 2005) dan sampel yang dianalisis pada penelitian Riupassa *et al.* (2015) lebih banyak daripada sampel durian unggul Pulau Kundur. Makin banyak sampel yang digunakan, makin banyak kemungkinan ditemukannya alel (Retnoningsih *et al.*, 2010, Retnoningsih *et al.*, 2011).

Alel yang berhasil diamplifikasi menunjukkan ukuran dan jumlah alel yang berbeda pada setiap primernya. Hal ini disebabkan oleh perbedaan situs penempelan primer pada DNA sampel (Syahrudin, 2012). Profil yang ditemukan pada tiap primer menjadi acuan untuk membedakan antar varietas.

Alel berukuran 260 bp pada primer ISSR1 tidak ditemukan pada 5 varietas. Kelima varietas tersebut berasal dari Kecamatan Kundur. Berdasarkan ciri morfologi, kelima varietas tersebut memiliki kesamaan pada bentuk kelopak bunga bulat lonjong, mahkota bunga putih, pembentukan bunga terjadi pada waktu tidak beraturan, panjang pangkal tangkai buah berukuran 4,1-8 cm, ketebalan kulit buah sedang, intensitas warna kulit buah cerah, panjang biji berukuran 2 cm, lebar biji berukuran 2 cm, dan tebal biji berukuran 2 cm 2 cm (Habibah *et al.*, 2019).

Durian Pekan (K29) hanya berhasil diamplifikasi dengan primer PKBT12. Pada keenam primer yang lain, varietas ini tidak teramplifikasi atau tidak terbentuk pita amplikon. Hal ini dimungkinkan tidak adanya situs penempelan primer pada DNA varietas durian Pekan (K29).

Pada Primer ISSR4 ditemukan profil alel mirip tiap varietas. Hampir semua varietas memiliki alel berukuran 550 bp. Varietas Te Lo Kha (K9) dan

Phang Jing Lien (K10) memiliki profil alel sama. Kedua varietas tersebut memiliki kesamaan ciri morfologi daun, bunga, dan buah. Kesamaan ciri morfologi antara Te Lo Kha dan Phang Jing Lien adalah bentuk ujung daun meruncing panjang, bentuk kuncup daun bulat terlur, jumlah mahkota 5, warna mahkota kuning, warna tepi mahkota hijau, pertama kali berbuah pada usia 5 tahun, lama bakal buah sampai matang 100 hari, pembentukan bunga terjadi pada tiap tahun, pelengkap tangkai buah kuat, warna tangkai buah cokelat, ketebalan kulit buah sedang, warna kulit buah hijau kecoklatan, ketebalan arillus lebih dari 2 cm, tekstur tidak berair dan tidak berserat, aroma daging buah kuat, daging buah berwarna kuning lemon, panjang biji 3,5 cm, lebar biji 2 cm, dan warna mantel biji coklat (Habibah *et al.*, 2019).

Pada primer PKBT12 ditemukan profil alel sama pada varietas Phang Jing Lien (K10), TR (K16), Empe (K26), Milah (K27), Tiaulo Angibak (K28), Pekan (K29), dan Layang (K30). Varietas K10 dan K16 berasal dari Kecamatan Kundur Barat, sedangkan varietas K26, K27, K28, K29, K30 berasal dari Kecamatan Kundur. Profil pita sama diduga bahwa riwayat persilangan varietas tersebut berasal dari tetua yang sama.

Identitas varietas dapat ditentukan dari adanya alel spesifik. Adanya alel spesifik dimungkinkan ada ciri morfologi yang unik. Hal ini dikarenakan penanda molekuler seringkali terdapat di dekat gen. durian yang memiliki alel spesifik ternyata memiliki ciri morfologi unik dibanding varietas lain. Durian GT (K14) memiliki alel spesifik dengan ukuran 930 bp pada primer ISSR1. Ciri unik morfologi durian GT (K14) adalah memiliki waktu pertama kali berbuah paling lama dibanding varietas lain yakni ketika usia 15 tahun. Dibandingkan dengan varietas lain, durian Sumbat (K24) merupakan durian terpanjang, berdiameter terbesar, dan memiliki buah paling berat. Bentuk ujung buah durian Te Lo Kha (K9) paling unik dibanding varietas lain, yakni seperti payudara. Durian Phang Jing Lien (K30) memiliki bentuk mahkota setengah lingkaran. Bentuk ini berbeda dari varietas lain (Habibah *et al.*, 2019).

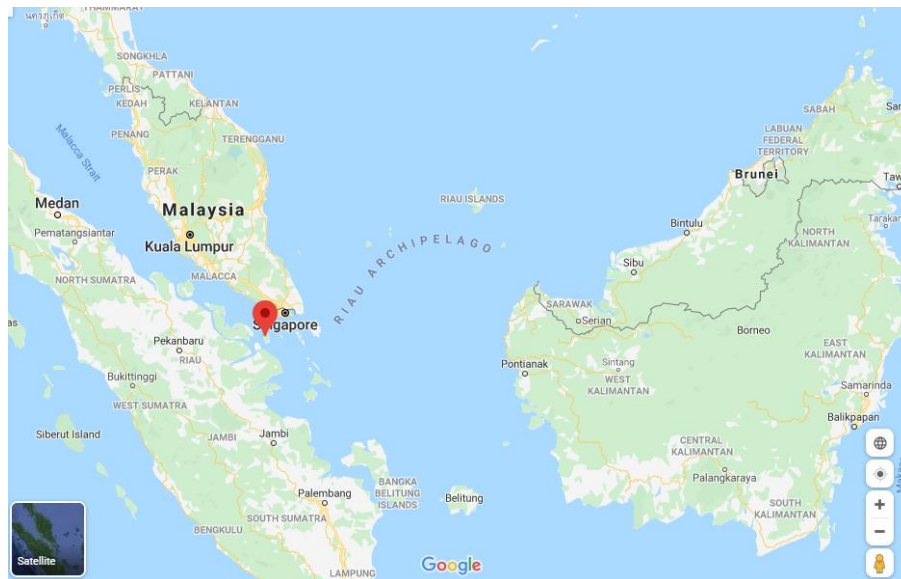
Adanya alel spesifik berpotensi untuk digunakan sebagai penanda akurat dan stabil terutama untuk kepastian varietas yang punya alel spesifik. Hal ini bermanfaat untuk pengembangan produksi tanaman durian Alel spesifik di sebuah

primer memiliki peluang untuk digunakan pada varietas durian yang akan diproduksi secara komersial (Riupassa *et al.*, 2016). Alel spesifik juga dapat digunakan untuk mengembangkan penanda *Sequence Characterized Amplified Region* (SCAR) untuk identitas molekuler tingkat varietas (Cui *et al.*, 2016).

Durian Tengkurak (*D. tanzungpurensis*) memiliki alel spesifik berukuran 1500 bp pada primer PKBT12 (Riupassa *et al.*, 2016). Alel berukuran 1500 bp pada primer PKBT12 juga ditemukan hanya pada 2 sampel penelitian ini yaitu varietas HM (K11) dan GT (K14). Profil alel kedua varietas ini lebih unik dibandingkan dengan varietas lain pada primer yang sama.

Solikin *et al.* (2017) juga menemukan alel spesifik pada beberapa varietas durian koleksi Hortimart Agro Centre. Durian Petruk memiliki alel spesifik berukuran 450 bp pada primer PKBT2 dan 700 bp pada primer PKBT9, alel spesifik durian Ontoseno pada primer PKBT3 berukuran 900 bp, durian Semar memiliki alel spesifik berukuran 400 bp pada primer PKBT3, durian Arjuno memiliki alel spesifik berukuran 875 bp pada primer PKBT8 dan durian Gondomono memiliki alel spesifik berukuran 750 bp pada primer PKBT8. Alel spesifik durian koleksi Hortimart Agro Centre berbeda dengan alel spesifik pada durian Pulau Kundur.

Profil alel yang berbeda merupakan salah satu indikator yang menunjukkan keanekaragaman genetik. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan letak geografis. Berdasarkan geografisnya, letak Pulau Kundur berdekatan dengan Pulau Sumatera, Pulau Kalimantan, Singapura, dan Malaysia (Gambar 4.12.). Hal ini memungkinkan pertukaran sumber daya genetik durian dari dalam atau luar Pulau Kundur melalui aktivitas manusia yang membawa durian asing ke Pulau Kundur. Manusia seringkali menggunakan biji dari durian unggul untuk diperbanyak dengan harapan dapat memperoleh kualitas yang unggul pula.



Gambar 4.12. Peta Pulau Kundur, Malaysia, Sumatera, Singapore, Kalimantan dengan Rasio 1:200km

Keterangan:  = Pulau Kundur

Keanekaragaman genetik dapat dilihat dari presentase alel polimorfik. Penanda ISSR menghasilkan alel polimorfik dengan jumlah tinggi (Due *et al.*, 2019; Siew *et al.*, 2018). Polimorfisme pada penanda ISSR dapat disebabkan oleh mutasi pada daerah penempelan primer atau pada daerah mikrosatelit (Wang, 2010). Polimorfisme membuktikan bahwa penanda ISSR merupakan penanda molekuler yang memiliki reproduksibilitas yang tinggi dibandingkan dengan penanda RAPD. Hal tersebut dikarenakan primer ISSR berukuran lebih panjang daripada primer RAPD (Cui *et al.*, 2016). Makin tinggi alel polimorfik, makin tinggi tingkat keanekaragaman genetiknya.

Analisis keanekaragaman genetik pada 124 durian Malaysia menggunakan 2 primer ISSR menunjukkan hasil lebih rendah daripada keanekaragaman genetik 25 durian unggul Pulau Kundur yakni sebesar 91,73% (Siew *et al.*, 2018). Hasil serupa dilaporkan oleh Vanijajiva (2012) bahwa persentase alel polimorfik pada 14 varietas durian Thailand lebih rendah daripada durian unggul Pulau Kundur yakni sebesar 38%. Hal tersebut berarti bahwa keanekaragaman durian Pulau Kundur lebih tinggi daripada Malaysia dan Thailand. Persentase alel polimorfisme kurang dari 15% dikategorikan memiliki tingkat keanekaragaman genetik rendah (Dasgupta *et al.*, 2017), sedangkan presentase alel polimorfisme 62,3% pada 333

sampel menggunakan tujuh primer dikategorikan memiliki tingkat keanekaragaman genetik tinggi (Carrasco *et al.*, 2009).

Nilai PIC terendah terdapat pada primer ISSR1 senilai 0,251, sedangkan nilai PIC tertinggi terdapat pada primer ISSR2 yakni sebesar 0,379. Nilai ini lebih rendah dibandingkan nilai PIC pada penanda molekuler mikrosatelit (Sidiq, 2019). Hal ini disebabkan karena ISSR merupakan penanda dominan yang hanya merepresentasikan 2 alel (dominan homozigot dan dominan heterozigot) dalam satu lokus. Nilai PIC menggambarkan kemampuan penanda molekuler untuk mengungkap polimorfisme alel dan keanekaragaman. Oleh karena itu, nilai PIC dapat menentukan tingkat informativitas suatu penanda (Nagy *et al.*, 2012).. Nilai PIC penanda ISSR dilaporkan lebih tinggi daripada penanda RAPD (Bhardwaj *et al.*, 2010). Hal ini berarti bahwa ISSR lebih mampu untuk menganalisis keanekaragaman genetik daripada RAPD.

Variasi genetik pada durian dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya biologi polinasi (Bumrungsri *et al.*, 2009). Bunga durian bersifat hermaphrodit. Kondisi ini memungkinkan terjadinya *self-pollination*. Polen dapat berasal dari bunga yang sama atau bunga berbeda dalam satu pohon kemudian dapat menyerbuki stigma dari pohon yang sama. Selama tidak ada penyerbukan dari polen yang berasal dari pohon yang lain, variasi yang terbentuk pada kejadian *self-pollination* akan sedikit.

Berdasarkan morfologinya, tangkai stigma (*stylus*) lebih tinggi dari tangkai sari (filamen), sedangkan berdasarkan fisiologinya, waktu pelepasan polen (*dehiscense*) berbeda dengan waktu reseptif stigma. Kedua faktor tersebut yang menyebabkan terhambatnya *self-pollination* dan terjadinya *self-incompability* pada durian (Bumrungsri, 2009).

Faktor yang mempengaruhi variasi genetik selanjutnya adalah adanya mutasi. Kecenderungan mutasi pada sekuen berulang lebih tinggi (Udupa & Baum, 2001). Namun, mutasi belum tentu diikuti oleh perubahan morfologi. Perubahan morfologi dikendalikan oleh ekspresi gen. Suatu gen data diekspresikan melalui proses panjang yang melibatkan tahap transkripsi dan translasi. Ciri morfologi bukan hanya hasil dari ekspresi gen, namun juga

dipengaruhi oleh lingkungan. Lingkungan yang berbeda dapat memberikan ciri morfologi yang berbeda (Wang *et al.*, 2012).

Habibah *et al.* (2019) telah menganalisis tiga puluh varietas durian unggul Pulau Kundur berdasarkan ciri morfologi. Nilai kemiripan durian unggul Pulau Kundur sebesar 0,37-0,78, sedangkan nilai kemiripan durian unggul Pulau Kundur berdasarkan penanda ISSR sebesar 0,1-0,86. Hal ini berarti bahwa penanda ISSR mampu mengungkap kedekatan lebih tinggi antar varietas. Artinya, penanda molekuler lebih baik dalam membedakan antar varietas durian dibanding dengan penanda morfologi. Siew *et al.* (2018) menyatakan bahwa varietas yang dianggap sama secara morfologi masih dapat dibedakan berdasarkan penanda molekuler.

Hasil analisis pengelompokan dilakukan berdasarkan profil alel pada seluruh primer. Durian yang berada di kluster yang sama memiliki profil yang cenderung mirip (Yulita dan Murnianjari, 2010). Durian Asapan (K17) dan durian Mas Pear (K18) memiliki profil alel sama pada primer ISSR4, ISSR5, PKBT9, dan tidak terbentuk alel pada primer PKBT12. Nilai matriks kemiripan kedua varietas ini paling tinggi. Varietas Asapan dan Mas Pear juga memiliki nilai matriks kemiripan tertinggi pada penelitian Angeliena *et al.* (2019) yang menggunakan durian unggul Indonesia sebagai sampel dan diamplifikasi menggunakan 11 primer ISSR. Kedua varietas tersebut memiliki kesamaan pada lama waktu pemasakan buah, buah sama – sama tidak pecah, buah matang tiap tahun, warna tangkai buah coklat kehijauan, buah berdiameter 15 cm, berat buah sekita 0,9-1,5 kg, ketebalan kulit buah sedang, warna kulit buah gelap, tekstur buah tidak berair, rasa arillus pahit manis, aromanya kuat, dan warna mantel biji abu-abu oranye (Habibah *et al.*, 2019). Pengelompokan sampel pada dendogram tidak selalu bisa dikaitkan secara karkter morfologi karena variasi ISSR terjadi di daerah non-koding sehingga tidak mengekspresikan fenotipe (Hu *et al.*, 2011).

Hasil analisis kelompok yang disajikan berupa dendogram menunjukkan bahwa varietas durian unggul Pulau Kundur tidak mengelompok berdasarkan lokasinya. Hal ini diduga karena aksesibilitas antar wilayah di Pulau Kundur mudah. Alcantara *et al.* (2017) meyakini bahwa mudahnya aksesibilitas suatu daerah dapat menyebabkan tingkat diversitas genetik lebih tinggi daripada di wilayah yang sulit diakses. Secara keseluruhan, dendogram menunjukkan tidak

adanya varietas durian yang memiliki nilai kemiripan 100%. Hal ini berarti bahwa seluruh varietas durian unggul Pulau Kundur memiliki profil genetik yang berbeda dan memiliki keanekaragaman genetik cukup tinggi berdasarkan penanda molekuler ISSR.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Keanekaragaman durian unggul Pulau Kundur tergolong tinggi berdasarkan indikator keanekaragaman genetik yang digunakan, jumlah alel, frekuensi alel, matriks kemiripan, dan dendogram. Berdasarkan nilai PIC, ketujuh primer ISSR yang digunakan bersifat informatif. Alel spesifik yang digunakan sebagai penciri identitas berdasarkan penanda ISSR ditemukan pada varietas GT (K14), Sumbat (K24), Te Lo Kha (K9), dan Phang Jing Lien (K30).

5.2. Saran

1. Penanda ISSR yang lain dapat digunakan untuk identifikasi durian unggul Pulau Kundur supaya alel spesifik yang belum ada pada varietas tertentu dapat ditemukan.
2. Alel spesifik perlu dikonfirmasi melalui sekuensing untuk mendapatkan lokus sebagai penciri sehingga meningkatkan keakuratan identifikasi suatu varietas.
3. Analisis dalam penelitian ini dapat dilanjutkan ke tingkat populasi sehingga dapat mengungkapkan keanekaragaman genetik antar populasi.

DAFTAR PUSTAKA RUJUKAN

- Abengmeneng, C.S., Ofori, D., Kumapley, P., Akromah, R., Jamnadass, R., & Quain, M. (2016). Genetic relationship among 36 genotypes of *Ceiba pentandra* (L.) as revealed by RAPD and ISSR markers. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 4(4), 86-96.
- Adhikari, S., Saha, S., Bandyopadhyay, T.K., & Ghosh, P. (2014). Efficiency of ISSR marker for characterization of *Cymbopogon* germplasms and their suitability in molecular barcoding. *Plant Systematics and Evolution*, 301, 439-450.
- Alcantara, R.B.F., Silva, A.V.C., Blank, A.F., Almelda, C.S., Carvalho, S.V.A., & Blank, A. (2017). Analysis of genetic diversity of *Hyptis pectinata* (L.) Point. Plants using ISSR markers. *Genetic and Molecular Research*, 16 (3), 1-10.
- Alfes, M.F., Nizio, D.A.C., Brito, F.A., Sampalo, T.S., Silva, A.V.C., Arrigoni-Blank, M.F., Carvaiho, S.V.A. & Blank, A.F. (2016). Analysis of genetic diversity of a native population of *Myrcia lundiana* Kiaersk. plants using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 15(4), 1-10.
- Angeliena, A., Ma'ruf, A. Sidiq, H.A., Anggraito, Y.U., Habibah, N. A., Huyop, F.Z., & Retnoningsih, A. (2019). The diversity of superior Indonesia Durians Based on Molecular Markers. *AIP Conference Proceedings*, 2155 (1): 020043-1 – 020043-7.
- Ashari, S. (2017). *Durian: King of The Fruits*. Malang: UB Media
- Aziz, N. A. A. & Jalil, A.M.M. (2019). Potential health benefits of indigenous durian (*Durio zibethinus* Murr.): a review. *Foods*, 8(3), 96-114.
- Aziz, S.A., Clements, G.R., McConkey, K.R., Sritongchuay, T., Pathil, S., Yazid, M.N.H.A., Campos-Arceiz, A., Forget, P., & Bumrungsri, S. (2017). Pollination by the locally endangered island flying fox (*Pterocarpus hypomelanus*) enhances fruit production of the economically important durian (*Durio zibethinus*). *Ecology and Evolution*, 7, 8670-8684.
- Bhardwaj, M., Uppal, S. Jain, S., Kharb, P., Dhillon, R., & Jain, R.K. (2010). Comparative assessment of ISSR and RAPD marker assays for genetic diversity analysis in jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology*, 19 (2), 255-258.
- Baroroh, N., Fitmawati, N & Sofiyanti. (2014). Analisis hubungan kekerabatan durian (*Durio zibethinus* Murr.) berdasarkan penanda morfologi di Kabupaten Kuantan Singingi. *JOM FMIPA*, 1(2), 1-7.

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., & Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32 (3), 314.
- Brown, M.J. (1997). *Durio Bibliography review*. IPGRI. APO (Regional Officer for Asia, The Pacific, and Oceania).
- Bumrungsri, S., Sripaoraya, E., Chongsiri, T., Sridith, K, Paul, A., & Racey. (2009). The pollination ecology of durian (*Durio zibethinus*, Bombacaceae) in southern Thailand. *Journal of Tropical Ecology*, 25, 85-92.
- Carrasco, B., Avila, P., Diaz, J.P., Munoz, P., Garcia, R., Lavendero, B., Silva, A.Z, Retamales, J., & Caligari, P.D.S. (2009). *Genet Resour Crop Evol*, 56, 331-337.
- Cui, C, Li, Y., Liu, Y., Li, X., Luo, S., Zhang, Z., Wu, R., Liang, G., Sun, J., Peng, J., & Tian, P. (2016). Determination of genetic diversity among *Saccharina* germplasm using ISSR and RAPD markers. *CR Biologies*, 340(2), 76-86.
- Dahono & Zurriyati. (2014). Inventarisasi sumber daya genetik tanaman di Pulau Karimun dan Pulau Kundur Kabupaten Karimun Provinsi Kepulauan Riau. *Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya Genetik Pertanian*, 12-19.
- Dasgupta, N., Nandy, P., Sengupta, C., Das, S. (2017). Genetic variation in relation to adaptability of three mangrove species from the Indian Sundarbans assessed with RAPD and ISSR markers. *Journal of Forestry Research*, 29, 301-310.
- Dirjen Hortikultura. (2013). *Pedoman Teknis Penyusunan Deskripsi Varietas Hortikultura*, iv-v.
- Due, M.S., Susilowati, A., & Yunus, A. (2019). The effect of gamma rays irradiation on diversity of *Musa paradisiaca* var. *sapientum* as revealed by ISSR molecular marker. *Biodiversitas*, 20(5), 1416-1422.
- Fatchiyah, E. Arumingtyas, L., Widyarti, S., & Rahayu, S.. (2011). *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Fibriana, F., & Hadiyanti, L.N. (2016). Phylogenetic relationships of local durians species based on morphological characteristics and PCR-RFLP analysis of the ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA. *Biosaintifika*, 8 (3), 361-369.
- Habibah, N.A., Anggraito, Y.U., Abdullah, M., Sidiq, H.A, Angeliena, A, Ma'ruf, A, Huyop, F., & Retnoningsih, A. (2019). Morphological-based diversity analysis of durian from Kundur Island, Indonesia. *AIP Conference Proceedings*, 2155 (1): 020028-1 – 020028-10.

- Hafizah, R.A., Adawiyah, R., Harahap, R.M., Hannum, S., & Santoso, P.J. (2018). Aplikasi marka SSR pada keanekaragaman genetik durian (*Durio zibethinus* Murr.) di Kabupaten Deli Serdang, Sumatra Utara. *Al-Kauniyah: Journal of Biology*, 11(1), 49 – 56.
- Handayani, F. (2016). Genetic diversity of Lai (*Durio kutejensis* Hassk. Becc.) based on morphological and inter simple sequence repeat markers. Thesis Universitas Gadjah Mada.
- Handayani, F., & Rahayu, S.P. (2017). Assesment of genetic diversity in Lai (*Durio kutejensis*) local cultivar of Batuah (Indonesia) using ISSR marker. *Biodiversitas*, 18 (2), 525 – 529.
- Handayani, F., Wulandari, R.A., & Murti, R.H. (2016). Genomic DNA extraction method from mature leaf of lai (*Durio kutejensis* Becc.). *Agrivita*, 38(1), 73 – 79.
- Handayani, R. S. & Ismadi. (2017). Analisis keragaman kualitas buah durian unggulan (*Durio zibethinus*) Aceh Utara. *Jurnal Hortikultura Indonesia* 8(3), 147 – 154.
- Handoyo, D. & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Unitas*, 9 (1): 17 – 29.
- Hannum, S., Indriyani, R., & Elimasni. (2018). Genetic diversity of local rice (*Oryza sativa* L.) from North Sumatera using Simple Sequence Repeat (SSR). *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 2, 51 – 56.
- Hikmah, R.U. (2013). Keanekaragaman molekuler durian berdasarkan fragmen *Internal Transcribed Spacers* (ITS) DNA Ribosomal melalui analisis PCR – RFLP. Skripsi Universitas Negeri Semarang.
- Hu, J.B., Li, Q., & Li, J. (2011). ISSR analysis of somaclonal variation in Callus-derived plants of *Amorphophallus riveri* Durieu. *Acta Biologica Cracoviensia*, 53 (1), 120 – 124.
- Indriyani, N.L.P., Hadiati, S., Nasution, F., Edison, Sudjijo, & Irawati, Y. (2012). Maternal and paternal effect on the characters of durian (*Durio zibethinus* Murr.) fruit from cross-pollination. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 20(2), 23 – 33.
- Irawan, B., Kusmoro, J., & Rahayuningsih, S.R. (2007). Kajian taksonomi kultivar durian di Kabupaten Subang, Jawa Barat.
- Kimura, M., & Crow J. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49, 725.
- Lestari, S., Fitmawati, N.H., & Wahibah. (2011). Diversity of durian (*Durio zibethinus* Murr.) in Bengkalis Islnad based on morphological characters. *Buletin Kebun Raya*, 14(2), 29 – 44.

- Lim, T.K & Luders, L. (1998). Durian flowering, pollination, and incompatibility studies. *Annals of Applied Biology*, 132 (1), 151 – 165.
- Miswarti, Putra, W.E., & Sugandi, D. (2017). Analisis keragaman plasma nutfah durian di Provinsi Bengkulu berdasarkan karakter morfologi. *Buletin Plasma Nutfah*, 23(1), 59 – 68.
- Munankarni, N.N., Rana, N., Bhattarai, T., Shrestha, R.L., Joshi, B.K., Baral, B., & Shrestha, S. (2018). Characterization of genetic diversity of acid lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) cultivars of Eastern Nepal using Inter-Simple Sequence Repeat Markers. *Plants*, 7(46), 1 – 14.
- Mursyidin, D.H & Daryono, B.S. (2016). Genetic diversity of local durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars of South Kalimantan's Province based on RAPD markers. *AIP Conference Proceedings*, 1755.
- Nagy, S., Poczai, P., Cernak, I., Gorji, A.M., Hegedűs, G., & Taller, J. (2012). PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical genetics*, 50(9-10), 670 – 672.
- Ng, W.L. & Tan, S.G. (2015). Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: are we doing it right?. *ASM Science Journal*, 9 (1), 30 – 39.
- Norjana, I., & Azizah, N. (2011). Quality attributes of durian (*Durio zibethinus* Murr.) juice after pectinase enzyme treatment. *International Food Research Journal*, 18(3), 1117 – 1122.
- Parvathaneni, R.K., Natesan, S., Devaraj, A.A., Muthuraja, R., Venkatachalam, R., Subramani, A.P., & Laxmanan, P. (2011). Fingerprinting in cucumber and melon (*Cucumis* sp.) genotypes using morphological and ISSR markers. *Journal Crop Science Biotech*, 14 (1), 39 – 43.
- Pereira, C.S., Silva, A.V.C., Alves, R.P., Alcantara, R.B. F., Blank, M.F.A., Carvalho, S.V.A., Costa, T.S., White, L.A.S., Pinto, V.S., Sampaio, T.S., & Blank, A.F. (2017). Genetic diversity of native populations of *Croton tetradenius* Baill. using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 16(2), 1-12.
- Pharmawati, M. (2009). Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* sp. (Proteaceae). *Jurnal Biologi Udayana*, 13 (1), 12-16.
- Poerba, Y.S. & Yuzammi. (2008). Pendugaan keragaman genetik *Amorphallus titanium* Becc. Berdasarkan marka Random Amplified Polymorphic DNA. *Biodiversitas*, 9(2), 103-107.
- Purayil, F.T., Robert, G.A., Gothandam, K.M., Kurup, S.S., Subramaniam, S., & Cheruth, A.J. (2018). Genetic variability in selected date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars of United Arab Emirates using ISSR and DAMD markers. *Biotech*, 8(2), 109-117.

- Pratiwi, N., Hanafiah, D.S., & Siregar, L.A.M. (2018). Identifikasi karakter morfologis durian (*Durio zibethinus* Murr.) di Kecamatan Tigalingga dan Pegagan Hilir Kabupaten Dairi Sumatera Utara. *Jurnal Agroekoteknologi FP USU* 6(2), 200-208.
- Prayitno, E. & Nuryandani, E. (2011). Optimization of DNA Extraction of Physic Nut (*Jatropha curcas*) by selecting the appropriate Leaf. *Nusantara Bioscience*, 3(1): 1-6.
- Rahayu, S.E & Handayani, S. (2010). Keragaman genetik pandan asal Jawa Barat berdasarkan penanda *Inter Simple Sequence Repeat*. *Makara, Sains*, 14(2), 158-162.
- Retnoningsih, A., Megia, R., & Hartana, A. (2010). Moleccular verification and diversity analysis of Indonesian BB, AAB, and BB banana cultivars. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 4: 69-76.
- Retnoningsih, A., Megia, R., & Hartana, A. (2011). Microsatellite markers for classifying and analyzing genetic relationship between banana cultivars in Indonesia. *Acta Horticulturae*, 897: 153-160.
- Retnoningsih, A., Rahayu, E.S., & Sari, I.P. (2016). Characterization of local durian germplasm based on the morphology of fruit. *Jurnal Sains dan Teknologi* 14(2), 89-94.
- Riupassa, P.A, Chikmawati, T., Miftahudin, & Suharsono. (2015). The moleculer diversity-based ISSR of *Durio tanjungpurensis* originating from West Kalimantan, Indonesia. *Makara J. Sci*, 19(1), 27-36.
- Riupassa, P.A., Miftahudin, Suharsono, & Chikmawati, T. (2016). Specific-specific loci of three Indonesian durio inferred from ISSR fingerprinting. *Annual Research & Review in Biology*, 10(5), 1-11.
- Ruwaida. I.P., Yuniastuti, E., & Supiyadi. (2009). Analisis keragaman tanaman durian sukun (*Durio zibethinus*) berdasarkan penanda RAPD. *Bioteknologi* 6: 89-98. Doi: 10.7454/mss.v19i1.4479.
- Salasa, K.A.N., Ashari, S., & Herlina, N. (2013). Identifikasi tanaman durian (*Durio zibethinus* Murray) mirip durian varietas bido di Kecamatan Wonosalam, Kabupaten Jombang dengan metode isozim dan morfologi. *Jurnal Produksi Tanaman*, 1(5), 427-433.
- Sambrook, J., & Russell, D.W. (2001). *Molecular Clonig: A Laboratory Manual*, the third edition.
- Santoso, P.J., Granitia, A., Indriyani, N.L.P., & Pancoro, A. (2016). Analisis lokus dan keragaman sumber daya genetik durian (*Durio sp.*) berdasarkan marka mikrosatelit. *Jurnal Hortikultura*, 26(1), 9-20.

- Santoso, P.J., Novari, M. Jawal, A.S., Wahyudi, T., & Hasyim, A. (2008). Idiotipe durian nasional berdasarkan preferensi konsumen. *Journal Hortikultura*, 18(4), 395-401.
- Sari, V.K. & Murti, R.H. (2015). An effective method for DNA extraction of mature leaf of sapodilla (*Manilkara zapota* (L.) van Royen). *Agrivita*, 37(1), 18-23.
- Sidiq, H.A., Retnoningsih, A., & Habibah, N.A. (2019). Keanekaragaman dan identifikasi durian unggul Pulau Kundur berdasarkan penanda molekuler mikrosatelit. *Lifescience*, 8(2), 1-17.
- Siew, G.Y., Ng, W.L., Tan, S.W., Alitheen, N.B., Tan, S.G., & Yeap, S.K. (2018). Genetic variation and DNA fingerprinting of durian types in Malaysia using simple sequences repeat (SSR) markers. *PeerJ*, 6(4266), 1-18.
- Solikin, A, Retnoningsih, A., & Rahayu, E.S., (2017). Karakterisasi aksesi durian local koleksi Hortimart Agro Centre Jawa Tengah menggunakan penanda molekuler *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). *Floribunda*, 5(7), 267-276.
- Sundari. (2017). Pengembangan protokol isolasi DNA genom tanaman durian dengan menggunakan modifikasi buffer CTAB. *Jurnal Techno*, 06(02), 30-37.
- Syafaruddin, Randriani, E., & Santoso, T.J. (2011). Efektivitas dan efisiensi teknik isolasi dan purifikasi DNA pada jambu mete. *Buletin RISTRI*, 2(2), 151-160.
- Syahrudin, K. (2012). Analisis keragaman beberapa genotype durian (*Durio zibethinus* Murr.) menggunakan penanda morfologi dan molekuler (ISSR). Thesis Magister Sains Institut Pertanian Bogor.
- Tapeh, R.N.G., Bernousi, I., Moghadam, A.F., & Mandoulakani, B. A. (2018). Genetic diversity and structure of Iranian *Teucrium* (*Teucrium polium* L.) populations assessed by ISSR markers. *Journal Agricultural Science Technology*, 20, 333-345.
- Udupa, S. & Baum, M. (2001). High mutation rate and mutation bias at (TTA)_n, microsatellite loci in chickpea (*Cicer arietenum* L.). *Mol Gen Genomics*, 265: 1097-1103.
- Uji, T. (2005). Keanekaragaman Jenis dan Sumber Plasma Nutfah Durian (*Durio spp.*) di Indonesia. *Buletin Plasma Nutfah*, 11, 28-33.
- 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.

- Wang, X.M. (2010). Optimization of DNA isolation, ISSR-PCR system and primers screening of genuine species of rhubarb, an important herbal medicine in China. *J. Med. Plants Res*, 4 (10): 904-908.
- Wang, Y., Wang, X., & Paterson, A.H. (2012). Genome and gene duplications and gene expression divergence: a view from plants. *Annals of The New York Academic of Sciences*, 1: 1-14.
- Wani, M.S., Gupta, R.C., Munshi, A.H., & Sharma, V. (2018). Genetic diversity and structure *Betula utilis* accessions of North-western Himalaya based on RAPD and ISSR markers. *Nucleus*, 61 (12), 1-8.
- Widodo. (1997). Studi pertumbuhan dan perkembangan buah durian (*Durio zibethinus* Murr.) varietas Monthong. Thesis Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Widodo, S.R. (2010). Identifikasi morfologi dan analisis sitologi tanaman durian sukun (*Durio zibethinus* Murr.) Skripsi Universitas Sebelas Maret.
- Yulita, K.S. & 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.
- Yuniastuti, E., Nandariyah, & Bukka, S.R. (2018). Karkterisasi Durian (*Durio zibethinus*) Ngrambe di Jawa Timur, Indonesia. *Journal of Sustainable Agriculture* 33(2), 136 – 145.
- Zhao, L., Huamin, L., Guangze, C., & Mongzhong, X. (2014). Assessment of the genetic diversity and genetic relationships of *Lilium* in China using ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, 184 – 189.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Buffer CTAB 2%

Komposisi:

1. 2% CTAB
2. 20 mM EDTA
3. 100 mM Tris pH 8
4. 1% PVP polivinilpirolidid
5. 1,4 M NaCl
6. 0,3% 2-mercaptoethnol

100 ml buffer CTAB dibuat dengan cara 2 gram CTAB dilarutkan bersama dengan 8,2 gram NaCl, 0,74 gram Na₂EDTA, 1,211 gram Tris dalam 40 ml aquades steril. Kemudian, dihomogenkan dengan *stirrer* hingga larutan berwarna jernih. pH disesuaikan hingga mencapai 8, lalu ditambahkan aquades steril hingga volume 100 ml. selanjutnya, disterilisasi dengan autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Sebanyak 0,3% 2-mercaptoethanol ditambahkan tepat sebelum digunakan.

Lampiran 2. Pembuatan EDTA 0,5 M

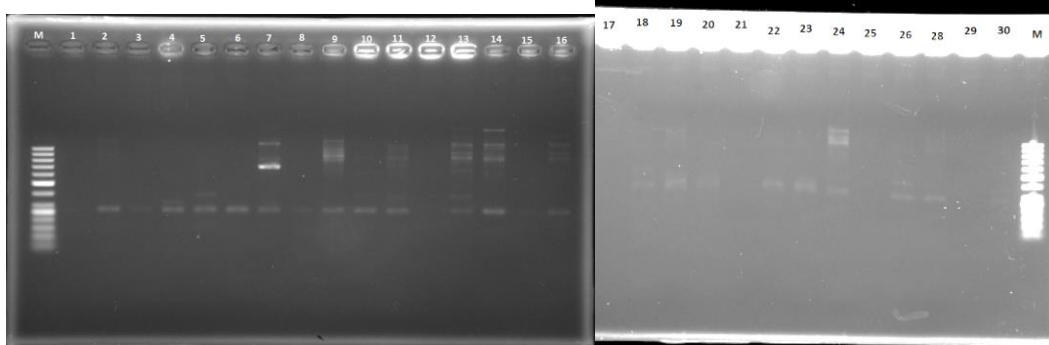
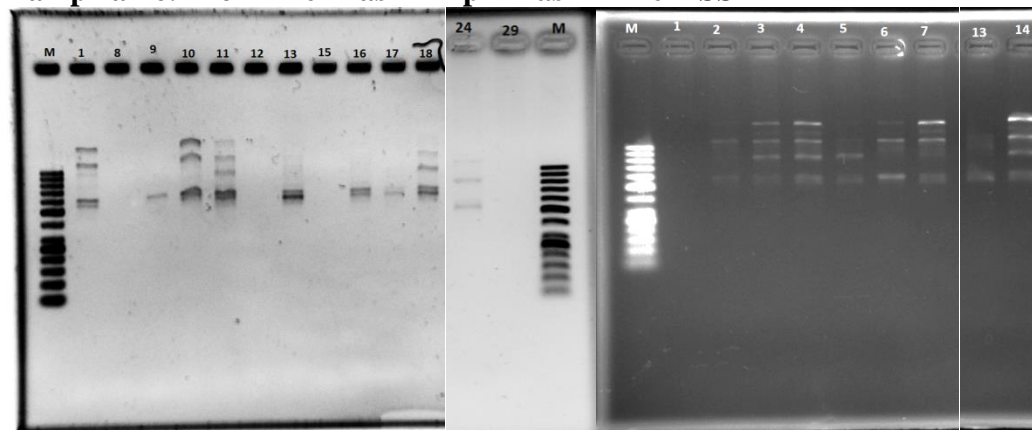
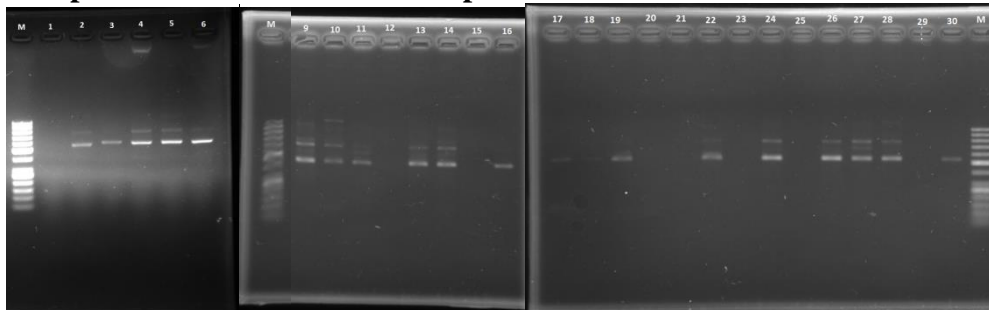
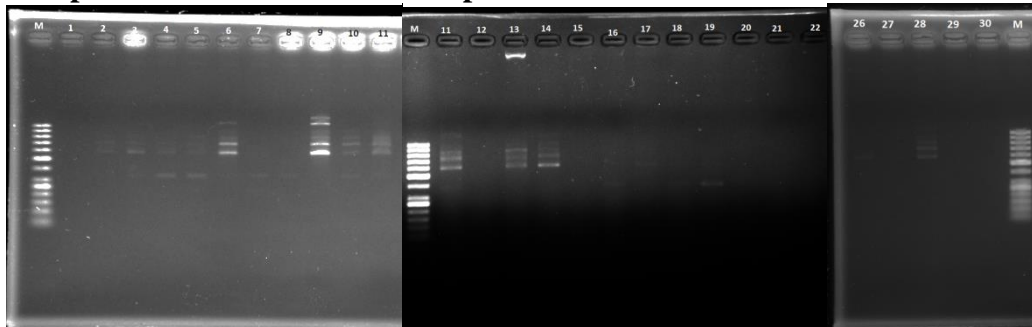
Sebanyak 18,61 gram Na₂EDTA dilarutkan dalam 40 ml aquades steril. Kemudian dihomogenkan dengan *stirrer* hingga larutan jernih. pH disesuaikan hingga mencapai 8 lalu ditambahkan aquades steril hingga volume 100 ml. Disterilisasi dengan autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

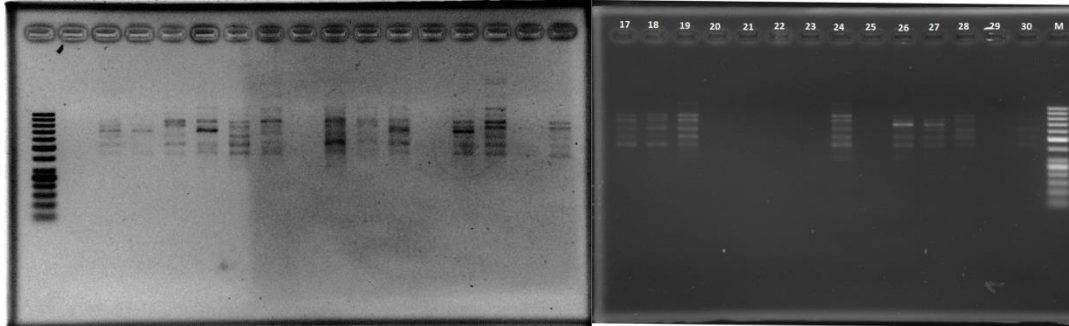
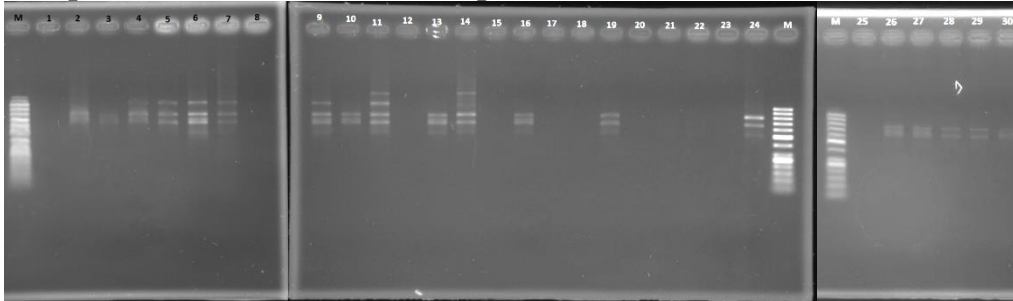
Lampiran 3. Pembuatan Buffer TE

Komposisi:

1. 1 mM EDTA
2. 10 mM Tris pH 8

Sebanyak 500 ml buffer TE dibuat dengan cara 1 M Tris pH 8 sebanyak 5 ml ditambahkan dengan 0,5 M EDTA pH 8 sebanyak 1 ml. kemudian ditambahkan aquades steril hingga volume 500 ml. kemudian, dihomogenkan. lalu, larutan disterilisasi menggunakan autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

Lampiran 5. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR1**Lampiran 6. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR2****Lampiran 7. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR4****Lampiran 8. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer ISSR5**

Lampiran 9. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer PKBT9**Lampiran 10. Profil Alel Hasil Amplifikasi Primer PKBT12**

Lampiran 11. Skoring Pita DNA Hasil Amplifikasi Primer ISSR

	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K13	K14	K15	K16	K17	K18	K19	K22	K24	K26	K27	K28	K29	K30	
1I	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
1H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1G	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
1F	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
1E	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1C	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
1B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	
2H	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2G	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
2F	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
2E	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	
2D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
2C	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
2B	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	
2A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
4I	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4H	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	
4E	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
4D	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
4C	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
4A	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
5G	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5F	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5E	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5D	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
5C	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
5B	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
5A	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
8G	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
8F	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8E	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	
8C	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
8B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
8A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
9H	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	
9G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	
9E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9D	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	
9C	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	
9B	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	
9A	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
11F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
11D	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11C	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	
11B	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	
11A	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	