



**ANALISIS FILOGENI DURIAN PULAU KUNDUR
KEPULAUAN RIAU BERDASARKAN SEKUEN
*trnL-F INTERGENIC SPACER***

Skripsi

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

oleh

Anang Ma'ruf

4411415038

**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 Filogeni Durian Pulau Kundur Kepulauan Riau Berdasarkan Sekuen trnL-F *Intergenic Spacer*”** 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



Anang Ma'ruf

NIM. 4411415038

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul

Analisis Filogeni Durian Pulau Kundur Kepulauan Riau Berdasarkan Sekuen trnL-F *Intergenic Spacer*

Disusun oleh

Anang Ma'ruf

4411415038

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

Dr.dr. Nugrahaningsih.WH, M. Kes

NIP. 196907091998032001

Penguji Utama

Penguji I

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

NIP. 198009292005012002

Penguji II

Dr. Yustinus Ulung Anggraito, M.Si.

NIP. 196404271990031003

Anggota Penguji/Pembimbing

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

NIP. 196007121990032001

MOTTO

*“Segala perbuatan dan tindakan yang diniati baik,
Insyallah akan mendapatkan hasil yang baik”*

PERSEMBAHAN

Untuk Ibu, Bapak dan segenap
keluarga

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan baik. Penulis telah banyak menerima bantuan, kerjasama, dan sumbangan pikiran dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Semarang atas kesempatan yang diberikan untuk menempuh pendidikan di UNNES.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), UNNES yang telah memberikan izin penelitian.
3. Ketua dan Sekretaris Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UNNES yang membantu kelancaran administrasi dalam penyelesaian skripsi.
4. Prof. Dr. Ir. Amin Retnoningsih, M.Si. selaku pembimbing dan ketua tim penelitian durian yang telah membiayai penelitian ini, memberikan ilmu, saran, arahan, dan masukan dalam menyelesaikan tugas akhir.
5. Ibu Talitha Widyatningrum, M.Si.,Ph.D. selaku penguji yang telah memberikan kritik dan saran untuk menyelesaikan tugas akhir.
6. Dr. Yustinus Ulung Anggraito, M.Si. selaku penguji yang telah memberikan kritik dan saran untuk menyelesaikan tugas akhir
7. Dr. Niken Subekti, M.Si. selaku dosen wali penulis atas segala dukungan, masukan, dan doa selama menempuh pendidikan di UNNES.
8. Ibu Elis Sumiati, Bapak Suparman, Bagas Dwi Satrio dan segenap keluarga penulis atas seluruh doa, dukungan, dan segala jerih payah pengorbanannya.
9. Anggi Angeliena kawan seperjuangan penelitian durian yang selalu memberikan dukungan, motivasi, dan saling mendoakan dalam keadaan senang maupun susah.
10. Rekan tim penelitian durian yang memberikan bantuan dan arahan selama penelitian. Teman-teman yang mendukung dan membantu dalam pelaksanaan penelitian, serta segenap tim yang bertugas.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tugas akhir ini masih jauh dari kesempurnaan. Namun demikian, semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi pembaca di masa yang akan datang.

Semarang, 30 April 2020

Penulis

ABSTRAK

Ma'ruf, A. (2020). Analisis Filogeni Durian Pulau Kundur Kepulauan Riau Berdasarkan Sekuen *trnL-F Intergenic Spacer*. Skripsi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Prof. Dr. Ir. Amin Retnoningsih, M.Si.

Kata kunci: *trnL-F intergenic spacer*, filogeni, Pulau Kundur, durian

Durian Pulau Kundur memiliki variasi genetik tinggi. Letak geografis yang berdekatan menjadikan komoditas perdagangan diantara Pulau Kundur dan Malaysia. Peran masyarakat memungkinkan bibit dan buah durian Malaysia masuk ke Pulau Kundur, mengakibatkan variasi genetik durian di Pulau Kundur tinggi. Analisis filogeni penting dilakukan untuk menjelaskan hubungan keturunan dan kekerabatan durian di Pulau Kundur. Sekuen *trnL-F intergenic spacer* memiliki sifat haploid, diwariskan maternal, dan laju evolusi tinggi dilaporkan sesuai untuk mengkaji filogeni pada takson rendah. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis filogeni durian Pulau Kundur berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer*

Dua puluh sembilan sekuen DNA sebagai *ingroup* yang terdiri atas 23 varietas Kundur, 4 varietas lokal Indonesia, dan 2 varietas Malaysia. Sekuen *Heritiera fomes* dari GenBank digunakan sebagai *outgroup*. Sebanyak 29 sekuen varietas durian dan 1 sekuen *outgroup* dianalisis menggunakan primer *trnL-F intergenic spacer*.

Hasil *phylogram* berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer* menunjukkan percabangan yang parafiletik, artinya seluruh varietas durian berasal dari keturunan nenek moyang yang berbeda. Varietas Matahari (B11) diduga menjadi *common ancestor* karena memiliki umur molekuler yang lebih tua daripada varietas lain. Filogeni durian Pulau Kundur berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer* tidak bisa dikaitkan dengan karakter morfologi. Hal ini disebabkan perbedaan pewarisan sifat dari karakter morfologi (paternal) dan sekuen *trnL-F* (maternal).

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN	i
PERNYATAAN KEASLIAN	ii
PENGESAHAN	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB	
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah Penelitian	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Ruang Lingkup Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Deskripsi <i>Durio zibethinus</i>	5
2.2 Penanda Molekuler DNA Kloroplas untuk Analisis Filogeni.....	6
2.3 Kerangka Berfikir Penelitian	10
III. METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Subjek Penelitian.....	11
3.3 Alat dan Bahan	12
3.4 Prosedur Penelitian.....	13
3.5 Analisis Filogeni	15
IV. HASIL DAN BAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian	16
4.2 Bahasan	24

	Halaman
V. SIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Simpulan	33
5.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA RUJUKAN	34
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1.1 Letak geografis Pulau Kundur Kepulauan Riau (merah) dengan negara Malaysia dan Singapura yang berdekatan.....	2
2.1 Karakter morfologi <i>Durio zibethinus</i> (Dokumentasi pribadi)	6
2.2 Peta genom kloroplas pada <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Malvaceae).....	8
2.3 Lokasi gen <i>trnL-F intergenic spacer</i> yang digunakan sebagai primer untuk analisis filogeni tumbuhan durian kundur	9
2.4 Kerangka berfikir penelitian analisis filogeni durian Pulau Kundur	10
4.1 Elektroforegram hasil isolasi DNA genom 23 varietas Pulau Kundur Kepulauan Riau, 4 varietas durian lokal Indonesia dan 2 varietas durian Malaysia	17
4.2 Elektroforegram optimasi suhu <i>annealing</i> primer <i>trnL-F</i> dengan suhu 48°C; 49,1°C; 50,3°C; 51,4°C; 52,6°C; 53,7°C; 54,9°C.....	19
4.3 Elektroforegram hasil amplifikasi primer <i>trnL-F reverse</i> dan <i>forward</i> pada semua sampel uji.....	20
4.4 Rekonstruksi pohon filogeni <i>Neighbour-Joining</i> dengan <i>bootstrap</i> 1000 kali ulangan sekuen <i>trnL-F intergenic spacer</i>	24

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Daftar varietas durian	11
3.2 Alat dan bahan Penelitian	12
3.3 Primer <i>trnL-F intergenic spacer</i> yang digunakan	14
3.4 Komposisi <i>master mix</i> PCR primer <i>trnL-F intergenic spacer</i>	14
3.5 Tahapan amplifikasi DNA primer <i>trnL-F intergenic spacer</i>	15
4.1 Data kuantitas DNA genom sampel uji	18
4.2 Persentase basa konten AT dan GC dari <i>alignment</i> sekuen <i>trnL-F intergenic spacer</i> sampel uji durian sepanjang 493 bp	21
4.3 Matriks jarak genetik hasil <i>multiple alignment</i> sekuen <i>trnL-F intergenic spacer</i> pada seluruh sampel durian.....	25

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Identitas aksesori GenBank NCBI spesies <i>Heritiera fomes</i> (<i>outgroup</i>)	44
2. <i>Multiple alignment</i> sekuen <i>trnL-F intergenic spacer</i> 29 varietas durian menggunakan analisis MUSCLE-MEGA7	45
3. Pembuatan <i>Buffer</i> CTAB 2%	49
4. Pembuatan EDTA 0,5 M.....	50
5. Pembuatan <i>Buffer</i> TE.....	50

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Durio zibethinus adalah salah satu jenis durian yang paling banyak dikonsumsi dan memiliki keanekaragaman genetik yang tinggi. Durian ini merupakan buah tropis musiman yang tersebar di Asia Tenggara khususnya di Malaysia, Thailand, Filipina dan Indonesia (Leontowicz *et al.*, 2011). Di Indonesia, durian menempati posisi ke-7 buah nasional dengan produksi 795 ribu ton pada tahun 2017 (BPS, 2018). Keanekaragaman di bawah jenis pada *D. zibethinus* di Indonesia dilaporkan sangat tinggi (Sundari & Tolangara, 2014; Riupassa *et al.*, 2015; Rosmaina *et al.*, 2016; Sales., 2015; Santoso *et al.*, 2016; Solikin *et al.*, 2017).

Pulau Kundur adalah salah satu wilayah di Kepulauan Riau yang memiliki keanekaragaman genetik *D. zibethinus* yang tinggi. Durian Pulau Kundur yang terkenal antara lain varietas durian Cuhut, Angbak Tolo, Tongkat, Jongkong, Sampak, dan Phang Jing Lien. Hasil eksplorasi durian dalam kegiatan *tour de kundur* di Pulau Kundur tahun 2018 oleh Yayasan Durian Indonesia, menunjukkan bahwa banyak kemiripan antara durian Pulau Kundur dan durian Malaysia. Warna dan rasa arilus durian Pulau Kundur memiliki kemiripan dengan durian Musang King dan Duri Hitam. Letak geografis yang dekat memudahkan akses perdagangan berbagai komoditas dari Pulau Kundur ke Malaysia, dan sebaliknya (Gambar 1.1). Buah dan bibit durian Malaysia masuk ke Pulau Kundur diduga dibawa masyarakat Pulau Kundur yang bekerja dan berdagang di Malaysia. Buah dan bibit durian Malaysia yang masuk ke Pulau Kundur tersebut karena kondisi lingkungan yang mirip dapat tumbuh dan berkembang di Pulau Kundur dan dalam jangka waktu lama mengakibatkan tingkat variasi genetik durian di Pulau Kundur menjadi tinggi. Analisis filogeni penting dilakukan untuk menjelaskan bagaimana hubungan keturunan dan kekerabatan durian di Pulau Kundur. Tujuan jangka panjang kajian ini diharapkan dapat mengungkap

bagaimana varietas durian di satu lokasi memiliki kemiripan dengan durian dari lokasi lain yang dipisahkan lautan.



Gambar 1.1 Letak geografis Pulau Kundur Kepulauan Riau (merah) dengan negara Malaysia dan Singapura yang berdekatan

Habibah *et al.*, (2019) melaporkan bahwa keanekaragaman morfologi durian di Pulau Kundur menunjukkan tingkat variasi yang tinggi. Namun sifat dan karakter morfologi suatu tanaman dipengaruhi faktor lingkungan, sehingga penanda morfologi yang digunakan Habibah *et al.*, (2019) kurang akurat untuk menganalisis filogeni durian Kundur. Oleh karena itu, pendekatan lain selain penggunaan penanda morfologi diperlukan, seperti penanda molekuler yang lebih stabil (Zhang *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2005) untuk menganalisis filogeni durian Pulau Kundur.

Penanda molekuler yang bersumber genom kloroplas dilaporkan sesuai untuk mengkaji filogeni karena memiliki sifat haploid, stabil, dan diwariskan secara maternal (Diekmann *et al.*, 2009; Fitmawati & Hartana. 2010). Genom kloroplas (cpDNA) banyak digunakan untuk mengetahui filogeni tanaman pada tingkat taksonomi genus, spesies maupun varietas (Zhang *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2005). Daerah *non-coding* cpDNA lebih banyak menunjukkan situs informatif filogeni dibandingkan daerah *coding*. Oleh karena itu, penggunaan daerah *non coding* ini tepat untuk menganalisis filogeni tanaman pada tingkat takson spesies atau varietas (Zhang *et al.*, 2003; Hollingsworth *et al.*, 2011).

Daerah *non-coding trnL* (UAA) 3' exon dan gen *trnF* (GAA) merupakan daerah *intergenic spacer* (*trnL-F intergenic spacer*) pada cpDNA (Barcaccia *et al.*, 2007). Sekuen *trnL-F intergenic spacer* memiliki laju evolusi tertinggi

dibandingkan sekuen lain seperti *matK* dan *rbcL* (Hoggard *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2013), berukuran relatif pendek (600-1000 bp) dan mudah diamplifikasi serta dianalisis (Hidayat *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2012). Sekuen *trnL-F intergenic spacer* memiliki laju evolusi dan mutasi yang tinggi, tetapi tidak diekspresikan atau tidak bertanggung jawab dalam pembentukan protein (Chiang & Schaal, 2000). Penanda molekuler dengan laju evolusi tinggi sangat cocok digunakan untuk menganalisis filogeni pada taksa rendah (Wan *et al.*, 2004), hal ini sangat sesuai untuk menganalisis filogeni durian Pulau Kundur yang objek kajiannya adalah varietas. Sekuen ini telah digunakan untuk mengungkap hubungan filogeni berbagai kelompok tumbuhan, seperti pada pisang (Retnoningsih *et al.*, 2014), mangga (Fitmawati & Hartana, 2010; Fitmawati *et al.*, 2017), gandaria (Harsono *et al.*, 2017), *Pandanaceae* (Callmander *et al.*, 2012; Callmander *et al.*, 2013; Buerki *et al.*, 2012; Gallaher *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2011; Zanan & Nadaf, 2012), anggrek (Kocyan *et al.*, 2004), rubus (Yang & Pak, 2006), pinus (Liston *et al.*, 2003), *Annonaceae* (Gosline *et al.*, 2019), dan tumbuhan paku pakuan (Li *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013).

1.2. Rumusan Masalah Penelitian

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah “Bagaimana filogeni durian Pulau Kundur Kepulauan Riau berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer*?”

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis filogeni durian Pulau Kundur Kepulauan Riau berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer*.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut ;

1. Manfaat Teoritis

Memberikan pengetahuan tentang penggunaan dan pentingnya *trnL-F intergenic spacer*, untuk merekonstruksi pohon filogeni pada takson dibawah spesies.

2. Manfaat Praktis

Memberikan informasi kepastian hubungan keturunan dan kekerabatan durian Pulau Kundur berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer*.

1.5. Ruang Lingkup Penelitian

1.5.1. Filogeni Durian Pulau Kundur

Filogeni durian Pulau Kundur adalah gambaran hubungan asal usul dan kekerabatan varietas durian Pulau Kundur, dengan perbandingan durian Malaysia dan lokal Indonesia. Filogeni durian Pulau Kundur dalam penelitian ini dijelaskan pada pohon filogeni (*phylogram*) yang dibangun menggunakan pendekatan *Neighbor-Joining* (NJ) dari sekuen *trnL-F intergenic spacer*.

1.5.2. Durian Pulau Kundur

Durian Pulau Kundur yang digunakan dalam penelitian ini adalah 23 varietas hasil pengamatan saat eksplorasi *Tour de Kundur* 2018 yang dilakukan oleh Yayasan Durian Indonesia.

1.5.3. Sekuen *trnL-F Intergenic Spacer*

Sekuen *trnL-F intergenic spacer* adalah sekuen *non-coding* dari daerah *intergenic spacer* antara *trnL* (UAA) exon dan gen *trnF* (GAA) yang berasal dari DNA kloroplas (cpDNA). Sekuen *trnL-F intergenic spacer* dalam penelitian ini diamplifikasi menggunakan primer *trnL-F reverse* dan *forward*.

BAB II

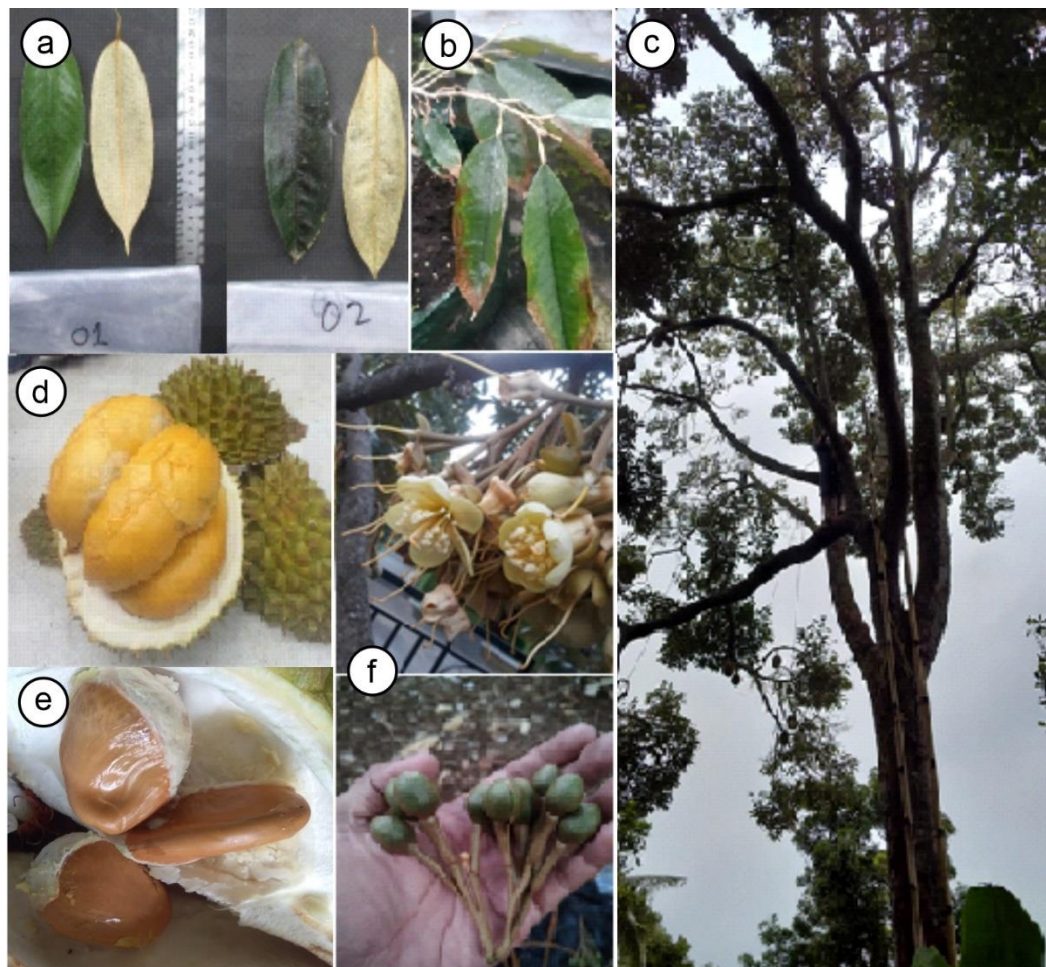
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Deskripsi *Durio zibethinus*

Jenis durian yang banyak dibudidayakan di Indonesia adalah *Durio zibethinus*. Durian ini di Indonesia memiliki banyak nama lokal. *D. zibethinus* merupakan salah satu durian *edible* yang paling digemari masyarakat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keanekaragaman takson di bawah jenis *D. zibethinus* di Indonesia sangat tinggi (Sundari & Tolangara, 2014; Riupassa *et al.*, 2015; Sales, 2015; Rosmaina *et al.*, 2016; Santoso *et al.*, 2016; Solikin *et al.*, 2017).

Durian merupakan tanaman berkayu yang memiliki ciri berpohon besar, *evergreen*, termasuk tanaman tahunan (*perennial*), tingginya dapat mencapai 30-40 meter dengan diameter batang lebih dari 2,5 meter dan dapat tumbuh hingga ketinggian 800 mdpl (Brown, 1997). Durian memiliki kulit batang dengan tekstur kasar dan terkelupas, berwarna coklat gelap hingga merah. Permukaan bawah daun durian berwarna emas hingga coklat, sedangkan permukaan atas daun hijau hingga hijau tua. Bagian permukaan bawah daun durian memiliki aksesoris daun berupa bulu (trikoma) (Widodo, 1997). Bentuk daun durian bervariasi, berbentuk melonjong, melanset, dan melonjong-melanset bergantung pada jenis atau varietas durian (Irawan *et al.*, 2007). Duduk daun pada setiap nodus berseling. Durian memiliki bunga yang sempurna (hermaprodit) tumbuh dicabang atau ranting (*raniflorous*), berkelompok hingga 40-50 kuntum, dan berbentuk bulat telur. Secara morfologi bunga durian merupakan bunga lengkap *tetracyclis* terdiri atas *pedicellus*, *receptacle*, *anther*, *stamen*, *sepal*, dan *corolla* (Widodo, 2010). Buah durian memiliki bentuk bulat telur, bulat, lonjong dan tidak beraturan, berwarna hijau, kuning hingga kuning kecoklatan. Kulit buah berduri tajam, dengan bentuk piramid lebar, dan berukuran mencapai 1 cm. Panjang buah dapat mencapai lebih dari 25 cm dan diameter dapat mencapai lebih dari 20 cm. Buah durian memiliki warna arilus buah bervariasi, putih, kuning, jingga, merah hingga warna pelangi

dengan rasa arilus manis, pahit, lembut, hingga berserat (Lim & Luders, 1998; Norjana & Azizah, 2011; Handayani & Ismadi, 2017; Yuniastuti, *et al.*, 2018).



Gambar 2.1. Karakter morfologi *Durio zibethinus*, a) Morfologi daun; b) Duduk daun; c) Percabangan pohon; d) Morfologi buah; e) Morfologi biji; f) Morfologi bunga. (Dokumentasi pribadi)

2.2. Penanda Molekuler DNA Kloroplas untuk Analisis Filogeni

Kriteria penanda molekuler yang ideal memiliki keterulangan yang tinggi, menunjukkan sifat polimorfik, dan mudah dalam pengerjaannya (Kumar *et al.*, 2009). Analisis filogeni pada taksa rendah menggunakan penanda molekuler dengan laju evolusi yang tinggi, sedangkan pada taksa tinggi menggunakan penanda molekuler dengan laju evolusi rendah (Wan *et al.*, 2004). Analisis filogeni durian Pulau Kundur menggunakan penanda molekuler dengan laju evolusi yang tinggi karena objek kajiannya varietas.

Sumber penanda molekuler pada tumbuhan adalah genom inti (nDNA), genom mitokondria (mtDNA), dan genom kloroplas (cpDNA). Penanda molekuler

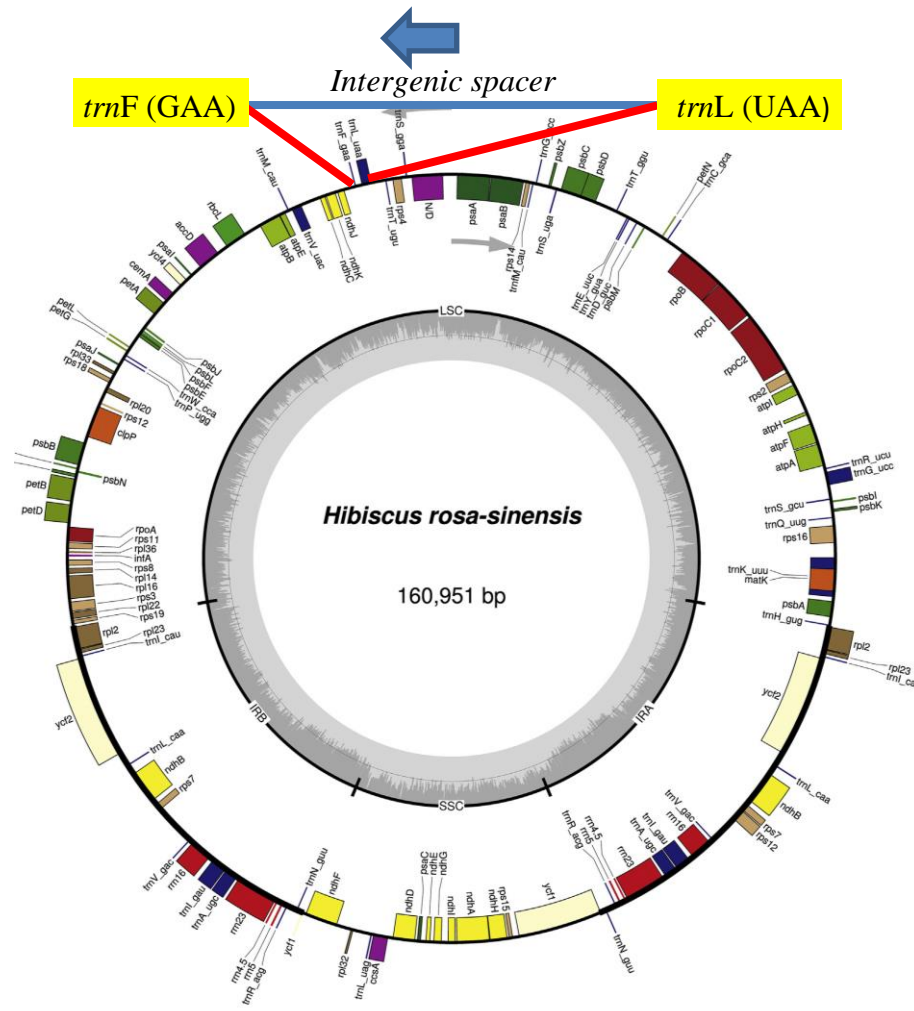
yang berasal dari nDNA memiliki struktur linier, diploid, dan pewarisan sifatnya merupakan gabungan dari sifat induk betina dan jantan (*paternal*). Analisis filogeni durian Pulau Kundur membutuhkan penanda molekuler dengan kriteria memiliki laju evolusi tinggi dan sifatnya diturunkan dari induknya. Meskipun penanda molekuler dari nDNA memiliki laju evolusi tinggi, tetapi nDNA tidak sesuai digunakan untuk analisis filogeni karena sifatnya yang diturunkan secara *paternal* dan juga terdapat dipengaruhi lingkungan, sehingga penanda ini belum dapat mengungkap filogeni tumbuhan secara akurat. Penanda molekuler dari mtDNA memiliki struktur sirkuler, haploid, diwariskan secara maternal, memiliki ukuran yang sangat besar, dan laju evolusi yang rendah (Wan *et al.*, 2004). Penanda molekuler mtDNA tidak sesuai untuk menganalisis filogeni pada tingkat taksonomi rendah, karena memiliki laju evolusi yang rendah.

Genom kloroplas memiliki sifat haploid dan diwariskan secara *maternal*. Penggunaan penanda molekuler cpDNA dapat meminimalisir terjadi kontaminasi akibat organisme lain (bakteri, fungi atau hewan) pada saat melakukan isolasi DNA genom, karena kloroplas hanya dimiliki oleh sel tumbuhan saja (Singh *et al.*, 2017). Penggunaan penanda molekuler dari cpDNA sangat berkembang pesat dan sangat tepat untuk analisis filogeni pada tumbuhan, terutama pada Angiospermae (Diekmann *et al.*, 2009).

Genom kloroplas pada tumbuhan secara umum memiliki bentuk sirkuler 120-220 kb, yang terdiri atas daerah *small single copy (SSC)* dan daerah *large single copy (LSC)* yang dipisahkan oleh *inverted repeat* IRa dan IRb. Genom kloroplas Angiospermae memiliki 100-120 gen, terdiri atas 88 gen penyandi protein dan 35 gen penyandi RNA struktural (Wicke *et al.*, 2011). Struktur cpDNA *Hibiscus rosa-sinensis* famili Malvaceae yang merupakan satu keluarga dengan *D. zibethinus* dijelaskan pada Gambar 2.2.

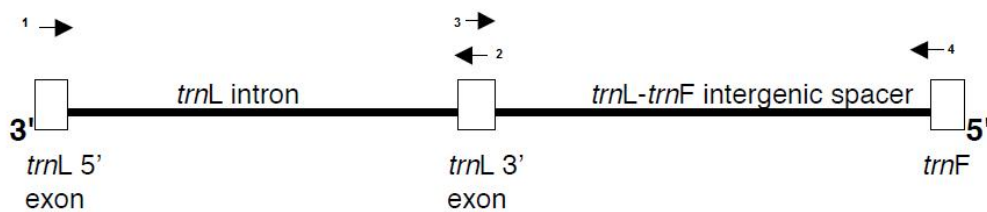
Genom kloroplas Angiospermae memiliki struktur yang konservatif (Wu *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2012; Salih *et al.*, 2017; Ivanova *et al.*, 2017). Struktur konservatif mengakibatkan informasi sekuen dalam cpDNA dapat digunakan untuk menganalisis filogeni tumbuhan yang belum diketahui (Wang *et al.*, 2013). Beberapa gen *intron* pada cpDNA dapat memiliki laju evolusi tinggi meskipun memiliki struktur dari genom kloroplas yang bersifat konservatif, misal sekuen

trnL-F intergenic spacer, *psbA-trnH*, *trnQ-rps16*, intron gen *rpp116*, dan gen *trnL* (Sanchez *et al.*, 2017), sehingga penanda molekuler cpDNA cocok digunakan untuk menganalisis filogeni durian Pulau Kundur.



Gambar 2.2. Peta genom kloroplas pada *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae) (Abdullah *et al.*, 2019).

Salah satu sekuen dalam cpDNA yang dapat digunakan sebagai penanda molekuler untuk analisis filogeni tumbuhan adalah sekuen *intergenic spacer* dari daerah *trnL-F* (*trnL-F intergenic spacer*). *Intergenic spacer* dari *trnL* (UAA) 3' *exon* dan gen *trnF* (GAA) merupakan daerah *non-coding* pada cpDNA (Barcaccia *et al.*, 2007; Abdullah *et al.*, 2019) (Gambar 3). Sekuen *trnL-F intergenic spacer* sangat informatif dan mampu menunjukkan hubungan filogeni tumbuhan. Sekuen ini juga mempunyai *substitution rate* tertinggi dibandingkan sekuen lain seperti *matK* dan *rbcL* (Hoggard *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2013). Sekuen *trnL-F intergenic spacer* memiliki laju evolusi dan mutasi yang tinggi, tetapi tidak diekspresikan atau tidak bertanggung jawab dalam pembentukan protein (Chiang & Schaal, 2000). Selain itu, sekuen ini berukuran relatif pendek (600-1000 bp), mudah diamplifikasi dan dianalisis (Dong *et al.*, 2012; Hidayat *et al.*, 2008).

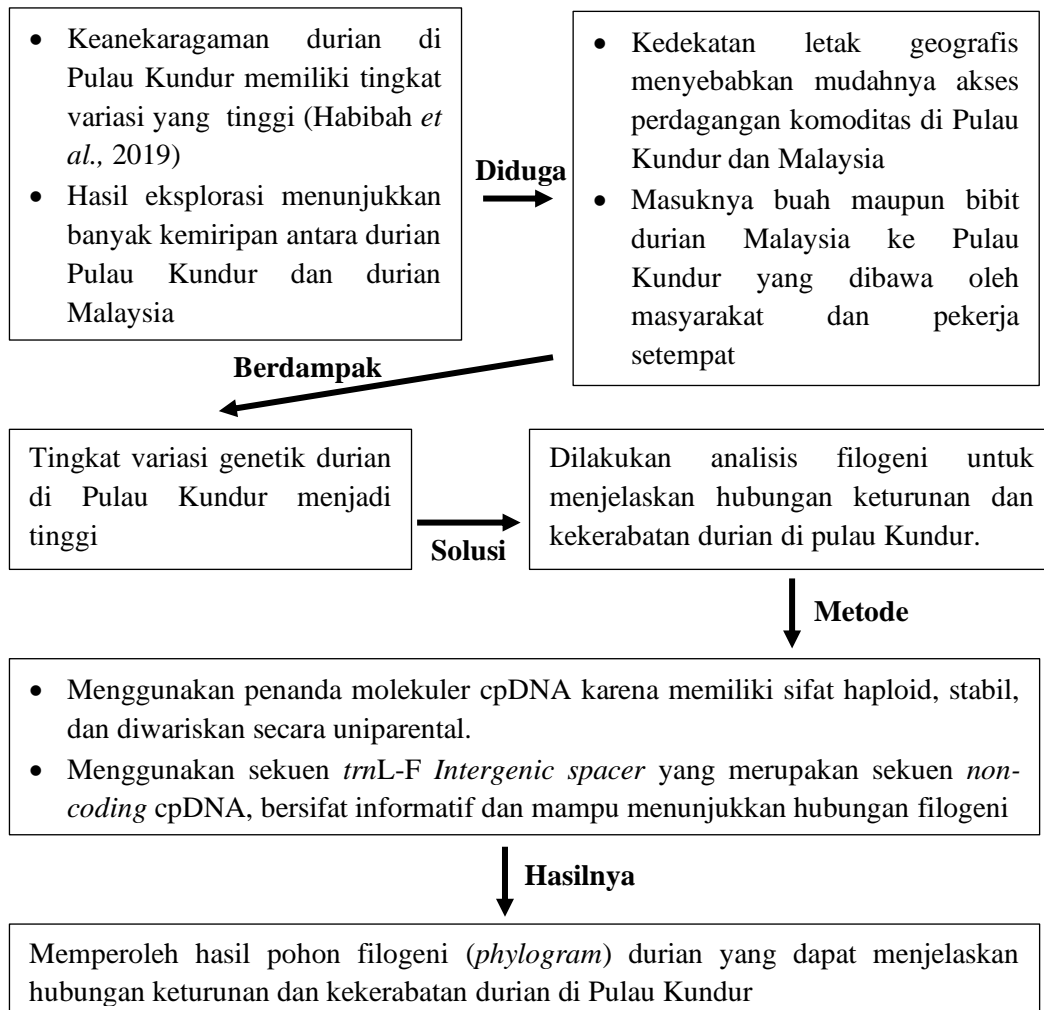


Gambar 2.3. Lokasi sekuen *trnL-F intergenic spacer* yang digunakan sebagai primer untuk analisis filogeni tumbuhan durian kundur. (Sankar *et al.*, 2011)

Sekuen *trnL-F intergenic spacer* telah digunakan untuk mengungkap hubungan filogeni berbagai kelompok tumbuhan, seperti pada pisang (Retnoningsih *et al.*, 2014), mangga (Fitmawati & Hartana, 2010; Fitmawati *et al.*, 2017), gandaria (Harsono *et al.*, 2017), *Pandanaceae* (Callmander *et al.*, 2012; Callmander *et al.*, 2013; Buerki *et al.*, 2012; Gallaher *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2011; Zanan & Nadaf, 2012), anggrek (Kocyan *et al.*, 2004), rubus (Yang & Pak, 2006), pinus (Liston *et al.*, 2003), *Annonaceae* (Gosline *et al.*, 2019), dan tumbuhan paku pakuan (Li *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013).

2.3 Kerangka Berfikir Penelitian

Kerangka berfikir dalam penelitian ini dijelaskan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.4. Kerangka berfikir penelitian analisis filogeni durian Pulau Kundur

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan April 2018 hingga Maret 2020 di Laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Riset Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang.

3.2. Subjek Penelitian

Subjek adalah daun durian 23 varietas dari Pulau Kundur Kepulauan Riau, empat varietas durian lokal Indonesia, dan dua varietas durian Malaysia (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Daftar varietas durian

No.	Kode	Nama varietas	Wilayah Asal	Lokasi Sampel
1	K1	GSG	Kundur Barat	Kundur Barat
2	K2	Cuhut	Kundur Barat	Kundur Barat
3	K3	Angbak Tolo	Kundur Barat	Kundur Barat
4	K4	Angbak Kia 11	Kundur Barat	Kundur Barat
5	K5	Angbak Kia 03	Kundur Barat	Kundur Barat
6	K6	Huang Kwue Niam	Kundur Barat	Kundur Barat
7	K7	Pheng Kwai	Kundur Barat	Kundur Barat
8	K9	Te Lo Kha	Kundur Barat	Kundur Barat
9	K10	Phang Jing Lien	Kundur Barat	Kundur Barat
10	K11	HM	Kundur Barat	Kundur Barat
11	K13	Pondok	Kundur Barat	Kundur Barat
12	K14	GT	Kundur Barat	Kundur Barat
13	K15	Tongkat	Kundur Barat	Kundur Barat
14	K16	TR	Kundur Barat	Kundur Barat
15	K17	Asapan	Kundur Barat	Kundur Barat
16	K18	Mas Pear	Kundur Barat	Kundur Barat
17	K19	Jongkong	Kundur Barat	Kundur Barat
18	K21	Durian Tawa	Kundur	Kundur
19	K22	Moncong	Kundur	Kundur
20	K24	Sumbat	Kundur	Kundur
21	K26	Empe	Kundur	Kundur
22	K27	Milah	Kundur	Kundur
23	K30	Layang	Kundur	Kundur
24	B8	Duri Hitam	Malaysia	Koleksi <i>ex situ</i> Bogor
25	B9	Musang King	Malaysia	Koleksi <i>ex situ</i> Bogor
26	B7	Bawor	Banjarnegara	Koleksi <i>ex situ</i> Bogor
27	B10	Pelangi	Manokwari	Koleksi <i>ex situ</i> Bogor
28	B11	Matahari	Bogor	Koleksi <i>ex situ</i> Bogor
29	B16	Petruk	Jepara	Koleksi <i>ex situ</i> Bogor

3.3. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Alat dan bahan penelitian

Uraian	Alat	Bahan
Pengambilan dan Penyimpanan Sampel	Gunting Plastik Tisu <i>Spidol Marker</i> <i>Freezer</i>	Sampel daun Tisu Alkohol 70% <i>Ice pack</i> <i>Ice box</i>
Isolasi DNA	<i>Tissue Grinder Pestle</i> Neraca analitik <i>Microtube</i> 2 ml <i>Micropipete</i> <i>Tips pipete</i> <i>Microcentrifuge</i> <i>Waterbath</i> <i>Vortex</i> <i>Glove</i>	<i>Liquid Nitrogen</i> , 2- <i>mercaptoethanol</i> 0,3%, <i>buffer</i> ekstraksi (<i>Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB</i> 2%), <i>Tris</i> 100 mM pH 8, <i>Disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate (EDTA)</i> 20 mM, <i>Natrium chloride (NaCl)</i> 1.4 M, <i>Polyvinylpyrrolidone (PVP)</i> 1%), <i>Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (PCI)</i> 25:24:1, <i>Ethanol Absolute</i> , <i>Ethanol</i> 70%, <i>Tris EDTA (TE) buffer</i>
Kuantifikasi DNA	Nano spektrofotometer <i>Micropipete</i> <i>Tips pipete</i>	<i>Tissue scientific</i> (tisu <i>Kim Tech</i>), hasil isolasi DNA genom
Elektroforesis Horizontal	<i>Micropipet</i> <i>Tips pipete</i> <i>Comb & Tray</i> <i>Microwave Chamber / Tank</i> <i>Power supply</i> <i>Geldoc Alpha Imager®</i> <i>Staining Box</i>	Agarose, 1X <i>Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer</i> , <i>Ethidium bromide (EtBr)</i> , <i>GeneRuler 50 bp DNA ladder</i> , <i>GeneRuler 100 bp plus DNA ladder</i> , <i>Loading dye 6X</i>
Amplifikasi DNA	peqSTAR 2X <i>Thermocycler</i> <i>Micropipet</i> <i>Tips pipete</i> <i>Microtube 0.2 ml</i>	<i>DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)</i> , <i>Primer mikrosatelit</i> , <i>Water nuclease-free</i>

3.4. Prosedur Penelitian

Tahapan penelitian meliputi 1) Pengambilan dan penyimpanan sampel daun, 2) Isolasi DNA genom, 3) Uji kualitas dan kuantitas DNA genom hasil isolasi, 4) Amplifikasi DNA menggunakan primer *trnL-F reverse* dan *forward*, dan 5) Sekuensing hasil amplifikasi DNA.

3.4.1. Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Daun

Sampel daun durian merupakan daun muda atau daun ketiga dari ujung tangkai. Daun dibersihkan dengan alkohol 70% dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan tisu. Daun dimasukkan ke plastik klip dan diberi label keterangan, kemudian dimasukkan ke *ice box* yang berisi *ice pack* untuk menjaga kelembaban daun dalam perjalanan pada saat pengambilan dari kebun atau lapangan. Untuk penyimpanan jangka panjang, daun disimpan di *freezer* -20 °C.

3.4.2. Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode CTAB (Vanijajiva, 2012) yang telah dimodifikasi Solikin *et al.* (2017). Daun dibersihkan dari kotoran dan sisik (trikoma) pada permukaan bawah daun menggunakan alkohol 70%. Daun ditimbang seberat 0,05 gram kemudian dimasukkan ke *microtube*. Ditambahkan nitrogen cair dan dihaluskan dengan bantuan *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 750 μ l. Larutan dihomogenkan menggunakan *vortex* lalu diinkubasi di *waterbath* dengan suhu 60°C selama 30 menit sambil dibolak-balik setiap 10 menit. Setelah selesai inkubasi *waterbath*, sampel ditambahkan larutan PCI 750 μ l, kemudian di-*vortex* hingga homogen. Larutan di-*sentrifuge* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipindahkan ke *microtube* yang baru. Langkah ekstraksi DNA dengan 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 inkubasi, larutan ditambahkan *ethanol absolute* dingin sebanyak 1 ml. Larutan di-*invert* hingga presipitasi DNA terbentuk. *Sentrifuge* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang terbentuk, dicuci dengan

ethanol 70% sebanyak 450 µl kemudian di-*sentrifuge* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dan dilakukan pengulangan 2 kali untuk mendapatkan DNA yang bersih. Pelet dikering anginkan, kemudian ditambahkan 100 µl *buffer* TE.

3.4.3. Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Genom Hasil Isolasi

Uji kualitas DNA menggunakan elektroforesis gel agarose 0,8%. Pembuatan gel agarose dengan cara melarutkan 0,32 gr agarose dalam 40 ml TAE 1X. Kemudian dipanaskan di *microwave* selama 4-5 menit. Apabila sudah larut, larutan gel dituang ke cetakan yang sebelumnya sudah dibersihkan dan biarkan gel hingga mengeras.

Sampel yang diambil sebanyak 4 µl dicampurkan *loading dye*. *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 kuantitatif menggunakan nano spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

3.4.4. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan primer *trnL-F intergenic spacer reverse* dan *forward* yang sudah dilakukan proses optimasi primer untuk mengetahui kondisi optimal proses amplifikasi (Tabel 3.3). Kegiatan amplifikasi diawali dengan pembuatan *master mix PCR* yang disajikan pada Tabel 3.4.

Tabel 3.3 Primer *trnL-F intergenic spacer* yang digunakan

Nama Primer	Urutan Basa	TA	Sumber
<i>trnL-F</i> (F)	5' -ATTTGAACTGGTGACACGAG- 3'	51.4°C	Retnoningsih <i>et al.</i> , 2014
<i>trnL-F</i> (R)	5' -GGTTCAGTCCCTCTATCCC -3'		

Tabel 3.4 Komposisi *master mix PCR* primer *trnL-F Intergenic spacer*

Bahan	Volume
DNA <i>template</i> (30 ng/µl)	4 µl
Primer <i>trnL-F forward</i> (10 ng/µl)	4 µl
Primer <i>trnL-F reverse</i> (10 ng/µl)	4 µl
<i>DreamTaq Green PCR Master Mix</i> 2X	25 µl
DNA <i>free nuclease water</i>	13 µl
Total vol reaksi/ sampel	50 µl

Amplifikasi DNA menggunakan peqSTAR 2X Thermocycler dengan tahapan *pre-denaturation*, *denaturation*, *annealing*, *extension*, dan *final extensions* seperti pada Tabel 3.5.

Tabel 3.5 Tahapan amplifikasi DNA primer *trnL-F intergenic spacer*

Tahapan	Temperatur (°C)	Waktu
<i>Pre-denaturation</i>	95	4 menit
<i>Denaturation</i>	95	30 detik
<i>Annealing</i>	51,4	30 detik
<i>Extension</i>	72	1 menit
<i>Final extension</i>	72	10 menit

Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dan produk PCR divisualisasikan dalam gel agarosa 2% menggunakan mesin elektroforesis dengan *buffer* TAE 1X (Tris Base, asam asetat glasial, EDTA) pada tegangan 75 volt selama 30 menit. Hasil elektroforegram amplifikasi PCR berupa pita tunggal (*single band*) yang tebal dinyatakan berhasil dan untuk sampel dengan pita tipis dilakukan amplifikasi ulang. Hasil amplifikasi PCR dikirim ke jasa sekuensing *Ist Base Laboratories DNA Sequencing Service*, Malaysia.

Proses persiapan sekuensing dilakukan dengan melakukan *double* cek pada seluruh sampel hasil visualisasi elektroforesis. Sampel yang dikirimkan merupakan sampel hasil PCR dengan volume 30-50 µl dengan kualitas pita hasil visualisasi tebal tanpa *smear*. Sampel hasil PCR dipindahkan ke *96-well plate* kemudian *packing* menggunakan *ice pack* dan dimasukkan ke *box ice*.

3.5. Analisis Filogeni

Urutan basa *reverse* dan *forward* sekuen *trnL-F intergenic spacer* yang diperoleh dari hasil *sekuensing* kemudian dilakukan *contig* menggunakan program DNA Baser Assembler v5.15.0. Hasil *contig* semua sampel dilakukan *multiple alignment* menggunakan analisis MUSLCE yang diimplementasikan pada program MEGA7. Hasil *multiple alignment* kemudian di-*cutting* dan diedit secara manual. Basa konten dan perhitungan jarak genetik dari setiap sampel didapatkan dari program MEGA7. *Phylogram* direkonstruksi dan dianalisis dengan metode *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987) dengan 1000 kali nilai *bootstrap* yang diimplementasikan dalam program MEGA7.

BAB IV

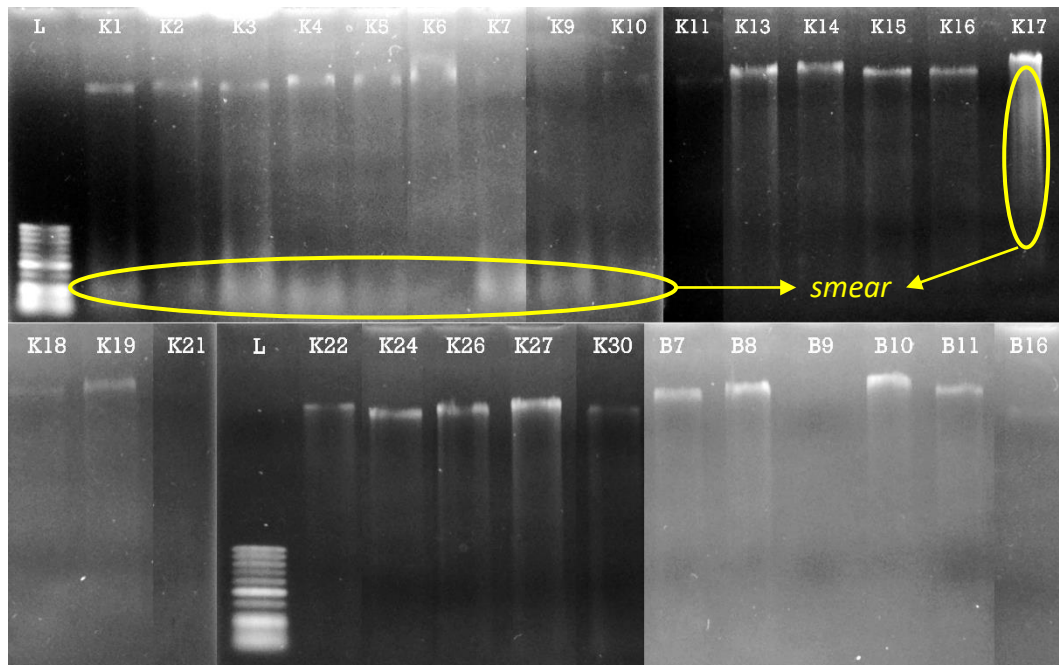
HASIL DAN BAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Hasil isolasi DNA yang berkualitas diperlukan untuk mengamplifikasi fragmen *trnL-F intergenic spacer*. DNA hasil isolasi yang berkualitas adalah DNA yang memiliki pita terlihat jelas, tebal, sedikit *smear*, dan kontaminan rendah. Amplikon DNA target diperlukan untuk mendapatkan sekuen *trnL-F intergenic spacer*. Penggunaan sekuen *trnL-F intergenic spacer* digunakan untuk menganalisis filogeni varietas durian Pulau Kundur.

4.1.1. Hasil Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolasi DNA Genom

DNA genom berhasil diisolasi menggunakan metode CTAB (Vanijajiva, 2012) yang telah dimodifikasi Solikin *et al.* (2017). Kualitas hasil isolasi sampel DNA genom diamati melalui elektroforesis gel agarose 0,8% dan dijalankan (*running*) pada voltase 120 V selama 30 menit. Elektroforegram hasil isolasi sampel DNA genom disajikan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Elektroforegram hasil isolasi DNA genom 23 varietas Pulau Kundur Kepulauan Riau, 4 varietas durian lokal Indonesia dan 2 varietas durian Malaysia.

Uji kualitatif sampel DNA genom menunjukkan kualitas pita yang berbeda. Pita yang jelas, tebal, dan tanpa *smear* ditemukan pada varietas K14, K15, K16, K19, K22, K24, K26, K27, K30, B7, B8, dan B11. Beberapa pita terlihat tipis dan ada *smear* ditemukan pada K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K13, K17, B10, dan pita yang kurang terlihat jelas ditemukan pada varietas K9, K10, K11, K21, B9 dan B16. Hasil elektroforegram isolat DNA dengan pita genom tipis, kurang jelas, dan terdapat *smear* dilakukan proses isolasi DNA ulang. Hasil isolat DNA yang berkualitas merupakan DNA dengan pita jelas, tebal, dan sedikit *smear*.

Uji kuantitas menggunakan nano spektrofotometer untuk mengetahui kemurnian dan tingkat kontaminasi pada sampel DNA hasil isolasi (Tabel 4.1).

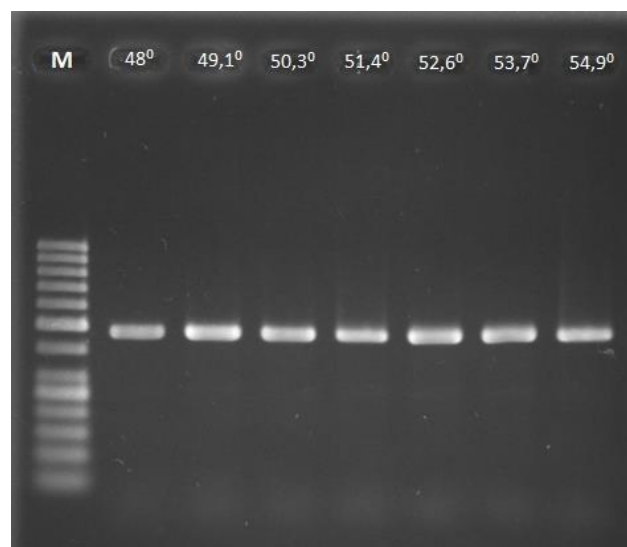
Tabel 4.1 Data kuantitas hasil isolasi DNA pada seluruh varietas

No	Kode Sampel	Nama Varietas	Konsentrasi (ng/ μ l)	Absorbansi λ 260/ λ 280 (nm)
1	K1	GSG	104,25	0,997
2	K2	Cuhut	101,95	0,953
3	K3	Angbak Tolo	109,00	0,993
4	K4	Angbak Kia 11	149,60	1,152
5	K5	Angbak Kia 03	102,40	0,999
6	K6	Huang Kwue Niam	92,55	0,954
7	K7	Pheng Kwai	90,30	1,993
8	K9	Te Lo Kha	190,05	1,138
9	K10	Phang Jing Lien	85,35	1,114
10	K11	HM	43,10	1,067
11	K13	Pondok	82,25	1,172
12	K14	GT	54,90	1,038
13	K15	Tongkat	94,35	1,021
14	K16	TR	127,25	1,289
15	K17	Asapan	96,85	1,168
16	K18	Mas pear	42,40	1,224
17	K19	Jongkong	45,30	1,127
18	K21	Durian Tawa	84,50	1,232
19	K22	Moncong	67,95	1,338
20	K24	Sumbat	53,30	1,349
21	K26	Empe	53,55	1,190
22	K27	Milah	57,50	1,176
23	K30	Layang	72,90	1,374
24	B7	Bawor	120,65	1,482
25	B8	Duri Hitam	141,25	1,292
26	B9	Musang King	84,65	1,080
27	B10	Pelangi	50,85	1,695
28	B11	Matahari	329,80	1,079
29	B16	Petruk	16,20	0,757

Nilai absorbansi pada panjang gelombang $\lambda 260/ \lambda 280$ nm dan konsentrasi DNA bervariasi pada seluruh varietas. Absorbansi DNA pada panjang gelombang $\lambda 260/ \lambda 280$ nm berkisar 0,757-1,933 dengan rata-rata 1,188. Konsentrasi DNA varietas berkisar 16,2-329,8 ng/ μ l dengan rata-rata 94,65 ng/ μ l. Konsentrasi DNA hasil isolasi diencerkan menjadi 30 ng/ μ l (Sidiq *et al.*, 2019). Hasil pengenceran (DNA *working*) digunakan sebagai DNA *template* pada tahap PCR.

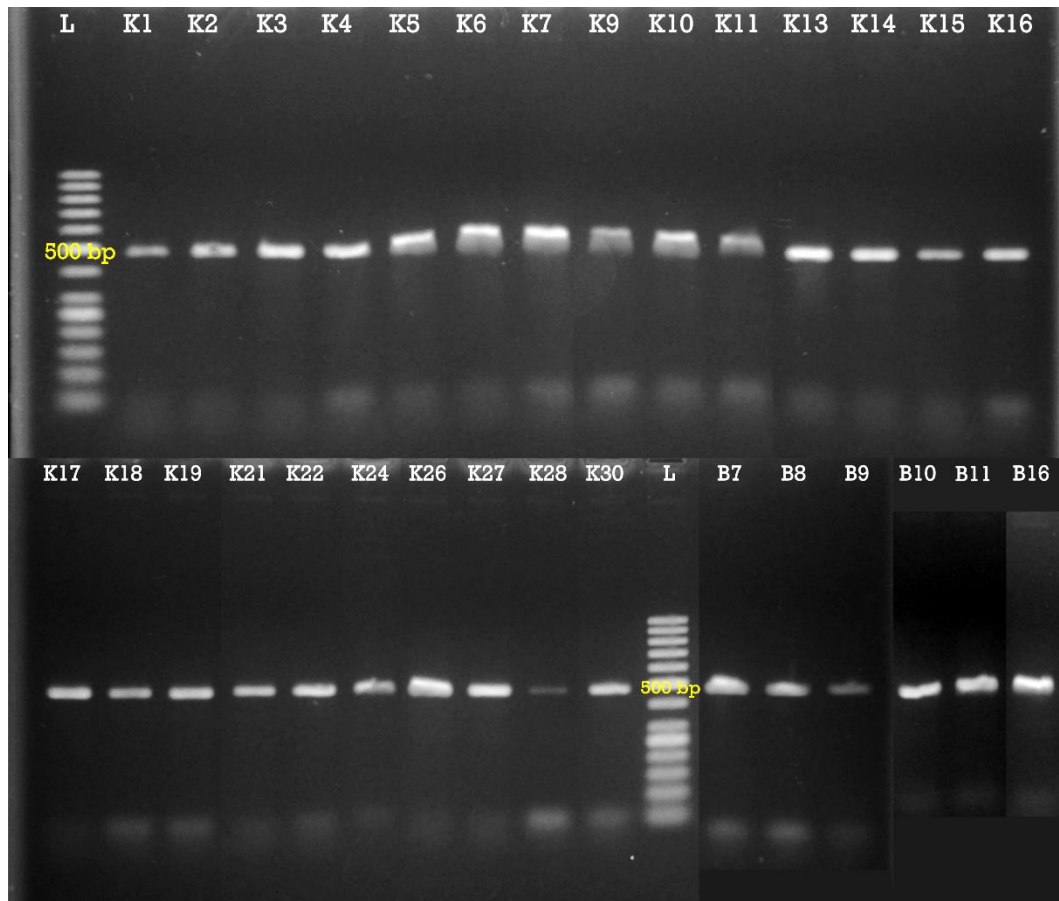
4.1.2. Hasil Optimasi PCR dan Amplifikasi DNA *trnL-F Intergenic Spacer*

Optimasi PCR dilakukan untuk mendapatkan hasil amplicon dengan pita jelas (*single band*), tebal dan tanpa *smear*. Optimasi suhu *annealing* primer *trnL-F* menggunakan program PCR *gradient* pada mesin *thermocycler*. Hasil optimasi suhu *annealing* primer *trnL-F* dilakukan elektroforesis pada gel agarose 2% selama 1 jam dengan voltase 75V, yang disajikan pada elektroforegram Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Elektroforegram optimasi suhu *annealing* primer *trnL-F* dengan suhu 48°C; 49,1°C; 50,3°C; 51,4°C; 52,6°C; 53,7°C; 54,9°C.

Hasil optimasi suhu *annealing* primer *trnL-F* paling optimal ditunjukkan pada suhu 51,4°C. Suhu *annealing* dan kondisi PCR ini digunakan untuk mengamplifikasi semua varietas. Amplifikasi DNA menggunakan primer *trnL-F* menghasilkan pita tunggal (*single band*) dan berukuran 500 bp (Gambar 4.3).



Gambar 4.3. Elektroforegram hasil amplifikasi primer *trnL-F reverse* dan *forward* pada semua varietas.

Beberapa varietas yang menunjukkan pita tipis atau tidak terlihat pita dilakukan kembali amplifikasi PCR. Beberapa pita yang terlihat bergelombang (*smiling*) disebabkan oleh tidak stabilnya listrik pada tahap elektroforesis.

4.1.3. Hasil Analisis Filogeni Sekuen *trnL-F Intergenic Spacer*

Hasil *sekuensing* di-*multiple alignment* menggunakan analisis MUSCLE pada MEGA7. Hasil *multiple alignment* disajikan pada Lampiran 2. Hasil *multiple alignment* sekuen *trnL-F intergenic spacer* menunjukkan adanya *gaps* (-) atau perbedaan basa pada letak tertentu dan adanya daerah *conserved region* (*).

Jenis mutasi insersi (*insertion*) terjadi pada urutan basa ke-34 hingga 36 (GGT) pada varietas B10; basa ke-57 (A) pada varietas B16; basa ke-391 (T) pada varietas K10; basa ke-420 (GAT) pada varietas K1; basa ke-472 (A) pada varietas B8, K24, dan B11. Jenis mutasi delesi (*deletion*) terjadi di urutan basa ke-11 (C) pada varietas K3, B8, K16, K7, K5, K30, K1, K21, K27, B9, K13; basa ke-492 (A) pada varietas K3, B8, K22, K30, K1, K9, B7, K4, K13, K17, K10, K24. Jenis

mutasi insesi delesi (indel) terjadi pada urutan basa ke-33 hingga 35 (A-GGA) pada varietas B16; basa ke-49 (A-T) pada varietas K21 dan K10; basa ke-49 (A-C) varietas K17; basa ke-354 (G-C) pada varietas B9; basa ke-196 dan 371 (G-A) pada varietas B11.

Hasil *multiple alignment* seluruh varietas durian dianalisis untuk mendapatkan informasi variasi basa AT dan basa GC, rekonstruksi pohon filogeni, dan analisis matriks jarak genetik. Persentase variasi basa konten AT dan GC hasil *multiple alignment* sekuen *trnL-F intergenic spacer* disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Persentase basa konten AT dan GC sekuen *trnL-F intergenic spacer*.

No	Sampel Uji	T(U) (%)	C (%)	A (%)	G (%)
1	K1 GSG	28,3	13,8	38,1	19,8
2	K2 Cuhut	28,0	14,2	38,3	19,5
3	K3 Angbak Tolo	27,9	14,1	38,2	19,7
4	K4 Angbak Kia 11	28,3	14,0	38,2	19,5
5	K5 Angbak Kia 03	28,1	13,8	38,4	19,7
6	K6 Huang Kwue Niam	28,2	14,0	38,5	19,2
7	K7 Pheng Kwai	28,0	13,8	38,3	19,9
8	K9 Te Lo Kha	28,2	14,3	38,2	19,3
9	K10 Phang Jing Lien	28,6	14,2	38,0	19,2
10	K11 HM	27,9	14,2	38,3	19,6
11	K13 Pondok	28,1	14,0	38,2	19,7
12	K14 GT	28,1	14,3	38,4	19,3
13	K15 Tongkat	28,2	14,0	38,4	19,4
14	K16 TR	28,1	14,0	38,2	19,7
15	K17 Asapan	28,3	14,3	38,2	19,3
16	K18 MasPear	28,2	14,0	38,3	19,5
17	K19 Jongkong	27,8	14,2	38,5	19,5
18	K21 Durian Tawa	28,2	14,2	38,0	19,6
19	K22 Moncong	28,1	14,3	37,9	19,7
20	K24 Sumbat	28,2	14,0	38,4	19,4
21	K26 Empe	28,0	14,4	38,4	19,2
22	K27 Milah	27,9	14,3	38,2	19,7
23	K30 Layang	28,3	13,8	38,2	19,7
24	B7 Bawor	28,1	14,3	38,2	19,5
25	B8 Duri Hitam	28,0	14,0	38,3	19,7
26	B9 Musang King	28,3	14,3	37,9	19,5
27	B10 Pelangi	27,5	14,1	38,5	19,9
28	B11 Matahari	28,3	13,9	38,9	18,9
29	B16 Petruk	27,9	13,9	38,7	19,5
	Rata – rata	28,1	14,1	38,3	19,5

Hasil *multiple alignment* 29 sekuen *trnL-F intergenic spacer* yang terdiri atas 23 varietas durian Pulau Kundur, 4 varietas durian lokal Indonesia, dan 2 varietas durian Malaysia diperoleh panjang urutan nukleotida 493 bp dengan rata-rata komposisi basa nukleotida terdiri atas 28,1% basa timin (T), 38,3% basa

adenin (A), 14,1% basa sitosin (C) dan 19,5% basa guanin (G) (Tabel 4.2). Sekuen *trnL-F intergenic spacer* seluruh varietas termasuk kategori kelompok kaya basa AT. Selain itu, nilai situs *conserved* sebesar 95,1% (469/493), nilai situs variabel sebesar 3,4% (17/493), dan nilai situs *parsimony informative* 1,5% (7/493).

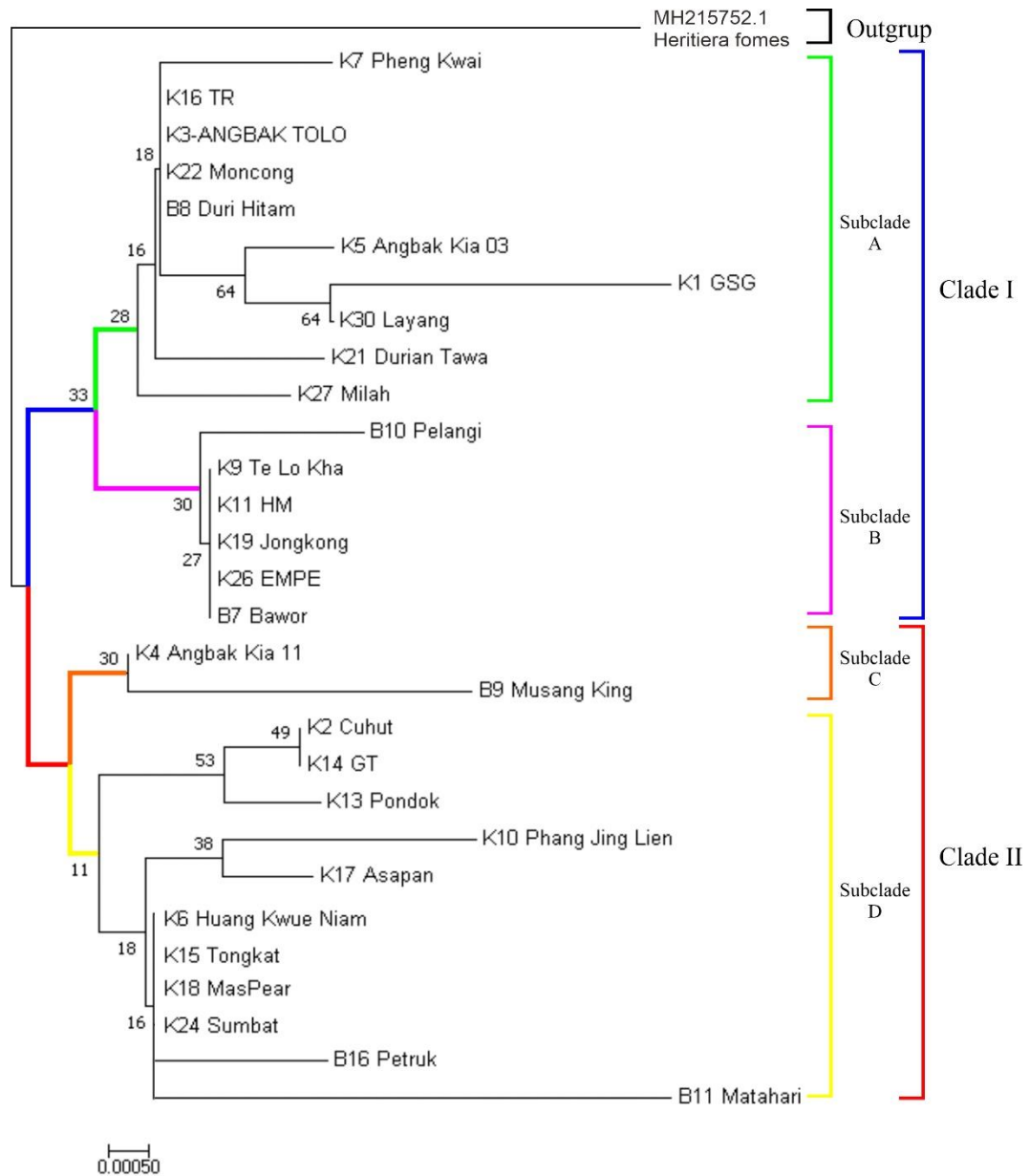
Hasil *multiple alignment* seluruh varietas dilakukan analisis untuk merekonstruksi pohon filogeni (*phylogram*). Rekonstruksi menambahkan sekuen *trnL-F intergenic spacer* spesies *Heritiera fomes* famili Malvaceae sebagai *outgroup* untuk menghasilkan polarisasi karakter pada *phylogram*. Sekuen *trnL-F intergenic spacer* spesies *Heritiera fomes* dengan nomer aksesori MH215752.1 diambil dari GenBank-NCBI (Dasgupta *et al.*, 2018). Hasil rekonstruksi pohon filogeni 30 sekuen *trnL-F intergenic spacer* yang terdiri atas 23 varietas durian Pulau Kundur, 4 varietas durian lokal Indonesia, 2 varietas durian Malaysia dan 1 sekuen *outgroup* disajikan pada Gambar 4.4.

Rekonstruksi pohon filogeni pada seluruh varietas menghasilkan 2 *clade* besar dan setiap *clade* memiliki 2 *subclade*. Pada *clade* 1 terbagi menjadi 2 *subclade*, *subclade* A terdiri atas 10 varietas dan *subclade* B terdiri atas 6 varietas. Pada *clade* 2 terbagi juga menjadi 2 *subclade*, *subclade* C terdiri atas 2 varietas dan *subclade* D terdiri atas 8 varietas. Selain itu, angka *bootstrap* yang muncul pada pohon filogeni relatif rendah yaitu berkisar 12%-62%.

Pohon filogeni yang terbentuk baik *clade* 1 maupun *clade* 2, terdapat beberapa varietas durian yang mengelompok menjadi satu cabang. Pada *subclade* A varietas durian Duri Hitam asal Malaysia (D8) mengelompok dengan varietas durian kundur yaitu Angbak Tolo (K3), TR (K16), Pheng Kwai (K7), dan Moncong (K22) dengan nilai *bootstrap* 15%. Namun, pada *clade* ini varietas durian Pheng Kwai (K7) memiliki ruas (*node*) yang lebih panjang dari varietas lain dalam satu cabang. Pada *subclade* B varietas durian lokal Indonesia, Bawor (B7) mengelompok dengan varietas durian kundur Jongkong (K19), HM (K11), dan Te Lo Kha (K9) dengan nilai *bootstrap* 24%. Selain itu, pada *subclade* C varietas durian Musang King (B9) asal Malaysia mengelompok dengan varietas durian kundur Angbak Kia 11 (K4) dengan nilai *bootstrap* 37%. Namun, varietas durian Musang King (B9) memiliki *node* yang lebih panjang daripada varietas

durian Angbak Kia 11 (K4). Pada *subclade* D varietas durian lokal Indonesia, Petruk (B16) dan Matahari (B11) mengelompok dengan varietas durian kundur Sumbat (K24), MasPear (K18), Tongkat (K15), dan Huang Kwue Niam (K6) nilai *bootstrap* 14%. Ruas cabang terpanjang pohon filogeni ditunjukkan pada varietas durian Musang King (B9) asal Malaysia, durian GSG (K1) dan durian Phang Jing Lien (K10) asal Kundur, juga varietas lokal Indonesia durian Petruk (B16) dan durian Matahari (B11).

Hasil *multiple alignment* seluruh varietas dilakukan analisis *pairwise distance* untuk mengetahui jarak genetik antar varietas satu dengan yang lain. Hasil analisis *pairwise distance* disajikan pada tabel matriks jarak genetik (Tabel 4.3). Hasil analisis jarak genetik antar varietas durian beragam. Jarak genetik paling besar terdapat pada varietas B11 dengan varietas K1 yaitu 0,0169, sedangkan jarak genetik terkecil dengan nilai 0,0000 terdapat pada varietas K2 dengan K14; K3 dengan B8; K6 dengan K18; K9 dengan K10, K19, K26; K11 dengan K19, K26, B7; K15 dengan K18, K24; K16 dengan K22, B8; K18 dengan K24, K19 dengan K26, B7; K22 dengan B8, dan K26 dengan B7.



Gambar 4.4 Rekonstruksi pohon filogeni *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1000 kali ulangan sekuen *trnL-F intergenic spacer*.

Tabel 4.3 Matriks jarak genetik (*pairwise distance*) *multiple alignment* sekuen *trnL-F intergenic spacer* seluruh varietas.

	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K9	K10	K11	K13	K14	K15	K16	K17	K18	K19	K21	K22	K24	K26	K27	K30	B7	B8	B9	B10	B11	B16	
K1																														
K2	0,0127																													
K3	0,0064	0,0064																												
K4	0,0085	0,0042	0,0021																											
K5	0,0064	0,0085	0,0021	0,0042																										
K6	0,0106	0,0021	0,0042	0,0021	0,0064																									
K7	0,0085	0,0085	0,0021	0,0042	0,0042	0,0064																								
K9	0,0085	0,0042	0,0021	0,0042	0,0042	0,0021	0,0042																							
K10	0,0127	0,0064	0,0085	0,0064	0,0106	0,0042	0,0106	0,0064																						
K11	0,0085	0,0042	0,0021	0,0042	0,0042	0,0021	0,0042	0,0000	0,0064																					
K13	0,0106	0,0021	0,0042	0,0021	0,0064	0,0042	0,0064	0,0064	0,0085	0,0064																				
K14	0,0127	0,0000	0,0064	0,0042	0,0085	0,0021	0,0085	0,0042	0,0064	0,0042	0,0021																			
K15	0,0106	0,0021	0,0042	0,0021	0,0064	0,0000	0,0064	0,0021	0,0042	0,0021	0,0042	0,0021																		
K16	0,0064	0,0064	0,0000	0,0021	0,0021	0,0042	0,0021	0,0021	0,0085	0,0021	0,0042	0,0064	0,0042																	
K17	0,0127	0,0042	0,0064	0,0042	0,0085	0,0021	0,0085	0,0042	0,0042	0,0042	0,0064	0,0042	0,0021	0,0064																
K18	0,0106	0,0021	0,0042	0,0021	0,0064	0,0000	0,0064	0,0021	0,0042	0,0021	0,0042	0,0021	0,0000	0,0042	0,0021															
K19	0,0085	0,0042	0,0021	0,0042	0,0042	0,0021	0,0042	0,0000	0,0064	0,0000	0,0064	0,0042	0,0021	0,0021	0,0042	0,0021														
K21	0,0085	0,0085	0,0021	0,0042	0,0042	0,0064	0,0042	0,0042	0,0064	0,0042	0,0064	0,0085	0,0064	0,0021	0,0064	0,0064	0,0042													
K22	0,0064	0,0064	0,0000	0,0021	0,0021	0,0042	0,0021	0,0021	0,0085	0,0021	0,0042	0,0064	0,0042	0,0000	0,0064	0,0042	0,0021	0,0021												
K24	0,0106	0,0021	0,0042	0,0021	0,0064	0,0000	0,0064	0,0021	0,0042	0,0021	0,0042	0,0021	0,0000	0,0042	0,0021	0,0000	0,0021	0,0064	0,0042											
K26	0,0085	0,0042	0,0021	0,0042	0,0042	0,0021	0,0042	0,0000	0,0064	0,0000	0,0064	0,0042	0,0021	0,0021	0,0042	0,0021	0,0000	0,0042	0,0021	0,0021										
K27	0,0085	0,0085	0,0021	0,0042	0,0042	0,0064	0,0042	0,0042	0,0106	0,0042	0,0064	0,0085	0,0064	0,0021	0,0085	0,0064	0,0042	0,0042	0,0021	0,0064	0,0042									
K30	0,0042	0,0085	0,0021	0,0042	0,0021	0,0064	0,0042	0,0042	0,0106	0,0042	0,0064	0,0085	0,0064	0,0021	0,0085	0,0064	0,0042	0,0042	0,0021	0,0064	0,0042	0,0042								
B7	0,0085	0,0042	0,0021	0,0042	0,0042	0,0021	0,0042	0,0000	0,0064	0,0000	0,0064	0,0042	0,0021	0,0021	0,0042	0,0021	0,0000	0,0042	0,0021	0,0021	0,0000	0,0042	0,0042							
B8	0,0064	0,0064	0,0000	0,0021	0,0021	0,0042	0,0021	0,0021	0,0085	0,0021	0,0042	0,0064	0,0042	0,0000	0,0064	0,0042	0,0021	0,0021	0,0000	0,0042	0,0021	0,0021	0,0021	0,0021	0,0021					
B9	0,0127	0,0085	0,0064	0,0042	0,0085	0,0064	0,0085	0,0085	0,0106	0,0085	0,0064	0,0085	0,0064	0,0064	0,0085	0,0064	0,0064	0,0085	0,0085	0,0064	0,0064	0,0085	0,0085	0,0085	0,0085	0,0064				
B10	0,0106	0,0064	0,0042	0,0064	0,0064	0,0042	0,0064	0,0021	0,0085	0,0021	0,0085	0,0064	0,0042	0,0042	0,0064	0,0042	0,0021	0,0064	0,0042	0,0042	0,0021	0,0042	0,0064	0,0021	0,0042	0,0106				
B11	0,0189	0,0085	0,0106	0,0085	0,0127	0,0064	0,0127	0,0085	0,0106	0,0085	0,0106	0,0085	0,0106	0,0085	0,0064	0,0106	0,0085	0,0127	0,0106	0,0064	0,0085	0,0127	0,0127	0,0085	0,0106	0,0127	0,0106			
B16	0,0127	0,0042	0,0064	0,0042	0,0085	0,0021	0,0085	0,0042	0,0064	0,0042	0,0064	0,0042	0,0021	0,0064	0,0042	0,0021	0,0042	0,0085	0,0064	0,0021	0,0042	0,0085	0,0085	0,0042	0,0064	0,0085	0,0064	0,0085		

4.2. Bahasan

4.2.1. Bahasan Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolasi DNA Genom

Hasil kualitas DNA genom 29 varietas durian memperlihatkan pita DNA tipis hingga tebal dan masih terdapat *smear*. *Smear* digambarkan seperti bayangan semu atau bagian lain dari pita genom pada elektroforegram genom DNA (Gambar 4.1). *Smear* pada elektroforegram menunjukkan isolat DNA dalam kondisi tidak utuh atau pita DNA genom terpotong potong oleh aktivitas enzim endonuklease, dan juga disebabkan oleh kontaminan DNA seperti kandungan polisakarida tinggi (Sari & Murti, 2015). *Smear* menunjukkan bahwa masih terdapat sisa (*debris*) proses ekstraksi DNA.

Debris atau sisa proses isolasi merupakan kontaminan DNA yang mempengaruhi kemurnian dan konsentrasi DNA. Polisakarida adalah salah satu *debris* penyebab *smear* pada hasil isolasi DNA genom. Senyawa ini merupakan sisa proses ekstraksi DNA tumbuhan dan cenderung mengendap bersama DNA didalam alkohol, tersisa sebagai kontaminan dalam ekstrak akhir, dan menghambat aktivitas polimerase (Sahu *et al.*, 2012). Senyawa fenol juga merupakan kontaminan terbesar pada tanaman tropis (Wang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013) khususnya durian. Senyawa fenol mudah teroksidasi untuk membentuk kuinon yang terkait secara kovalen, mengikat asam nukleat dan protein membentuk kompleks yang memberikan warna coklat pada isolat DNA (Sahu *et al.*, 2012). Kedua kontaminan ini sangat mengurangi kualitas DNA dan menghambat proses analisis molekuler lain seperti amplifikasi, retriaksi, *sekuensing* dengan cara menghambat kerja polimerase atau endonuklease (Restu *et al.*, 2012; Osen *et al.*, 2017).

Modifikasi metode isolasi DNA genom diperlukan untuk meminimalkan jumlah kontaminan dan memaksimalkan kualitas DNA. Modifikasi dalam penelitian ini adalah penggunaan senyawa kimia selama proses isolasi DNA. Penggunaan nitrogen cair pada tahap penghancuran sampel mempermudah proses ekstraksi DNA dan mempertahankan DNA di dalam sel tumbuhan (Osen *et al.*, 2017; Agbagwa *et al.*, 2012). Penggunaan senyawa *beta-mercaptoetanol* dalam tahapan ekstraksi DNA bertujuan menghambat oksidasi fenolik terhadap asam nukleat. Penggunaan *buffer* CTAB berguna untuk menghilangkan kandungan

polisakarida dan memisahkannya dari dinding sel dalam tahap ekstraksi DNA, sedangkan penggunaan PVP dapat mengurangi oksidasi akibat kandungan fenol pada daun muda (Surzycki. 2000; Restu *et al.*, 2012).

Hal-hal secara teknik juga dapat mempengaruhi kualitas hasil isolasi DNA. Teknik pengambilan supernatan pada tahap pemisahan DNA dengan *debris* berpengaruh pada isolat DNA yang didapat. Selain itu, teknik pembuangan supernatan ketika tahap purifikasi untuk mendapatkan pelet juga perlu dilakukan dengan teliti dan hati hati. *Debris* yang ikut terambil akan mempengaruhi konsentrasi dan kemurnian isolat DNA.

Hasil isolasi DNA genom dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA. Nilai absorbansi (kemurnian) dan konsentrasi DNA pada panjang gelombang $\lambda 260/\lambda 280$ nm bervariasi pada seluruh varietas. DNA dapat menyerap sinar UV maksimal pada panjang gelombang 260 nm, protein dapat menyerap pada panjang gelombang 280 nm, dan kontaminan lainnya seperti karbohidrat, fenol, senyawa aromatik umumnya menyerap pada panjang gelombang 230 nm. Rasio A260/A280 dan A260/A230 sering digunakan sebagai indikator kemurnian DNA sampel. Secara umum, nilai rasio A260/A280 dalam kisaran 1,8 - 2,0 menunjukkan DNA dengan kemurnian tinggi (Sambrook *et al.*, 1989; Pervaiz *et al.*, 2011), kurang dari 1,8 menunjukkan kontaminasi protein pada DNA, dan lebih dari 2,0 mengindikasikan banyak terdapat fragmen RNA dalam isolat DNA (Wang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013; Abdel-Latif & Osman. 2017 ; Osen *et al.*, 2017).

4.2.2 Bahasan Optimasi PCR dan Amplifikasi DNA *trnL-F Intergenic Spacer*

Amplifikasi DNA untuk mendapatkan fragmen *trnL-F intergenic spacer* merupakan salah satu bagian dari analisis filogeni durian Pulau Kundur. Kurniawati & Hartati (2018) menyatakan bahwa amplifikasi DNA dengan metode PCR merupakan cara sederhana dan efisien dalam mengamplifikasi fragmen DNA spesifik dari suatu DNA genom. Keberhasilan amplifikasi fragmen DNA bergantung pada tahap penempelan primer (*annealing*) pada untai DNA genom. (Zein & Prawiradilaga, 2013).

Hasil optimasi suhu *annealing* primer *trnL-F* relatif sama pada semua suhu *gradient* PCR yang digunakan. Berdasarkan hasil penelitian pada beberapa

tanaman yang menggunakan primer *trnL-F intergenic spacer*, suhu *annealing* yang digunakan berkisar dari 48°C - 52°C, yaitu 48,6 °C pada *Mangifera sp* (Fitmawati *et al.*, 2017), 49 °C pada famili Annonaceae (Zhou *et al.*, 2010), 52 °C pada genus *Bouea* famili Anacardiaceae (Harsono *et al.*, 2017), dan 52 °C pada varietas *Musa spp* (Retnoningsih *et al.*, 2014). Suhu *annealing* suatu primer juga dapat diketahui melalui nilai *temperature melting*. *Temperature melting* (TM) adalah suhu yang dibutuhkan untuk melepas 50% untai DNA (Handoyo & Rudiretna, 2001). Apabila ikatan hidrogen pasangan basa guanin (G) dan sitosin (C) lebih banyak daripada pasangan basa adenin (A) dan timin (T), maka semakin tinggi suhu yang dibutuhkan untuk mengurai ikatan hidrogennya. Apabila suhu *annealing* yang digunakan tidak optimal (terlalu rendah atau terlalu tinggi), primer akan mengamplifikasikan fragmen DNA yang tidak spesifik atau tidak akan mengamplifikasi fragmen DNA target. Jika dilihat di elektroforegram, akan muncul pita ganda (*double band*) yang tidak sesuai target atau tidak akan muncul pita. Artinya primer menempel pada daerah bukan target atau primer tidak menempel pada DNA *template* (Rychlik *et al.*, 1990; Kurniawati & Hartati, 2018).

Amplikon *trnL-F intergenic spacer* seluruh varietas durian menunjukkan hasil yang berkualitas. Hal ini sesuai dengan pernyataan Restu *et al.* (2012), bahwa amplikon berkualitas ditunjukkan dengan pita DNA terlihat tebal dan tanpa ada *smear*. Amplikon *trnL-F intergenic spacer* seluruh varietas durian juga menunjukkan pita berukuran berkisar 500 bp. Hasil ini sesuai dengan penelitian Tsai *et al.* (2006), Hidayat *et al.* (2008), Dong *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa ukuran dari fragmen *trnL-F intergenic spacer* kurang dari 700 bp.

4.2.3. Bahasan Analisis Filogeni Sekuen *trnL-F Intergenic Spacer*

Hasil *multiple alignment* sekuen *trnL-F intergenic spacer* seluruh varietas menunjukkan tingkat homologi atau nilai kesamaan basa nukleotida yang tinggi sebesar 95,1%. Nilai ini menunjukkan karakter atau basa nukleotida sekuen *trnL-F intergenic spacer* memiliki kesamaan tinggi pada seluruh varietas durian yang merupakan takson di bawah jenis. Nilai ini hampir sama dengan tingkat homologi sekuen *trnL-F intergenic spacer* sebesar takson di bawah jenis pada varietas pisang Indonesia yang lebih dari 95 % (Retnoningsih *et al.*, 2014). Tingginya nilai

homologi sekuen *trnL-F intergenic spacer* karena kedekatan kekerabatan antar takson varietas durian dan mutasi yang terjadi sangat kecil.

Mutasi pada hasil *multiple alignment* digambarkan dengan adanya *gaps* (tanda -) atau merupakan mutasi jenis insersi dan delesi (indel). Perubahan basa nukleotida taksa di bawah jenis sangat jarang terjadi (Retnoningsih *et al.*, 2014). Laju mutasi sekuen *trnL-F intergenic spacer* seluruh varietas durian menunjukkan nilai yang rendah yaitu hanya sebesar 4,9%. Nilai ini sama rendahnya dengan hasil filogeni tumbuhan pada penanda yang sama (Retnoningsih *et al.*, 2014) dan nilainya jauh lebih rendah dibandingkan filogeni spesies mangga di Indonesia (Fitmawati & Hartana, 2010). Laju mutasi berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer* diketahui lebih tinggi pada takson tinggi (spesies ke atas) dibandingkan takson rendah (varietas ke bawah). Hal ini karena jumlah mutasi basa pada tingkat varietas sangat kecil dibandingkan mutasi yang terjadi pada tingkat spesies ataupun genus.

Hasil *multiple alignment* sekuen *trnL-F intergenic spacer* pada penelitian ini dikategorikan sebagai kelompok kaya akan basa AT. Hasil ini sesuai dengan penelitian Li (1997), Fitmawati & Hartana (2010), Harsono *et al.* (2017), dan Fitmawati *et al.* (2017), sebagian besar komposisi nukleotida di daerah *non-coding* cpDNA adalah basa adenin dan timin. Besarnya komposisi basa ini menggambarkan tingginya pengulangan dan variasi basa AT pada daerah *non-coding* cpDNA (Bonatelli *et al.*, 2013). Hal ini berakibat pada laju mutasi indel, sehingga informasi mutasi basa yang terjadi meskipun kecil sangat berguna untuk menganalisis hubungan filogeni varietas durian pada penelitian ini.

Sifat cpDNA yang konservatif, memungkinkan laju mutasi yang terjadi lebih rendah dibandingkan dengan mtDNA (Avisé, 2009; Bonatelli *et al.*, 2013) dan nDNA (Taberlet *et al.*, 1991; Hidayat & Pancoro, 2001; Fitmawati & Hartana, 2010; Fibriana & Hadiyanti, 2016). Meskipun cpDNA bersifat konservatif, namun sekuen *trnL-F intergenic spacer* merupakan daerah *non-coding* yang laju mutasinya lebih tinggi dibandingkan daerah *coding* pada cpDNA (Hapsari *et al.*, 2019). Gielly & Taberlet (1994), melaporkan bahwa daerah *trnL-F intergenic spacer* (*non-coding*) memiliki laju mutasi 1.93–1.72 kali lebih tinggi daripada daerah *rbcL* (*coding*). Sekuen dengan laju mutasi yang tinggi sangat cocok untuk

menganalisis filogeni takson rendah (varietas ke bawah) (Kojoma *et al.*, 2002; Okoura & Harada., 2002; Yi *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2004; Pleines *et al.*, 2009; Fitmawati *et al.*, 2017). Perubahan basa yang terjadi mempresentasikan laju mutasi dalam jangka waktu yang cukup lama (Fitmawati & Hartana, 2010).

Pohon filogeni (*phylogram*) hasil analisis *Neighbor-Joining* menunjukkan varietas durian pada penelitian ini membentuk cabang yang parafiletik, artinya seluruh varietas durian pada penelitian ini berasal dari keturunan nenek moyang yang berbeda. Percabangan terbentuk pertama kali pada *clade* 1 dan *clade* 2 karena adanya mutasi indel pada urutan basa ke-42 di *clade* 2 yaitu basa C mutasi menjadi basa T. Varietas Duri Hitam asal Malaysia mengelompok dalam satu cabang dengan varietas kundur (TR, Angbak Tolo, Moncong) dengan nilai jarak genetik adalah 0 (Tabel 4.3). Selain itu, pada *subclade* B varietas Bawor lokal Indonesia mengelompok menjadi satu cabang dengan beberapa varietas kundur (Te Lo Kha, HM, Jongkong, Empe) dengan nilai jarak genetik 0. Artinya varietas Duri Hitam dan Bawor mungkin memiliki kekerabatan yang dekat dengan beberapa varietas durian kundur tersebut. Varietas Durian Tawa dan Milah masing masing memisah secara monofiletik dengan varietas lain di *subclade* A karena mutasi indel pada basa ke-43 (T-C) di varietas Milah dan basa ke-49 (A-T) di varietas Durian Tawa. Sama halnya dengan varietas Pelangi juga memisah secara monofiletik dengan beberapa varietas dalam *subclade* B, karena pada varietas Pelangi ini terjadi mutasi insersi pada basa ke-34 hingga 36 (GGT).

Pada *subclade* C varietas Musang King asal Malaysia diduga berkerabat dekat dengan varietas kundur Angbak Kia 11 karena mengelompok dalam satu cabang yang sama. Namun, varietas Musang King memiliki panjang cabang (*node*) yang lebih panjang daripada varietas Angbak Kia 11 (0,0042). Hal ini diduga karena pada varietas Musang King terjadi mutasi indel pada basa ke-354 (G-C) dan insersi basa adenin pada basa ke-491. Selain itu, pada *subclade* D varietas Matahari dan Petruk juga diduga berkerabat dekat dengan beberapa varietas durian kundur (Huang Kwue Niam, Tongkat, Maspear, Sumbat). Hal ini dikarenakan varietas Matahari dan Petruk mengelompok dalam satu cabang dengan beberapa varietas kundur tersebut. Namun, sama halnya dengan varietas Musang King, varietas Matahari dan Petruk juga memiliki *node* yang lebih

panjang dari beberapa varietas kundur tersebut, dengan masing masing panjangnya 0,0064 dan 0,0021. Hal ini diduga karena pada varietas Matahari terjadi indel pada basa ke-37 (G-T); insersi basa adenin pada basa ke-135 dan 472; insersi basa guanin pada basa ke-478; indel pada basa ke-196 dan ke-371 (G-A). Pada varietas Petruk terjadi indel pada basa ke-33 (G-A) dan insersi basa GA pada basa ke-34 juga 35; insersi basa adenin pada basa ke-57 dan 135.

Panjang cabang (*node*) pohon filogeni varietas Musang King, Matahari, dan Petruk menunjukkan nilai jarak genetik lebih besar dibandingkan dengan varietas lain dalam satu cabang atau kelompok tersebut. Meskipun dikelompokkan dalam satu cabang tetapi laju mutasi yang terjadi berbeda. Pohon filogeni yang dibentuk dengan menggunakan metode *Neighbor-joining* termasuk dalam metode jarak genetik dengan prinsip pengelompokkan taksa berdasarkan nilai jarak evolusioner dimana setiap percabangan yang terbentuk dalam pohon filogeni berevolusi pada kecepatan yang tidak sama (Hartl, 2000).

Berdasarkan *phylogram Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987) dengan panjang cabang maksimal 0,0423 menunjukkan bahwa cabang terpanjang (0,0064) terdapat pada varietas durian Matahari (B11). Hal ini menunjukkan bahwa varietas B11 diduga menjadi *common ancestor* atau tetua varietas durian dalam penelitian ini berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer*. Panjang cabang (*node*) menggambarkan jarak genetik dan konsiderasi umur molekuler (*molecular clock*) (Fitmawati & Hartana, 2010).

Nilai *bootstrap* pada *phylogram Neighbor-Joining* varietas durian menunjukkan angka yang rendah. Nilai *bootstrap* rendah artinya percabangan yang terbentuk di pohon filogeni dapat berubah apabila spesies baru ditambahkan, tetapi percabangan yang terbentuk tetap memperlihatkan perbedaan (Widyastuti, 2016). Metode *bootstrap* dilakukan untuk mengevaluasi kestabilan cabang pohon filogeni. Suatu cabang dikatakan stabil jika nilai *bootstrap* di atas 95% dan dikatakan tidak stabil jika nilai *bootstrap* berada di bawah 70% (Nakano & Osawa, 2004). Seluruh varietas durian masing-masing membentuk cabang yang kurang stabil karena memiliki nilai *bootstrap* di bawah 64% sehingga dapat diartikan bahwa setiap pengulangan dari konstruksi pohon filogeni dapat membentuk hasil percabangan yang berbeda. Selain itu, nilai *bootstrap* juga dapat

diartikan sebagai tolak ukur penentu tingkat kepercayaan pohon filogeni (Dharmayanti, 2011). Semakin besar nilai *bootstrap* yang ditunjukkan, semakin tinggi tingkat kepercayaan pohon filogeni yang dibentuk (Nei & Kumar, 2000; Hall, 2001).

Nilai jarak genetik (*p-distance*) pada Tabel 4.3 menunjukkan nilai perbedaan jarak genetik antar dua varietas durian berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer*. Semakin tinggi nilai jarak genetik, menunjukkan semakin jauh kesamaan dan kekerabatan antar dua varietas. Nilai jarak genetik 0 menunjukkan kedua varietas memiliki kekerabatan dekat dan kesamaan sekuennya mirip, sedangkan nilai jarak genetik lebih dari 0 hingga 1 menunjukkan perbedaan antar dua varietas. Nilai jarak genetik yang semakin besar dalam populasi atau varietas menunjukkan semakin terisolasi antara varietas satu dengan lainnya. Jarak genetik menunjukkan kemungkinan adanya pengaruh geografis terhadap populasi (Laltanpuui *et al.*, 2014). Namun dalam penelitian ini, berdasarkan *phylogram* varietas durian tidak mengelompok sesuai dengan wilayah populasinya (filogeografi). Selain itu, semakin panjang cabang (*node*) pohon filogeni atau semakin besar nilai jarak genetik antar varietas satu dengan yang lain, berarti semakin besar laju mutasi yang terjadi dan semakin jauh kekerabatan antar dua varietas tersebut.

Hasil analisis filogeni berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer* pada penelitian ini sangat berbeda dengan penanda morfologi yang digunakan Habibah *et al.* (2019). Tingkat kekerabatan dan evolusi yang terjadi pada sekuen *trnL-F intergenic spacer* cpDNA tidak bisa dikaitkan dengan karakter morfologi (Fitmawati & Hartana, 2010; Fitmawati *et al.*, 2013; Harsono *et al.*, 2017; Fitmawati *et al.*, 2017). Karakter yang muncul berdasarkan penanda cpDNA tidak selalu bisa dikaitkan dengan karakter yang dihasilkan oleh penanda morfologi, dan berlaku sebaliknya. Hal ini dikarenakan ekspresi sifat dari karakter morfologi merupakan hasil perkawinan antara induk betina dan jantan (paternal) serta terdapat pengaruh lingkungan, sedangkan karakter cpDNA diwariskan secara langsung dari induk betina (maternal) (Harsono *et al.*, 2017).

Variasi genetik durian yang tinggi di Pulau Kundur dalam penelitian Habibah *et al.* (2019), dimungkinkan karena terdapat peranan lingkungan. Dimana

faktor lingkungan dapat mempengaruhi fenotipe yang terekspresikan (Wang *et al.*, 2012), sehingga ditemukan perbedaan karakter morfologi yang mengakibatkan variasi genetik durian Kundur menjadi tinggi. Selain dari faktor lingkungan, terjadinya mutasi sangat dimungkinkan menjadi penyebab variasi genetik durian Kundur tinggi. Berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer*, mutasi yang terjadi sangat jelas ditunjukkan pada hasil *multiple alignment*, seluruh sampel varietas durian tidak ada yang memiliki sekuen/urutan basa nitrogen yang sama.

Wilayah Pulau Kundur memiliki letak geografis yang dekat dengan Sumatera, Kalimantan, Malaysia, dan Singapura. Variasi genetik durian yang tinggi dapat terjadi karena sumber daya genetik durian berasal dari dalam maupun luar Pulau Kundur. Peran manusia yang membawa bibit dan biji durian asing masuk Pulau Kundur diduga menjadi alasan masuknya sumber daya genetik durian dari luar. Penyebaran dan perbanyakan durian melalui biji (hasil perkawinan generatif) juga menyebabkan tingginya variasi genetik durian (Lestari *et al.*, 2011) karena setiap biji memiliki genotipe yang berbeda. Setiap biji dari buah durian mengandung embrio hasil pembuahan dari satu sel sperma dan satu sel telur. Sifat polinasi terbuka pada durian mengakibatkan sel telur dapat menerima sel sperma dari pohon durian itu sendiri (*self-pollination*) atau sel sperma dari pohon durian lain (*cross pollination*) (Indriyani *et al.*, 2012). Polinasi tersebut dapat dibantu kelelawar, lebah, dan burung. Namun, sebagian besar penyerbukan autogami (penyerbukan yang terjadi ketika serbuk sari dan putik berasal dari satu bunga yang sama) pada durian sangat rendah tingkat keberhasilannya (*self incompatible*) (Bumrungsri *et al.*, 2009).

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Analisis Filogeni berdasarkan sekuen *trnL-F intergenic spacer*, homologi sekuen, jarak genetik, dan pohon filogeni menunjukkan beberapa varietas durian Pulau Kundur memiliki kekerabatan dekat dan memiliki hubungan keturunan nenek moyang yang sama dengan varietas durian Malaysia maupun lokal Indoneisa. Beberapa varietas durian yang diperkirakan memiliki kekerabatan dan juga berasal dari keturunan nenek moyang sama adalah varietas Duri Hitam (B8) Malaysia dengan varietas kundur TR (K16), Angbak Tolo (K3), Moncong (K22), Pheng Kwai (K7); varietas Bawor (B7) lokal Indonesia dengan varietas kundur Te lo Kha (K9), HM (K11), Jongkong (K19), Empe (K26); varietas Musang King (B9) Malaysia dengan varietas kundur Angbak Kia 11 (K4); varietas Petruk (B16) dan Matahari (B11) lokal Indonesia dengan varietas kundur Huang Kwue Niam (K6), Tongkat (K15), MasPear (K18), Sumbat (K24). Varietas Matahari (B11) dalam penelitian ini diduga menjadi *common ancestor* karena memiliki umur molekuler yang lebih lama daripada varietas durian lainnya.

5.2. Saran

1. Analisis filogeni varietas durian Pulau Kundur dapat dikembangkan dengan menggunakan sekuen cpDNA lain baik *non-coding* maupun *coding* agar dapat menunjukkan informasi filogeni yang lebih banyak pada tingkat taksonomi rendah.
2. Penelitian lebih lanjut dibutuhkan untuk mengkaji filogeografi populasi durian Pulau Kundur dengan populasi di daerah lain seperti di Jawa, Kalimantan, Sumatra maupun Malaysia dan Singapura.

DAFTAR PUSTAKA RUJUKAN

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of Three Genomic DNA Extraction Methods to Obtain High DNA Quality from Maize. *Plant Methods*, 13(1), 1-9.
- Abdullah, F.M., Shahzadi, I., Waseem, S., Mirza, B., Ahmed, I., & Waheed, M.T. (2019). Chloroplast Genome of *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae): Comparative Analyses and Identification of Mutational Hotspots. *Genomics*, 1(1), 1-10.
- Agbagwa, I.O., Datta, S., Patil, P.G., Singh, P., & Nadarajan, N. (2012). A Protocol for Highquality Genomic DNA Extraction from Legumes. *Genet Mol Res*, 11(4), 4632–4639.
- Avise, J.C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal Biogeogr.* 36(1), 3-15.
- Badan Pusat Statistik. (2019). Statistik Tanaman Buah-buahan dan Sayuran Tahunan Indonesia 2018. Tersedia di <https://www.bps.go.id/publication/2019/10/07/1846605363955649c9f6dd6d/statistik-tanaman-buah-buahan-dan-sayuran-tahunan-indonesia-2018.html> [diakses 3/18/19]
- Barcaccia, G., Nicole, S., & Lucchin, M. (2007). Assessing Distinctiveness of Crop Plat Species and Varieties Through DNA Barcoding. Proceeding of the 51st Italian Society of Agricultural Genetics Annuals Cronggress Riva del Garda, Italy 23–26 September 2007.
- Bonatelli, I.A.S. Zappi, D.C. Taylor, N.P. & Moraes, E.M. (2013). Usefulness of cpDNA markers for phylogenetic and phylogeographic analyses of closely related cactus species. *Genetics and Molecular Research*, 12 (4), 4579-4585.
- Brown, M.J. (1997). *Durio* Bibliography Review. IPGRI. APO (Regional Officer for Asia, The Pacific, and Oceania).
- Buerki, S., Martin W.C., Dion S.D., Lauren, C., Jérôme, & M., Thoma, H. (2012). Straightening Out the Screw-pines: A First Step in Understanding Phylogenetic Relationships Within *Pandanaceae*. *Taxon*, 61(5), 1010–1020.
- Bumrungsri, S., E. Sripaoraya, T. Chongsiri, K. Sridith, & P.A. Racey. (2009). The Pollination Ecology of Durian (*Durio zibethinus*, Bombacaceae) in Southern Thailand. *Journal of Tropical Ecology*, 25, 85-92.
- Callmander, M. W., Booth, T. J., Beentje, H., & Buerki, S. (2013). Update on the systematics of Benstonea (*Pandanaceae*): When a visionary taxonomist foresees phylogenetic relationships. *Phytotaxa*, 112(2), 57–60.

- Callmänder, M. W., Lowry, P. P., Forest, F., Devey, D. S., Beentje, H., & Buerki, S. (2012). *Benstonea* Callm. & Buerki (*Pandanaceae*): Characterization, circumscription, and distribution of a new genus of screw-pines, with a synopsis of accepted species. *Candollea*, 67(2).
- Chen, C.W., Huang, Y.M., Kuo, L.Y., Nguyen, Q.D., Luu, H.T., Callado, J.R., Farrar, D.R. & Chiou, W.L. (2013). *trnL-F* is a powerful marker for DNA identification of field vittarioid gametophytes (*Pteridaceae*). *Annals of Botany*, 1(1), 1-11.
- Chiang, T.Y., & Schaal, B.A. (2000). Molecular evolution of *atpB-rbcL* noncoding spacer of chloroplast DNA in the moss family *Hylocomiaceae*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41(1), 75-92.
- Dasgupta, N., Das, S., & Bhattacharya, S. (2018). DNA barcoding of all true mangrove taxa from Indian Sundarbans. *Agricultural and Ecological Research Unit*, 51(18), 915-926.
- Dharmayanti, I.N.L.P. (2011). Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa*, 21(1).
- Diekmann, K., Hodkinson, T.R., Wolfe, K.H., van den Bekerom, R., Dix, P.J., & Barth, S. (2009). Complete chloroplast genome sequence of a major allogamous forage species, perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *DNA Research*, 16(1), 165-176.
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., & Zhou, S. (2012). Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *Plos One*, 7(4), 1-10.
- Fibriana, F., & Hadiyanti, L.N. (2016). Phylogenetic Relationships of Local Durian Species based on Morphological Characteristics and PCR-RFLP Analysis of the Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA. *Biosantifika*, 8(3), 361-369.
- Fitmawati, & Hartana, A. (2010). Phylogenetic Study of *Mangifera laurina* and its Related Species Using cpDNA *trnL-F* Spacer Markers. *Journal of Biosciences*. 17(1), 9-14.
- Fitmawati, Hayati, I., & Sofiyanti, N. (2016). Short Communication: Using ITS as a molecular marker for *Mangifera* species identification in Central Sumatra. *Biodiversitas*, 17(2), 653-656.
- Fitmawati, Harahap, S.P., & Sofiyanti, N. (2017). Short Communication: Phylogenetic analysis of mango (*Mangifera*) in Northern Sumatra based on gene sequences of cpDNA *trnL-F* intergenic spacer. *Biodiversitas*, 18(2), 715-719.
- Fitmawati, Fauziah, R., Hayati, I., Sofiyanti, N., Inoue, E., & Matra, D.D. (2017). Phylogenetic analysis of *Mangifera* from central region of Sumatra using *trnL-F* intergenic spacer. *Biodiversitas*, 18(3), 1035-1040.

- Gallaher, T., Callmander, M. W., Buerki, S., & Keeley, S. C. (2015). A long distance dispersal hypothesis for the *Pandanaceae* and the origins of the *Pandanus tectorius* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(4), 1-10.
- Gielly L, & Taberlet P. (1994). The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Mol Biol Evol*, 11(5), 769–77.
- Gosline, G., Marshall, A.R., & Larridon, I. (2019). Revision and new species of the African genus *Mischogyne* (*Annonaceae*). *Kew Bull*, 74(28).
- Guo, Y.Y., Luo, Y.B., Liu Z.J., & Wang, X.Q. (2012). Evolution and biogeography of the slipper orchid: Eocene vicariance of the conduplicate genera in the Old and New World tropics. *Plos One*, 7(6), 1 -13.
- 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. *International Conference on Biosciences and Medical Engineering 2019*, 2(1) 110-120.
- Hall, B.G. (2001). *Phylogenetic trees made easy: A how-to manual for molecular biologists*. Sinauer Associates. Inc. Sunderland.
- 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.
- Hapsari, L., Triamanto, & Wahyudi, D. (2019). Species diversity and phylogenetic analysis of *Heliconia* spp. collections of Purwodadi Botanic Garden (East Java, Indonesia) inferred by *rbcL* gene sequences. *Biodiversitas*, 20(5), 1266-1283.
- Harsono, T., Pasaribu, N., Sobir, Fitmawati, & Prasetya, E. (2017). Phylogenetic analysis of Indonesian gandaria (*Bouea*) using molecular markers of cpDNA *trnL-F* intergenic spacer. *Biodiversitas*, 18(1), 51-57.
- Hartl D. (2000). *A primer of population genetics 3rd edition*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Hidayat, T., & Pancoro, A. (2001). Studi filogenetika molekuler *Anacardiaceae* berdasarkan pada variasi urutan daerah internal transcribe spacer. *Hayati*, 8(1), 98-101.
- Hidayat, T., Kusumawaty, D., Yati, D. D., Muchtar, A. A., & Mariana, D. (2008). Molecular Phylogenetic Analysis of *Phyllanthus niruri* L. (*Euphorbiaceae*) Using Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Matematika dan Sains*, 13(1), 16–21.

- Hoggard, G.D., Kores, P.J., Molvray, M. & Hoggard, R.K. (2004). The phylogeny of *Gaura* (*Onagraceae*) based on ITS, ETS, and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany*, 91(1), 139-148.
- Hollingsworth, P.M., Graham S.W. & Little, D.P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *Plos One*, 6(5), 192-204.
- Holt S.D., Horova L., & Bures P. (2004). Indel patterns of the plastid DNA *trnL-trnF* region within the genus *Poa* (Poaceae). *J. Plant Res*, 117(1), 393–407.
- Huang, Q.X., Wang, X.C., Kong, H., & Guo, Y.L. (2013). An efficient DNA isolation method for tropical plants. *African Journal of Biotechnology*, 12(19), 2727-2732.
- Indriyani, N.L.P., S. Hadiati, F. Nasution, Edison, Sudjijo, & Y. Irawati. (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. Skripsi Universitas Padjajaran.
- Ivanova, Z., Sablok, G., Daskalova, E., Zahmanova, G., Apostolova, E., Yahubyan, G., & Baev, V. (2017). Chloroplast genome analysis of resurrection tertiary relict *Haberlea rhodopensis* highlights genes important for dessication stress response. *Froentiers in Plant Science*, 8(1), 1 – 15.
- Kocyan, A., Qiu, Y., Endress, P., & Conti, E. (2004). A phylogenetic analysis of Apostasioideae (Orchidaceae) based on ITS, *trnL-F*, and *matK* sequences. *Plant Syst. Evol*, 247(1), 203-213.
- Kojoma, M., Kurihara K., Yamada K., Sekita S, Satake M., & Iida O. (2002). Genetic identification of cinnamon (*Cinnamomum spp.*) based on the *trnLtrnF* chloroplast DNA. *Planta Med*, 68(1), 94–96.
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R., & Pandey, B.K. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2(4), 141-162.
- Kurniawati, S., & Hartati, N.S. (2018). Optimasi Suhu Annealing Primer Degenerate untuk Mengamplifikasi Fragmen Gen Arginine Decarboxylase (ADC) Genom Ubi Kayu Lokal Maluku Tenggara. *Jurnal Ilmu Dasar*, 9(2), 135-142.
- Laltanpuui, Kumar, N.S., Mathai, M.T. (2014). Molecular and phylogenetic analysis of the genus *Orthetrum* (Odonata: Anisoptera: Libellulidae) using mitochondrial COI gene. *Science Vision*, 14(3), 152-257

- Leontowicz, H., Leontowicz, M., Jesion, I., Bielecki, W., Poovarodom, S., Vearasilp, S., & Gorinstein, S. (2011). Positive effects of durian fruit at different stages of ripening on the hearts and livers of rats fed diets high in cholesterol. *European Journal of Integrative Medicine*, 3(3), 169–181.
- Lestari, S., Fitmawati, & N.N. Wahibah. (2011). Keanekaragaman Durian (*Durio zibethinus* Murr.) di Pulau Bengkalis Berdasarkan Karakter Morfologi. *Buletin Kebun Raya*, 14(2), 29-44.
- Li, C., Lu, S., & Barrington, D.S. (2008). Phylogeny of Chinese Polystichum (*Dryopteridaceae*) based on chloroplast DNA sequence data (*trnL-F* and *rps4-trnS*). *Journal Plant Res*, 121(1), 19–26.
- Li, W.H. (1997). *Molecular Evolution*. Sinauer. Sunderland: MA.
- Lim, T.K & Luders, L. (1998). Durian flowering, pollination, and incompatibility studies. *Annals of Applied Biology*, 132 (1), 151 – 165.
- Liston, A., Gernandt, D.S., Vining, T.F., & Campbell, C.S. (2003). Molecular Phylogeny of Pinaceae and Pinus. *Acta horticulturae*, 1(1), 615.
- Nakano T, & Ozawa T. (2004). Phylogeny and historical biogeography of limpets of the order Patellogastropoda based on mitochondrial DNA sequences. *Journal Mollusca Study*, 70(1), 31–41.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press: New York.
- Nei M & Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- 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.
- Okaura, T., & Harada, K. (2002). Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity*, 88(4), 322–329.
- Osen, G., Amugene, N.O., & Nyaboga, E. (2017). Rapid and Efficient Isolation of High Quality DNA from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Suitable for PCR Based Downstream Applications. *Annual Research & Review in Biology*, 12(2), 1-10.
- Pleines, T., Jakob, S.S., & Blattner, F.R. (2009). Application of non coding DNA regions in intraspecific analyses. *Plant Sys Evol*, 282(1), 281-294.
- Pervaiz, Z., N. Turi., I. Khaliq., M. Rabbani., & S.A. Malik. (2011). Modified Method for high-Quality DNA Extraction for Molecular Analysis in Cereal Plants. *Genetics Molecular Research Journal*, 10(1), 1669–1673.

- Restu M, Mukrimin, & Gusmiaty. (2012). Optimalisasi teknik ekstraksi dan isolasi DNA tanaman suren (*Toona sureni* Merr) untuk analisis keragaman genetic berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal Nature Indonesia*, 14(2), 138-142.
- Retnoningsih, A., Megia, R., & Hartana, A. (2014). Phylogenetic Relationships of Indonesian Banana Cultivars Inferred From *trnL-F* Intergenic Spacer of Chloroplast DNA. *Floribunda*, 4(8), 202-211.
- Riupassa P.A., Chikmawati, T., Miftahudin, & Suharsono. (2015). The Molecular Diversity-based ISSR of *Durio tanjungpurensis* Originating from West Kalimantan, Indonesia. *Makara J. Sci*, 19(1), 27-36.
- Rosmaina, Warino, J., Suhaida, & Zulfahmi. (2016). Genetic Variability and Relationship Among Durian Cultivars (*Durio zibethinus* Murr) In The Kampar, Indonesia Assessed By RAPD Markers. *J. Biotechnol*, 13(2), 87-94.
- Rychlik, W., Spencer, W.J., Rhoads, R.E. (1990). Optimization of The Annealing Temperature for DNA Amplification In Vitro. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409-6412.
- Sahu, S.K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology*, 6(1).
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(1), 406-425.
- Sales, E.K. (2015). Durian Marker Kit for Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Identity. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 9(5), 554-564.
- Salih, R.H.M., Majesky, L., Schwarzacher, T., Gornall, R., & Heslop-Harrison, P. (2017). Complete chloroplast genome from apomictic *Taraxacum* (*Asteraceae*): identity and variation between three microspecies. *Plos One*, 12 (2), 1 – 22.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. USA: Cold Spring Harbor Lab Press.
- Sanchez, D., Terrazas, T., Greg-Valencia, D., & Arias, S. (2017). Phylogeny in *Echinocereus* (Cactaceae) based on combined morphological and molecular evidence: taxonomic implications. *Systematics and Biodiversity*, 1(1), 1 – 17.
- Sankar, J., Rosaiah, G., Ravi K.K., & Rajasekhar P. (2011). Molecular identification of Mango, *Mangifera indica* L. var. *totupura*. *Bioinformation*, 5(10), 405-409.

- Santos, Y.A.C., Salatino, M.L.F., Motta, L.B., Mello-silva, R., Cattai, M.B., Sasaki, D., & Chase, M.W. (2011). Five vicarious genus from Gondwana: the *Velloziaceae* as shown by molecules and morphology. *Plos One*, 1(1), 87–102.
- 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. *Journal Hortimart*, 26(1), 6-20.
- Sari, V.K., & Murti, R.H. (2015). Effective Method for DNA Extraction of Mature Leaf of Sapodilla (*Manilkara Zapota L. van Royen*). *AGRIVITA*, 37(1), 18-23.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E., & Small, R.L. (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetics analysis. *Am. J. Bot.* 92(1), 142–166.
- Sidiq, H. A., Retnoningsih, A., & Habibah, N.A. (2019). Keanekaragaman dan Identifikasi Durian Unggul Pulau Kundur Berdasarkan Penanda Molekuler Mikrosatelit. *Life Science*. 8(2).
- Singh, J., Kakade, D.P., Wallalwar, M.R., Raghuvanshi, R., Kongbrailatpam, M., Verulkar, S.B., & Benerjee, S. (2017). Evaluation of potential DNA barcoding loci from plastid genome: intraspecies discrimination in rice (*Oryza species*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), 2746 – 2756.
- Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag. Berlin: New York.
- Sundari & Tolangara, A.R. (2014). Fundamental Research: The Study of Taxonomic and Phylogenetic of Local Durian Variety of Ternate and Jailolo in North Moluccas Province. Indonesia. *International Journal of Engineering Research and Development*. 10(1), 52-57.
- Solikin, M., Retnoningsih, A., & Rahayu, E.S. (2017). Karakterisasi Aksesori Durian Lokal Koleksi Hortimart Agro Center Jawa Tengah Menggunakan Penanda Molekuler Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). *Floribunda*, 5(7), 267-276.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol*, 17(1), 1105-1109.
- Tsai, L.C., Yu, Y.C., Hsieh, H.M., Wang, J.C., Linacre, A., & Lee, C.J.I. (2006). Species identification using sequences of the *trnL* intron and the *trnL-trnF* IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan. *Forensic Science International*, 164(1), 193–200.

- 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(1), 155-159.
- Wan, Q.H., Wu, F.H., Fujihara, T., & Fang, S.G. (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issue. *Electrophoresis*, 25(1), 2165-2176.
- Wang, S., Shi, C., & Gao, L.Z. (2013). Plastid genome sequence of a wild woody oil species, *Prinsepia utilis*, provides insights into evolutionary and mutational patterns of Rosaceae chloroplast genomes. *Plos One*, 8(9), 1 - 12.
- Wang, X., Tian, W., & Li, Y. (2008). Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. *Molecular Biotechnol*, 38(1), 57-64.
- Wang X, X. Zhao, H. Xiao, & F. Wang. (2012). Isolation of High-Quality DNA from a Desert Plant *Reaumuria soongorica*. *Genetic Diversity in Plants*, 1(1), 1-10.
- 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.
- Wicke, S., Schneewis, G.M., DePamphilis, C.W., Muller, K.F., & Quandt, D. (2011). The evolution of plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. *Plant Molecular Biology* 76(1), 273 – 297.
- Widodo. (1997). Studi pertumbuhan dan perkembangan buah durian (*Durio zibethinus* Murr.) varietas Monthong. Thesis Institut Pertanian Bogor.
- Widodo, SR. (2010). Identifikasi Morfologi dan Analisis Sitologi Tanaman Durian Sukun (*Durio zibethinus* Murr.) Skripsi Universitas Sebelas Maret.
- Widyastuti, Y. (2016). Validasi spesies dengan marka molekuler *Cytochrome oxidase subunit I* (COI) dan Potensi protein albumin dari beberapa spesies ikan. Thesis Intitut Pertanian Bogor.
- Wu, F.H., Chan, M.T., Liao, D.C., Lee, Y.W., Daniell, H., Duvall, M.R., & Lin, C.S. (2010). Complete chloroplast genome of *Oncodium* Gower Ramsey and evaluation of molecular markers for identification and breeding in *Oncidiinae*. *BMC Plant Biology*, 10(1), 68 – 80.
- Yang, J.Y., & Pak, JH. (2006). Phylogeny of korean rubus (*Rosaceae*) based on ITS (nrDNA) and *trnL-F* intergenic region (cpDNA). *Journal of Plant Biology*, 49(1), 44–54.
- Yi, T., Miller, A.J.,& Wen, J. (2004). Phylogenetic and biogeographic diversification of *Rhus* (Anacardiaceae) in the Northern Hemisphere. *Mol Phylogenet Evol*, 33(1), 861–879.

- Yuniastuti, E., Nandariyah, & Bukka, S.R. (2018). Karakterisasi Durian (*Durio zibethinus*) Ngrambe di Jawa Timur, Indonesia. *Journal of Sustainable Agriculture* 33(2), 136 – 145
- Zanan, R.L. & Nadaf, A.B. (2012). *Pandanus mangalorensis*: a new species of *Pandanaceae* from Southern India. *Kew Bull*, 67(1), 1–5.
- Zein, M.S.A., & Prawiradilaga, D.M. (2013). *DNA Barcoding Fauna Indonesia*. Jakarta: Kencana Press. pp. 9-21.
- Zhang, W.H., Chen, Z.D., Li, J.H., Chen, Y.C., & Anndtang, H.B. (2003). Phylogeny of the Dipsacales s.l. based on chloroplast *trnL* and *ndhF* sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 26(1), 176–189.
- Zhang, D.X., & Hewitt, G.M. (2003). Nuclear DNA analysis in genetic studies of population: practice, problems, and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3), 563–584.
- Zhou, L., Su, Y.C.F., Chalermglin, P., & Saunders, R.M.K. (2010). Molecular phylogenetics of *Uvaria* (Annonaceae): relationships with *Balanga*, *Dasoclema* and Australian species of *Melodorum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1(1), 33–43.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Identitas akses GenBank NCBI *Heritiera fomes* (outgroup)

```
LOCUS      MH215752                443 bp    DNA        linear    PLN 22-MAY-2019
DEFINITION Heritiera fomes isolate Hf4 trnL-trnF intergenic spacer region,
partial sequence; chloroplast.
ACCESSION  MH215752
VERSION    MH215752.1
KEYWORDS   .
SOURCE     chloroplast Heritiera fomes
  ORGANISM Heritiera fomes
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetalae; rosids; malvids; Malvales; Malvaceae; Sterculioideae;
            Heritiera.
REFERENCE  1 (bases 1 to 443)
  AUTHORS  Dasgupta,N., Das,S. and Bhattacharya,S.
  TITLE    DNA barcoding of all true mangrove taxa from Indian Sundarbans
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 443)
  AUTHORS  Dasgupta,N., Das,S. and Bhattacharya,S.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (16-APR-2018) Agricultural and Ecological Research Unit,
            Indian Statistical Institute, 203, B.T. Road, Kolkata, West Bengal
            700108, India
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
  source   1..443
            /organism="Heritiera fomes"
            /organelle="plastid:chloroplast"
            /mol_type="genomic DNA"
            /isolate="Hf4"
            /isolation_source="young leaf bud"
            /db_xref="taxon:2171973"
            /country="India"
            /collection_date="16-May-2016"
            /collected_by="Nirjhar Dasgupta, Sauren Das"
  misc feature  <1..>443
            /note="trnL-trnF intergenic spacer region"
ORIGIN
1 taagccagtt tgctatctat ttatctttatc ctaccctttt tgttagtggg tcaaagttcc
61 ttatgtttct catcatcctt actcttttcc attttacaac cgtatcctag cagaattttg
121 ttctcttctt acaagtcctg tgatatagtg tgatatatat atgatatacg tacaaatcaa
181 cactcttgag caaggaatac ctatcttgat gattcataat ccatatgatt actcatatgg
241 aaatttccaa agtcttcctt ttgaagatcc aagaaattcc cgttcgagac ttttaattta
301 atacttttct gtttttttgg ttcatctttt aattgacata gaccaagtt atctagtatt
361 atgaggataa tgcgtcggta atggtcggga tagctcagtt ggtagagcag aggactgaaa
421 atcctcgtgt caccagttca aat
//
```

Lampiran 2. Multiple alignment sekuen *trnL-F intergenic spacer 29* varietas durian menggunakan analisis MUSCLE-MEGA7

```

1      5      11     14      20      31 34      41 44      47 49 51      57
K18_MasPear      TTTATTTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
B9_Musang_King  TTTATTTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
B10_Pelangi     TTTA-TTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
B11_Matahari    TTTATTTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---TTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K1_GSG          TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K10_Phang_Jing_Lien TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K27_Milah      TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K5_Angbak_Kia_03 TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K16_TR         TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K30_Layang     TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K7_Pheng_Kwai  TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K21_Durian_Tawa TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K22_Moncong    TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
B8_Duri_Hitam  TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K3-ANGBAK_TOLO -TTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K13_Pondok     TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K17_Asapan     TTTATTTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K4_Angbak_Kia_11 TTTATTTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K14_GT         TTTATTTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K2_Cuhut      TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
B16_Petruk    TTTA-TTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CGGA-GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K24_Sumbat    TTTATTTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K15_Tongkat   TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K6_Huang_Kwue_Niam TTTATTTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K26_EMPE     TTTATTTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K9_Te_Lo_Kha  TTTATTTGAACTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
B7_Bawor     TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K19_Jongkong  -TTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
K11_HM       TTTATTTGAACTGGTGTGACACGAGGATTTT-CA---GTCCTTGTGCTCTACCAACTG-AGC
***  *****  **  *****  *****  *****  *  ***  **  *  *****  ***

```

```

K18_MasPear      TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
B9_Musang_King  TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
B10_Pelangi     TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
B11_Matahari    TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K1_GSG          TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K10_Phang_Jing_Lien TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K27_Milah      TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K5_Angbak_Kia_03 TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K16_TR         TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K30_Layang     TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K7_Pheng_Kwai  TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K21_Durian_Tawa TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K22_Moncong    TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
B8_Duri_Hitam  TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K3-ANGBAK_TOLO TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K13_Pondok     TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K17_Asapan     TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K4_Angbak_Kia_11 TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K14_GT         TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K2_Cuhut      TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
B16_Petruk    TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K24_Sumbat    TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K15_Tongkat   TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K6_Huang_Kwue_Niam TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K26_EMPE     TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K9_Te_Lo_Kha  TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
B7_Bawor     TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K19_Jongkong  TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
K11_HM       TATCCCGACCATTACCGACGCATTATCCTCATAATACTAGATGACTTGGGTCTATGTCAC
*****

```


K18_MasPear TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 B9_Musang_King TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 B10_Pelangi TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 B11_Matahari TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K1_GSG TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K10_Phang_Jing_Lien TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K27_Milah TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K5_Angbak_Kia_03 TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K16_TR TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K30_Layang TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K7_Pheng_Kwai TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K21_Durian_Tawa TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K22_Moncong TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 B8_Duri_Hitam TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K3-ANGBAK_TOLO TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K13_Pondok TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K17_Asapan TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K4_Angbak_Kia_11 TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K14_GT TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K2_Cuhut TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 B16_Petruk TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K24_Sumbat TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K15_Tongkat TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K6_Huang_Kwue_Niam TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K26_EMPE TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K9_Te_Lo_Kha TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 B7_Bawor TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K19_Jongkong TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG
 K11_HM TTAAAAATGAAAAC-AAAAAAAAAAAAACGAAAAAGTATTAATTTAAAAGGGGAATTTCTTG

K18_MasPear GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 B9_Musang_King GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 B10_Pelangi GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 B11_Matahari GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K1_GSG GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K10_Phang_Jing_Lien GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K27_Milah GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K5_Angbak_Kia_03 GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K16_TR GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K30_Layang GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K7_Pheng_Kwai GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K21_Durian_Tawa GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K22_Moncong GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 B8_Duri_Hitam GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K3-ANGBAK_TOLO GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K13_Pondok GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K17_Asapan GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K4_Angbak_Kia_11 GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K14_GT GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K2_Cuhut GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 B16_Petruk GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K24_Sumbat GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K15_Tongkat GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K6_Huang_Kwue_Niam GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K26_EMPE GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K9_Te_Lo_Kha GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 B7_Bawor GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K19_Jongkong GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA
 K11_HM GATCTTTAAAAGGAAGACTTTGTAAATTTTCAGTATGAGTAATGATATGGATTATGAATCA

K18_MasPear TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
B9_Musang_King TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
B10_Pelangi TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
B11_Matahari TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K1_GSG TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K10_Phang_Jing_Lien TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K27_Milah TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K5_Angbak_Kia_03 TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K16_TR TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K30_Layang TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K7_Pheng_Kwai TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K21_Durian_Tawa TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K22_Moncong TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
B8_Duri_Hitam TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K3-ANGBAK_TOLO TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K13_Pondok TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K17_Asapan TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K4_Angbak_Kia_11 TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K14_GT TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K2_Cuhut TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
B16_Petruk TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K24_Sumbat TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K15_Tongkat TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K6_Huang_Kwue_Niam TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K26_EMPE TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K9_Te_Lo_Kha TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
B7_Bawor TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K19_Jongkong TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC
K11_HM TTCAAATAGGTATTCCTTGCTCAAGGGTGTGATTTGTACGTATATCATATATATATCAC

354

K18_MasPear AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
B9_Musang_King AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
B10_Pelangi AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
B11_Matahari AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K1_GSG AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K10_Phang_Jing_Lien AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K27_Milah AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K5_Angbak_Kia_03 AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K16_TR AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K30_Layang AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K7_Pheng_Kwai AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K21_Durian_Tawa AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K22_Moncong AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
B8_Duri_Hitam AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K3-ANGBAK_TOLO AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K13_Pondok AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K17_Asapan AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K4_Angbak_Kia_11 AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K14_GT AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K2_Cuhut AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
B16_Petruk AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K24_Sumbat AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K15_Tongkat AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K6_Huang_Kwue_Niam AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K26_EMPE AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K9_Te_Lo_Kha AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
B7_Bawor AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K19_Jongkong AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA
K11_HM AATATATCATATCACAAGACTTGTGATAAGAGAACAAAATTCTGCTAGGATACGCTTGTA

371 391

K18_MasPear AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 B9_Musang_King AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 B10_Pelangi AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 B11_Matahari AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K1_GSG AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K10_Phang_Jing_Lien AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K27_Milah AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K5_Angbak_Kia_03 AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K16_TR AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K30_Layang AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K7_Pheng_Kwai AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K21_Durian_Tawa AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K22_Moncong AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 B8_Duri_Hitam AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K3-ANGBAK_TOLO AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K13_Pondok AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K17_Asapan AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K4_Angbak_Kia_11 AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K14_GT AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K2_Cuhut AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 B16_Petruk AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K24_Sumbat AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K15_Tongkat AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K6_Huang_Kwue_Niam AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K26_EMPE AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K9_Te_Lo_Kha AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 B7_Bawor AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K19_Jongkong AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA
 K11_HM AAATGGAAAAGAATAGGATGAATGAGAAAC-ATAAGGAACTTTGAACCCTAACAAAAA

420 430 472 478

K18_MasPear ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGAGG
 B9_Musang_King ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 B10_Pelangi ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGAGG
 B11_Matahari ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGAGG
 K1_GSG **GAT**GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K10_Phang_Jing_Lien ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K27_Milah ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K5_Angbak_Kia_03 ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K16_TR ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K30_Layang ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K7_Pheng_Kwai ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K21_Durian_Tawa ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K22_Moncong ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 B8_Duri_Hitam ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K3-ANGBAK_TOLO ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K13_Pondok ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K17_Asapan ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K4_Angbak_Kia_11 ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K14_GT ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K2_Cuhut ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 B16_Petruk ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K24_Sumbat ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K15_Tongkat ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K6_Huang_Kwue_Niam ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K26_EMPE ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K9_Te_Lo_Kha ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 B7_Bawor ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K19_Jongkong ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGA-G
 K11_HM ---GGGTAGG-ATAAAATAAATAGATAGCAAACGGGCTTTTTGGGGTTGGGG-ATAGAGG

	481	486	491
K18_MasPear	GAACTG	AACC	AA
B9_Musang_King	GGACTG	AACC	AAA
B10_Pelangi	GAACTG	GAAACC	AA
B11_Matahari	GAACTG	AACC	AA
K1_GSG	GGACTG	AACC	A
K10_Phang_Jing_Lien	GAACTG	GAAACC	A
K27_Milah	GGACTG	AACC	AA
K5_Angbak_Kia_03	GGACTG	AACC	AA
K16_TR	GGACTG	AACC	AA
K30_Layang	GGACTG	GAAACC	A
K7_Pheng_Kwai	GGACTG	GAAACC	AA
K21_Durian_Tawa	GGACTG	GAAACC	CAA
K22_Moncong	GGACTG	AACC	A
B8_Duri_Hitam	GGACTG	GAAACC	A
K3-ANGBAK_TOLO	GGACTG	GAAACC	A
K13_Pondok	GGACTG	GAAACC	A
K17_Asapan	GAACTG	GAAACC	A
K4_Angbak_Kia_11	GGACTG	GAAACC	A
K14_GT	GAACTG	AACC	AA
K2_Cuhut	GAACTG	AACC	AA
B16_Petruk	GAACTG	GAAACC	AA
K24_Sumbat	GAACTG	GAAACC	A
K15_Tongkat	GAACTG	GAAACC	AA
K6_Huang_Kwue_Niam	GAACTG	GAAACC	AA
K26_EMPE	GAACTG	GAAACC	CAA
K9_Te_Lo_Kha	GAACTG	AACC	A
B7_Bawor	GAACTG	AACC	A
K19_Jongkong	GAACTG	GAAACC	AA
K11_HM	GAACTG	GAAACC	AA

* * * * *

Lampiran 3. 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

Seratus 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 4. 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 5. 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.