

PENGEMBANGAN METODE PENANDA ISOZIM PADA TREMBESI *Development of raintree's isozyme marker methods*

Titis Hutama Syah¹, dan Arbain²

¹Kontributor Utama, ^{1,2}Sekolah Tinggi Pertanian Kutai Timur
Jl. Soekarno-Hatta, Sangatta Utara, Kutai Timur, Kalimantan Timur, Indonesia
email penulis korespondensi : titis@stiperkutim.ac.id

Tanggal diterima: 03 Oktober 2020, Tanggal direvisi: 03 Oktober 2020, Disetujui terbit: 25 Desember 2020

ABSTRACT

Fifty samples of raintree from Sangatta, the capital city of Kutai Timur Regency, East Kalimantan were analyzed using isozyme markers to determine the characteristics of the banding pattern. The use of isozymes was intended as a biochemical marker for genetic diversity analysis. This study aimed to determine the enzyme system that could be used to determine genetic diversity of raintree. The enzyme systems used were Diaphorase, Esterase, and Peroxidase. Polymorphism assessments were carried out on the parameters of expected heterozygosity (H), polymorphism information content (PIC), effective multiplex ratio (E), marker index (MI), discriminant power (D), and Resolving (R). Among the three enzyme systems used, Diaphorase showed consistent performance against each of the parameters assessed, with a value of $H = 0.475$; $PIC = 0.362$; $E = 6.1$; $MI = 2.2$; $D = 0.63$; and $R = 4.44$. However, Esterase had the highest multiplex effective ratio ($E = 6.16$). Therefore, Diaphorase is the best isozyme marker that can be used to analyze the genetic diversity of raintree.

Keywords: biochemical marker analysis, genetic diversity, isozyme performance, polymorphism profile, less concern raintree

ABSTRAK

Sebanyak lima puluh sampel pohon trembesi dari Sangatta, Ibukota Kabupaten Kutai Timur, Kalimantan Timur dianalisa menggunakan penanda isozim untuk mengetahui karakteristik pola pitanya. Penggunaan isozim dimaksudkan sebagai penanda biokimia untuk analisis keragaman genetik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sistem enzim yang dapat digunakan untuk mengetahui keragaman genetik trembesi. Sistem enzim yang digunakan adalah *Diaphorase*, *Esterase*, dan *Peroxidase*. Penilaian-penilaian polimorfisme dilakukan terhadap parameter heterosigositas harapan (H), informasi konten polimorfik (PIC), rasio efektif multiplex (E), indeks penanda (MI), daya diskriminan (D), dan daya bagi (R). Diantara ketiga sistem enzim yang digunakan, *Diaphorase* menunjukkan performa yang konsisten terhadap setiap parameter yang dinilai, dengan nilai $H = 0,475$; $PIC = 0,362$; $E = 6,1$; $MI = 2,2$; $D = 0,63$; dan $R = 4,44$. Meskipun demikian, *Esterase* memiliki nilai rasio efektif multiplex tertinggi ($E = 6,16$). Oleh karena itu, *Diaphorase* merupakan penanda isozim terbaik yang dapat digunakan untuk menganalisa keragaman genetik trembesi.

Kata kunci: analisis penanda biokimia, keragaman genetik, kinerja isozim, profil polimorfisme, trembesi yang terabaikan

I. PENDAHULUAN

Penggunaan trembesi sebagai tanaman di kawasan perkotaan, khususnya di lahan-lahan kosong, mulai meningkat semenjak diujarkannya jenis ini oleh Presiden Republik Indonesia dalam rangkaian gerakan menanam dan memelihara pohon pada tahun 2010 (Kementerian Sekretariat Negara Republik Indonesia, 2010). Seiring waktu, pohon tersebut kini telah tumbuh dan berkembang serta diperoleh manfaatnya. Saat ini, jenis ini banyak dijumpai sebagai tanaman tepi jalan, serta

peneduh di halaman perkantoran, sekolahan maupun tempat-tempat terbuka. Bentuk tajuknya yang khas menjadikan pohon ini mudah dikenali.

Trembesi dikenal juga dengan nama ki hujan atau *rain tree*, dengan nama latin *Samanea saman* (Jacquin) Merrill termasuk dalam famili Fabaceae (Staples & Elevitch, 2006). Trembesi dikenal sebagai pengikat nitrogen yang dapat tumbuh dengan cepat dan baik pada berbagai kondisi lingkungan. Jenis ini

juga merupakan penyerap karbon di udara dengan sangat baik (28.488,39 kg/tahun) (Dahlan, 2008). Di Indonesia, trembesi merupakan jenis introduksi, bukan merupakan jenis asli. CABI (2016) menyatakan trembesi berasal dari benua Amerika dan mulai dikenal di Indonesia pada tahun 1870-an. Meskipun telah lama ditanam dan telah beradaptasi dengan baik di wilayah Indonesia, trembesi masih menyimpan potensi sebagai tumbuhan invasif yang dapat menggeser keberadaan jenis-jenis asli.

Literatur-literatur yang membahas tentang genetika trembesi masih sangat terbatas (CABI, 2016; Staples & Elevitch, 2006). Berdasarkan analisis isozim Syah & Arbain (2017) menyatakan keragaman genetik trembesi tergolong tinggi ($H_O = 0,462$; $H_E = 0,480$). Penanda isozim dikenal sebagai bentuk enzim yang memiliki perbedaan molekul (Markert & Moller, 1959). Isozim telah banyak digunakan untuk penelitian-penelitian di bidang biologi, diantaranya untuk mempelajari genetika populasi, studi filogenetik, dan juga untuk memperkirakan variabilitas genetik dan taksonomi. Keunggulan penggunaan penanda isozim di antaranya adalah biayanya yang lebih murah dibandingkan dengan penggunaan penanda molekuler dan sudah banyak di aplikasikan untuk analisis genetik berbagai jenis pohon (Sulkowska, 2012).

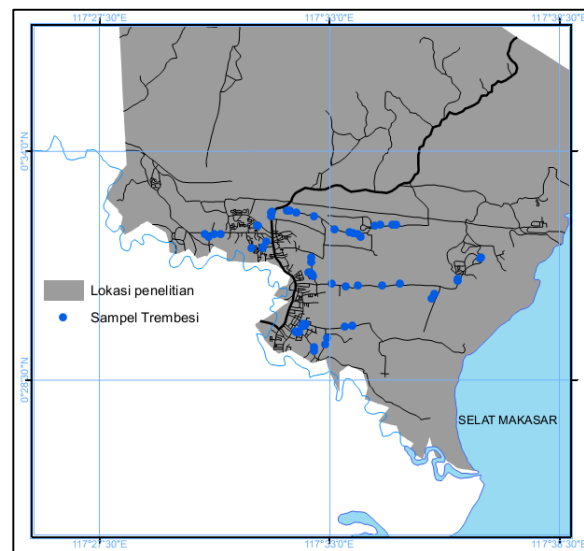
Tujuan penelitian ini adalah untuk untuk mengetahui sistem enzim yang dapat digunakan untuk mengetahui keragaman genetik trembesi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkaya khasanah ilmu pengetahuan dalam penggunaan isozim sebagai penanda untuk analisis keragaman genetik, khususnya pada jenis trembesi.

II. BAHAN DAN METODE

A. Waktu, bahan dan alat

Penelitian berjalan dalam kurun waktu bulan Agustus - Oktober 2017. Sampel diambil dari pohon trembesi yang ada di Kota Sangatta,

Ibukota Kabupaten Kutai Timur, Kalimantan Timur. Sampel yang diambil berupa daun muda dari 50 pohon yang dipilih secara acak. Daun dipetik pada rentang waktu kurang dari 4 jam dan didinginkan dalam kotak es untuk mencegah daun menjadi layu dan kering, mengingat bahwa analisis isozim membutuhkan materi uji yang segar. Selanjutnya, sampel dikirim ke Laboratorium Pemuliaan Pohon, Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk dianalisis.



Gambar 1. Lokasi penelitian di Sangatta, Kabupaten Kutai Timur, Kalimantan Timur

B. Metode

Ekstraksi enzim dilakukan pada daun trembesi yang masih terjaga kesegarannya. Ekstraksi dimaksudkan untuk memisahkan molekul protein dengan substrat yang lainnya berdasarkan perbedaan massa jenis-nya. Ekstraksi dilakukan menggunakan mesin *refrigerated centrifuge* dengan kecepatan putar 15.000 rpm, pada suhu 0°C. Bahan yang diperlukan untuk proses ekstraksi antara lain adalah 1 M Tris-HCL (pH 7,5), gliserol, Tween 80, *dithiothreitol*, dan *polyvinyl-polypyrrolidone* yang dilarutkan dalam *aquades*. Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Esterase* (EST; EC.3.1.1.), *Peroxidase* (POD; EC.1.11.1.7), dan *Diaphorase* (DIA; E.C.1.6.4.3).

Tahapan berikutnya adalah pembuatan gel *agarose* yang terdiri dari Trizma base 1 N

HCL, *bis-acrylamide*, dan *ammonium persulfate*. Larutan hasil ekstraksi disuntikan ke dalam sumur-sumur (*well*) pada gel *agarose* yang sudah tercetak. Selanjutnya dilakukan proses elektroforesis menggunakan larutan *buffer* yang terdiri dari Trizma base dan *glycine*. Elektroforesis dijalankan pada suhu $\pm 7^{\circ}\text{C}$ pada arus listrik sebesar 100 mA selama kurang lebih 3 jam. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dan pengeringan gel. Pewarnaan dilakukan berdasarkan enzim yang diamati. Untuk memunculkan warna dilakukan penggojogan gel dan pemunculan warna dilakukan berdasarkan sistem enzim yang digunakan, yaitu: EST, POD, dan DIA. Untuk pewarnaan EST diperlukan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan Na_2HPO_4 sebagai bahan larutan *buffer*, serta α -*naphtyl propionate*, α -*naphtyl acetate*, dan *fast blue RR salt* sebagai sistem enzim pewarna. Untuk POD membutuhkan Trizma base dan *acetic acid glacial* sebagai larutan *buffer*, dan pewarnaan enzimnya membutuhkan *amino ethyl carboxyl*, β -*naphtol*, *acetone*, dan H_2O_2 . Untuk DIA membutuhkan larutan Trizma base HCL, *polyvinylpyrrolidone*, *dichlorophenol indophenol*, β -*nicotinamide adenine dinucleotide*, dan *tetrazolium thiazolyl blue*. Untuk mengikat warna pada gel dilakukan fiksasi menggunakan alkohol.

C. Analisis data

Gel dinilai secara visual dengan lampu *ultra violet* (UV). Seluruh pola pita diamati dan digunakan untuk menyusun *zymogram*. *Zymogram* disusun berdasarkan nilai R_f , yaitu perbandingan jarak tempuh pola pita pada permukaan gel dengan jarak tempuh penanda *Bromophenol Blue* saat elektroforesis. Nilai R_f dicari dengan persamaan:

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh pola pita}}{\text{jarak tempuh Bromophenol Blue}}$$

Profil isozim disusun berdasarkan jumlah pola pita yang terbentuk pada setiap sistem enzim, banyaknya pola pita polimorfik, heterosigositas harapan (*expected*

heterozigosity/H), nilai informasi konten polimorfik (*polymorphism information content/PIC*), rasio efektif multiplek (*effective multiplex ratio/E*), indeks penanda (*marker index/MI*), daya diskriminan (*discriminating power/D*) dan daya bagi (*resolving power/R*). Heterosigositas harapan adalah probabilitas suatu individu bersifat heterosigot di dalam suatu populasi. Persamaan yang digunakan adalah:

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

p_i^2 adalah frekuensi alel untuk alel ke- i , dan penjumlahannya meliputi semua alel yang ada

Informasi konten polimorfik (*polymorphism Information content/PIC*) adalah besarnya kemungkinan alel-alel heterosigot yang diturunkan induk ke anaknya berkurang frekuensinya. PIC juga diartikan sebagai nilai yang menunjukkan kemampuan penanda dalam membedakan pola pita yang terbentuk. Persamaannya adalah:

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum \sum p_i^2 p_j^2$$

p_i^2 dan p_j^2 adalah frekuensi populasi dari alel ke- i dan ke- j dan $i \neq j$.

Rasio efektif multiplek (*effective multiplex ratio/E*) adalah jumlah lokus yang dianalisis pada zona lokus polimorfik.

$$E = n \beta$$

dengan $\beta = n_p / (n_p + n_{np})$, p dan n menunjukkan fraksi polimorfik dan nonpolimorfik, n_p dan n_{np} menunjukkan jumlah masing-masing.

Indeks penanda (*marker index/MI*) adalah perkalian dari PIC dan rasio efektif multipleks, merupakan parameter statistik yang digunakan untuk memperkirakan tingkat kegunaan suatu penanda. Semakin tinggi nilai MI, semakin baik metode yang digunakan (Chesnokov & Artemyeva, 2015). Indeks penanda juga dapat digunakan sebagai ukuran dalam menentukan efisiensi suatu penanda:

$$MI = PIC \times E$$

Daya diskriminan (*discriminating power/D*) adalah probabilitas dua individu yang dipilih secara acak menunjukkan pola pita yang berbeda sehingga dapat dibedakan satu sama lain.

$$D = 1 - C$$

C didefinisikan sebagai probabilitas ketidakpastian :

$$C = \sum C_i = \sum p_i \frac{N_{pi} - 1}{N - 1}$$

Daya diskriminan digunakan sebagai solusi atas tingkat kebingungan ataupun ketidakpastian yang muncul saat pembacaan pola pita (Tessier et al., 1999). Nilai terbesar D adalah 1, yang bermakna bahwa tidak terdapat keraguan atas pola pita yang terbaca. Oleh karena itu, nilai D sering digunakan untuk melihat efisiensi suatu penanda.

Nilai daya bagi (*resolving power/R*) merupakan nilai yang menunjukkan kemampuan pembacaan penanda dalam membedakan alel-alel pada studi yang dilakukan :

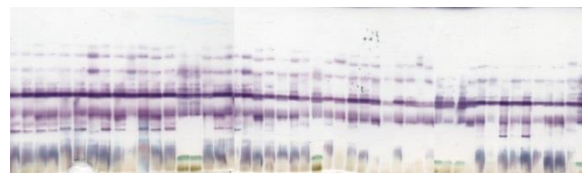
$$R = \sum I_b$$

I_b atau nilai informatif pita berkisar antara 0–1, dan $I_b = 1 - (2x|0,5 - p|)$, p merupakan bagian dari sampel yang berisi pita yang diamati (Amiryousefi et al., 2018). Nilai R menunjukkan keefektifan pembacaan pola pita

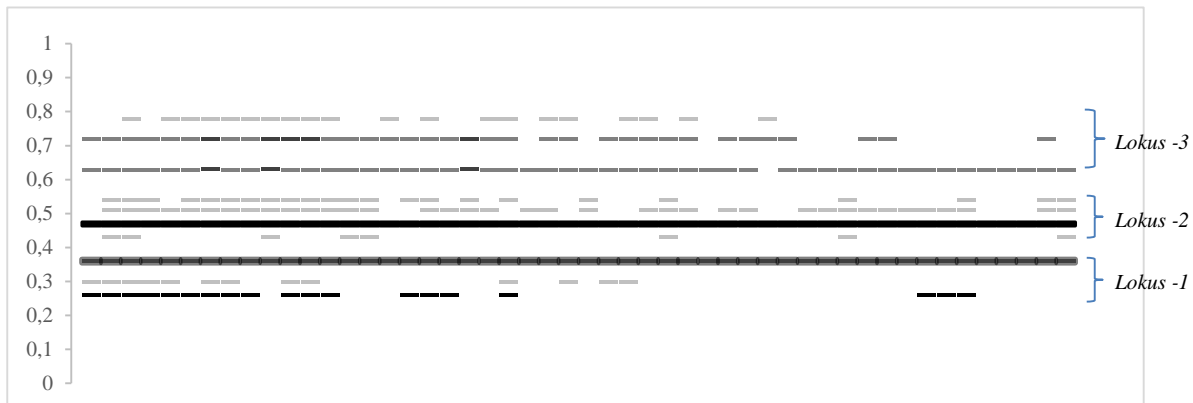
digunakan untuk analisis. Nilai ini dapat digunakan untuk membandingkan keefektifan cara baca pola pita dengan studi/penelitian penanda genetik lainnya.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Diaphorase (E.C.1.6.4.3). Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa enzim *Diaphorase* menghasilkan pola pita yang paling terang dibandingkan dengan kedua sistem enzim lainnya yang membentuk warna yang lebih pekat. Pembacaan pola pita *Diaphorase* tidak membutuhkan pencahayaan khusus. Pewarnaan sistem enzim *Diaphorase* menunjukkan adanya 10 pola pita isozim (Gambar 2). Pola pita *Diaphorase* yang teramati memiliki nilai Rf, 0,26; 0,3; 0,36; 0,43; 0,47; 0,51; 0,54; 0,63; 0,72; dan 0,78 (Gambar 3). Terdapat 2 pola pita yang terdapat pada seluruh sampel trembesi yang digunakan, yaitu pola pita dengan nilai Rf 0,36 dan 0,47. Sebagai penanda yang bersifat kodominan, pola pita isozim yang terbentuk dari sistem enzim *Diaphorase* dikelompokkan menjadi tiga lokus.



Gambar 2. Profil pola pita Diaphorase

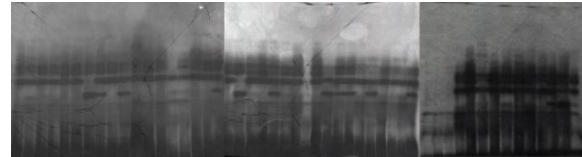


Gambar 3. Zymogram pola pita Diaphorase

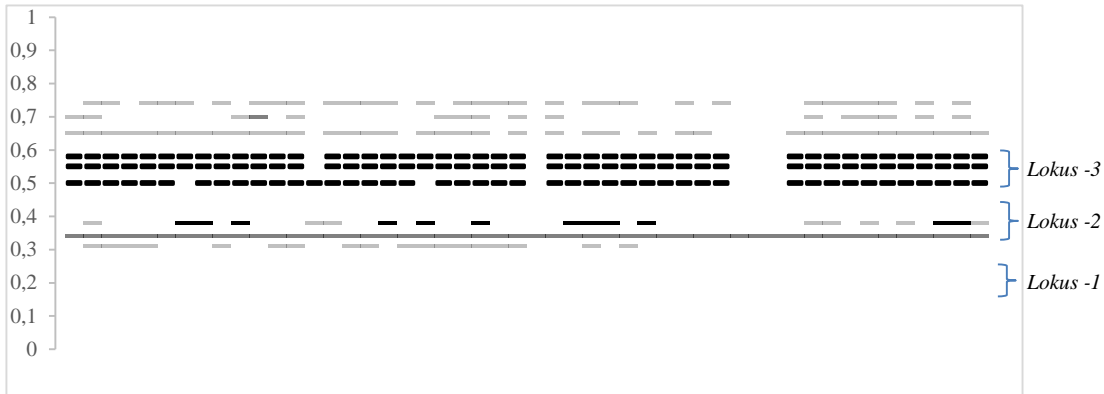
Esterase (EC.3.1.1). Pewarnaan sistem enzim *Esterase* menunjukkan warna yang paling pekat diantara kedua sistem enzim lainnya (Gambar 4). Upaya membaca pola pita yang

terbentuk di dalam gel memerlukan pencahayaan yang khusus agar setiap pola pita dapat dibaca dengan jelas. Pola pita yang terbentuk sebanyak 9 pola, dengan nilai Rf 0,31;

0,34; 0,38; 0,5; 0,55; 0,58; 0,65; 0,70; dan 0,74. Terdapat 1 pola pita yang muncul pada seluruh sampel, yaitu pola pita dengan nilai Rf 0,34. Pola yang terbentuk dikelompokkan ke dalam 3 lokus.



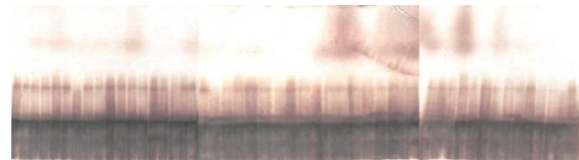
Gambar 4. Profil pola pita Esterase



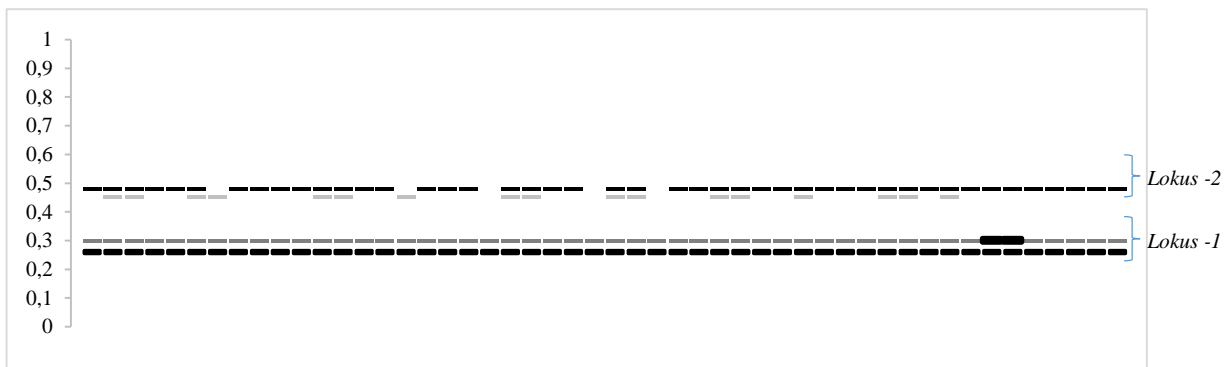
Gambar 5. Zymogram pola pita Esterase

Peroxidase (EC.1.11.1.7). Terdapat 4 pola pita yang terbaca dengan bantuan pencahayaan pada sistem enzim *Peroxidase*. Nilai Rf dari keempat pola tersebut yaitu, 0,26; 0,30; 0,45; dan 0,48. Diantaranya terdapat 2 pola pita yang dapat ditemukan pada seluruh sampel, yaitu pola pita yang memiliki nilai Rf.

0,26 dan 0,30. Pola pita yang terbentuk dikelompokkan ke dalam 2 lokus.



Gambar 6. Profil pola pita Peroxidase



Gambar 7. Zymogram pola pita Peroxidase

Wendel & Weeden (1989) menyatakan bahwa pola pita yang terbentuk setelah elektroforesis disebut dengan fenotipe elektroforesis. Untuk keperluan studi genetika, fenotipe tersebut perlu diterjemahkan kedalam genotipe-genotipe berdasarkan setiap lokus yang terbentuk. Syah & Arbain (2017) menerjemahkan alel-alel yang terbentuk ke dalam lokus dan memberinya kode sebagai DIA-1, DIA-2, dan DIA-3 untuk *Diaphorase*,

serta EST-1, EST-2, dan EST-3 untuk *Esterase*. Pada *Peroxidase* hanya satu lokus yang dapat digunakan dalam analisis genetika, yaitu POD, mengingat salah satu lokus yang terbentuk berupa pola pita monomorfik, sedangkan analisis keragaman genetik memerlukan pola pita yang polimorfik.

Analisis pola pita isozim yang terbentuk dari hasil penelitian dan dihitung menggunakan *iMEC: online marker efficiency calculator*

(Amiryousefi et al., 2018) menunjukkan nilai-nilai yang ditunjukkan pada Tabel 1. Dari pola-pola pita yang terbentuk dapat diketahui bahwa 80% pola pita *Diaphorase*, 88% pola pita *Esterase*, dan 50% pola pita *Peroxidase* bersifat polimorfik. Polimorfisme digunakan sebagai dasar analisis pola-pola pita yang terbentuk karena adanya polimorfisme memungkinkan dilakukannya identifikasi terhadap alel-alel yang terdapat pada setiap lokus sebagai suatu alternatif yang dapat digunakan untuk mengenali atau menandai gen dalam upaya melakukan penelitian terkait dengan genetika. Terlebih lagi elektroforesis protein sebagai dasar dari analisis isozim dapat digunakan untuk mendeteksi perbedaan alel-alel yang bersifat homisigot maupun heterosigot (Singh & Kulathinal, 2013).

Nilai H terendah adalah 0 dan tertinggi adalah 1, yang bermakna bahwa jika suatu populasi tanaman berada pada kondisi setimbang, sesuai dengan *Hardy-Weinberg equilibrium* (HWE) maka seluruh genotipe tanaman tersebut bersifat heterosigot jika berada pada nilai tertinggi dan bersifat homisigot jika berada pada nilai terendah (Freeland, 2005). Nilai H yang diperoleh dari hasil penelitian berkisar antara 0,307 - 0,475 yang menunjukkan bahwa proporsi genotipe homisigot lebih besar daripada genotipe heterosigot. Nilai PIC berkisar antara 0,260 - 0,362 yang menunjukkan proporsi genotipe heterosigot induk yang diturunkan kepada keturunannya. Nagy et al. (2012) menyatakan bahwa PIC adalah

modifikasi dari nilai heterozigositas sebagai sebuah pendugaan bahwa terdapat individu-individu yang tidak memberikan informasi genetik pada turunannya (*linkage analysis*).

Rasio E menunjukkan nilai antara 3,24 - 6,16, menunjukkan bahwa tidak seluruh pola pita polimorfik efektif untuk disertakan ke dalam analisa. Untuk *Diaphorase* hanya terdapat 6 pola pita polimorfik yang efektif untuk dianalisa keragaman genotipe-nya dari 8 pola pita polimorfik yang terbaca. Untuk *Esterase*, hanya terdapat 6 pola pita dari 9 pola pita polimorfik yang efektif untuk analisa. Sedangkan, *Peroxidase* terdapat 3 pola pita dari 4 pola pita polimorfik yang efektif digunakan untuk analisa. Berdasarkan nilai PIC dan E, maka dapat ditentukan besarnya MI. Nilai MI terbesar terdapat pada *Esterase*, terendah adalah *Peroxidase*. Selisih MI *Esterase* dan *Diaphorase* relatif sangat kecil, sehingga dapat disimpulkan bahwa dari ketiga sistem enzim yang digunakan, *Esterase* dan *Diaphorase* merupakan penanda yang memiliki efisiensi lebih baik dibandingkan dengan *Peroxidase*. Kombinasi nilai antara PIC, E, dan MI dapat digunakan untuk mengetahui penanda terbaik yang dapat digunakan dalam analisis keragaman genetik. Samriti et al. (2017) dalam penelitiannya pada jenis *Rubus ellipticus* juga menemukan bahwa nilai PIC, E dan MI dapat digunakan dalam menentukan primer terbaik yang digunakan dalam penelitiannya menggunakan penanda ISSR (*Inter simple sequence repeat*).

Tabel 1. Tabel parameter polimorfisme penanda isozim trembesi di Sangatta

No.	Penanda isozim	Jumlah iita	Jumlah pita polimorfik	H	PIC	E	MI	D	R
1	<i>Diaphorase</i>	10	8	0,475	0,362	6,1	2,21	0,63	4,44
2	<i>Esterase</i>	9	8	0,4319	0,338	6,16	2,08	0,53	4,00
3	<i>Peroxidase</i>	4	2	0,307	0,260	3,24	0,84	0,34	0,88

Keterangan: H = heterosigositas harapan; PIC = *polymorphism information content* E = *Effective multiplex ratio*; MI = *Marker index*; D = *Discriminating power*; R = *Resolving power*

Nilai D tertinggi terletak pada *Esterase* (0,63), dan terendah adalah *Peroxidase* (0,34). Nilai tersebut menunjukkan bahwa pembacaan

pola pita paling rumit dan menimbulkan keraguan terdapat pada *Peroxidase*, sedangkan pembacaan pola pita paling mudah terdapat

pada *Diaphorase*. Nilai R juga menunjukkan bahwa *Diaphorase* merupakan penanda yang paling efektif dibandingkan yang lainnya. Dari seluruh parameter yang dinilai, *Diaphorase* menunjukkan konsistensi terhadap penilaian yang dilakukan. Dalam studi ini dapat disimpulkan bahwa penanda isozim terbaik untuk jenis trembesi adalah sistem enzim *Diaphorase*.

Parameter-parameter genetik di atas menunjukkan bahwa penanda isozim yang diujikan pada penelitian ini dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik pada trembesi. Di Indonesia penggunaan penanda isozim untuk analisa keragaman genetik jenis-jenis pohon telah lama dilakukan, diantaranya pada sengon (Seido et al., 1993), jati (Kertadikara & Prat, 1995), tusam (Indrioko & Na'iem, 1997), meranti (Na'iem, 2001; Sudarmonowati et al., 2001), merbau (Yudohartono, 2008), eboni (Kinho et al., 2016), ulin (Sudarmonowati et al., 2001), cendana (Haryjanto, 2009), kayu putih (Wulandari, 2007), jelutung (Wahyudiningsih et al., 2015). Isozim juga digunakan sebagai penanda genetik jenis-jenis pohon penghasil buah-buahan, diantaranya adalah durian (Salasa, Ashari, & Herlina, 2013), nangka (Adelina et al., 2006), kelapa (Hengky et al., 1988), aren (Haryjanto et al., 2011). Jenis-jenis pohon tersebut merupakan pohon-pohon yang dibudidayakan untuk tujuan produksi. Rao & Hodgkin (2002) menyatakan bahwa data-data yang diperoleh dari analisis keragaman genetik pada umumnya digunakan untuk memastikan taksonomi jenis tertentu, asal-usul tanaman dan laju evolusinya, dan seleksi untuk pertanaman dan konservasi.

IV. KESIMPULAN

Diaphorase menunjukkan konsistensi yang tinggi terhadap parameter-parameter genetik dibandingkan dengan sistem enzim yang lain. Berdasarkan hasil tersebut, sistem enzim terbaik yang dapat digunakan untuk menganalisa keragaman pola pita trembesi

adalah *Diaphorase*. *Esterase* dapat digunakan sebagai alternatif penanda, sedangkan *Peroxidase* selalu menunjukkan nilai terendah pada parameter-parameter yang dinilai. Dengan diketahuinya pola pita tersebut, analisis keragaman genetik pada trembesi dapat dilakukan dan informasinya digunakan sebagai pertimbangan dalam pemanfaatan trembesi sebagai tanaman konservasi maupun produksi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan yang sebesar-besarnya kepada Kemenristekdikti yang telah membiayai penelitian ini dalam skema penelitian dosen pemula yang dilaksanakan pada tahun 2017 (surat DRPM No.: 1444/E3/LT/2017). Analisis laboratorium dapat dilaksanakan atas bantuan Dr. Sapto Indrioko, S.Hut., MP dan sdr. Untung Maryanto dari Laboratorium Pemuliaan Pohon, Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada. Dukungan administratif sepenuhnya dibimbing oleh Alm. Dr. Sugiarto, S.Hut., M.Agr. dari STIPER Kutai Timur.

DAFTAR PUSTAKA

- Adelina, E., Tambing, Y., Budiarti, T., & Murniati, E. (2006). Identifikasi Keragaman Kultivar Nangka Berdasar Ciri Morfologi dan Analisis isoenzim. *Jurnal Agrisains*, 7(3), 150–155.
- Amiryousefi, A., Hyvönen, J., & Poczai, P. (2018). iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences*, 6(6), 4–7. <https://doi.org/10.1002/aps3.1159>
- CABI. (2016). *Samanea Saman*. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International.
- Chesnokov, Y. V., & Artemyeva, A. M. (2015). Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 50(5), 571–578. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.5.571eng>
- Dahlan, E. N. (2008). Jumlah emisi gas CO₂ dan pemilihan jenis tanaman berdaya rosot sangat tinggi: studi kasus di Kota Bogor. *Media Konservasi Agustus*, 13(2), 85–89.
- Freeland, J. R. (2005). *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd.

- Haryjanto, L. (2009). Keragaman genetik cendana (*Santalum album* Linn) di kebun konservasi ex situ Watusipat, Gunungkidul, dengan penanda isosim. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 3(3), 127–138. <https://doi.org/10.20886/jpth.2009.3.3.127-138>
- Haryjanto, L., Prastyono, P., & Ismail, B. (2011). Keragaman genetik empat populasi *Arenga pinnata* merr berdasarkan penanda isozim. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 5(1), 13–21. <https://doi.org/10.20886/jpth.2011.5.1.13-21>
- Hengky, N., Hartana, A., & Gadrinab, L. U. (1988). Keanekaragaman pola pita isozim peroksidase pada koleksi kelapa di Kebun Percobaan Pakuwon Sukabumi. *Flotibunda*, 1(7), 25–28.
- KEMENTERIAN SEKRETARIAT NEGARA REPUBLIK INDONESIA. (2010). *Sambutan Pengantar Presiden RI pada Peringatan Hari Menanam Pohon Indonesia, 28-11-2010 / Sekretariat Negara*.
- Kertadikara, A. W. S., & Prat, D. (1995). Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* L.f.) provenances. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(6), 803–810. <https://doi.org/10.1007/BF00222015>
- Kinho, J., Na'iem, M., & Indrioko, S. (2016). Studi keragaman genetik *Diospyros rumpii* Bakh di Sulawesi Utara berdasarkan penanda isoenzim. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 10(2), 95–109. <https://doi.org/10.20886/jpth.2016.10.2.95-109>
- Markert, C. L., & Moller, F. (1959). Chemical, 5' 6, 7. *Science*, 45, 753–763.
- Na'iem, M. (2001). Genetic Variations Of *Shorea Leprosula* Miq. In Three Populations In Indonesia : Implication For Exsituconservation. *Buletin Kehutanan=Forestry Bulletin*, 0(2001).
- Nagy, S., Poczai, P., Cernák, I., Gorji, A. M., Hegedús, G., & Taller, J. (2012). PICcalc: An online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics*, 50(9–10), 670–672. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9509-1>
- Novi Salasa, K. A., Ashari, S., & Herlina, N. (2013). Identifikasi tanaman durian (*Durio zibethinus* Murray) mirip durian varietas bido di Kecamatan Wonosalam Kabupaten Jombang dengan metode isozim dan morfologi. *Jurnal Produksi Tanaman*, 1(5). <https://doi.org/10.21176/PROTAN.V1I5.54>
- Ramanatha Rao, V., & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(January), 1–19. <https://doi.org/10.1023/A:1013359015812>
- Samriti, Kaur, R., Shilpa, S., Malhotra, E. V., Poonam, P., Thakur, D., & Kumar, K. (2017). Assessment of genetic diversity in *rubusellipticus* (Smith) using molecular markers. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 83(3), 669–679. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2017/49120>
- Sapto Indrioko, M. N. (1997). Variasi isozim pada hutan tanaman *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese di Jawa=Isozyme Variation of *Pinus Merkusii* fungh. et de Vriese. *Berkala Penelitian Pasca Sarjana*, 10(1997).
- Seido, K., Widyatmoko, A. Y. P. B. C., & Nursinggih, G. (1993). *Genetic variation at four allozyme loci in Paraserianthes falcataria at Wamena in Irian Jaya*.
- Singh, R. S., & Kulathinal, R. J. (2013). Polymorphism. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 3, 398–399. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01189-X>
- Staples, G. W., & Elevitch, C. R. (2006). Samanea saman (rain tree). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, April, 15. https://www.researchgate.net/publication/311667816_Samanea_saman_rain_tree
- Sudarmonowati, E., Hartati, N. S., Narendra, B. H., Basyuni, M., Siregar, U. J., & Iriantono, D. (2001). Genetic Markers for Assessing Genetic Diversity and Improvement of Several Tropical Forest Tree Species to Support Conservation Program. *Proceedings of the International Conference on Ex Situ and in Situ Conservation of Commercial Tropical Trees*, 355–369.
- Sulkowska, K. M. (2012). Isoenzyme Analyses Tools Used Long Time in Forest Science. In *Electrophoresis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/45756>
- Syah, T. H., & Arbain, A. (2017). *Prosiding Seminar Nasional Variasi Isozim Pohon Trembesi Yang Berpotensi Invasif di Sangatta, Kutai Timur, Kalimantan Timur*.
- Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J. M., & Charrier, A. (1999). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical*

- and Applied Genetics*, 98(1), 171–177.
<https://doi.org/10.1007/s001220051054>
- Wahyudiningsih, T. S., Naiem, M., Indrioko, S., & Sumardi, I. (2015). Allozyme variation of the endemic and vulnerable *Dyera lowii* Hook.f. in Central Kalimantan: Implications for genetic resources conservation. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 19(1), 79. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.8637>
- Wendel, J. F., & Weeden, N. F. (1989). Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. *Isozymes in Plant Biology*, 5–45. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1840-5_2
- Wulandari, Agustina, R., & Taryono. (2007). *Pendugaan tingkat silang dalam pohon kayu putih Melaleuca cajuputi dengan penanda Isozim*.
- Yudohartono, T. P. (2008). Variasi genetik beberapa populasi merbau (*Intsia bijuga* O. Ktze) berdasarkan penanda isoenzim. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 2(3), 243–251. <https://doi.org/10.20886/jpth.2008.2.3.243-251>

