



SKRINING ENZIM DARI SAMPEL DAUN JELUTUNG RAWA (*Dyera lowii* Hook f.) UNTUK ANALISIS ISOZIM SEBAGAI STUDI AWAL KERAGAMAN GENETIK

(Screening Enzyme from Leaf of *Dyera lowii* Hook f. to Isozyme Analysis.
The First Study of Genetics Variety)

Tri Suwarni Wahyudiningsih

Jurusan Kehutanan, Faperta, Universitas Palangka Raya, Palangka Raya 73112
Kalimantan Tengah – INDONESIA
E-mail: tri.s.w.basuki@gmail.com

ABSTRACT

Jelutung rawa (Dyera lowii Hook f.) is the commercial and endemic species of peat-swamp forest with sensitive status, therefore the research to analyze its genetics variety is very important. The research was aimed to analyze the seven of enzyme in the leaf of D. lowii that well-marked by the emergence of polymorphic tape pattern consistently. The research was conducted at November to December 2012 in the tree improvement laboratory of Gadjah Mada University. Leaf of D. lowii samples were gotten from D. lowii plantation at the Cilik Riwut Street, nine km from Palangka Raya City. There are seven enzyme system to screening, namely Shikimate Dehydrogenase (SHD; EC 1.1.1.25), NAD(P)H-Diaphorase (DIA; EC 1.6.2.2), Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT; EC 1.11.1.7), Acid Phosphatase (ACP; EC 3.1.3.2), 6-Phosphogluconate Dehydrogenase (6-PG; EC 1.1.1.44), Esterase (EST; EC 3.1.1), dan Peroxidase (POD; EC 1.11.1.7). Stages of research were preparation, leaf extraction, supernatant, electroforesis "Wendel & Weeden", colouring, fixation, and gel dehydration. Isozyme was detected using R_f (Relative value from Bromophenol Blue) to make the zymogram. Polymorphic tape pattern consistently was resulted by enzymes of DIA, POD, ACP, EST, and GOT, whereas polymorphic tape pattern inconsistently was resulted by enzymes SHD and 6-PG. Furthermore, the polymorphic tape pattern consistently could to analyze genetics variety. The first study of genetics variety showed that there are four locus at the leaf of D. lowii, namely Est-1, Est-2, Est-3, and Got-1 in the 14 of alel.

Keywords: *Dyera lowii*, enzyme, isozyme analysis, polymorphic

PENDAHULUAN

Setiap jenis pohon menunjukkan perbedaan sifat-sifat atau variasi. Variasi genetik dalam populasi merupakan gambaran dari adanya perbedaan respon individu-individu terhadap perubahan

lingkungan dan sebagai respon perubahan adaptif suatu organisme (Yeh, 2000). Variabilitas di dalam tapak alami disebabkan oleh mutasi, aliran gen,

migrasi, seleksi, *genetic drift* serta sistem perkawinan (Finkeldey, 2005). Variasi genetik dapat diketahui dari perbedaan karakter fenotipe, protein, enzim dan DNA setiap organisme. Variasi genetik merupakan prasyarat untuk adaptasi evolusioner. Jumlah variasi genetik dalam populasi berhubungan langsung dengan potensi untuk adaptasi evolusioner populasi (Finkeldey, 2005).

Keragaman genetik suatu spesies dapat diketahui dengan menggunakan

penanda berupa penanda morfologi, biokimia, dan molekuler (White *et al.*, 2007). Penanda biokimia berupa penanda isozim. Beberapa kelebihan penggunaan isozim adalah: 1). Gen-gen lokus bersifat ko-dominan sehingga individu heterozigot dapat diidentifikasi. 2). Kebanyakan isoenzim bersifat stabil terhadap perubahan lingkungan. 3). Hanya membutuhkan sebagian kecil dari jaringan hidup. 4). Telah ditemukan adanya variasi yang besar pada banyak jenis pohon 5). Pekerjaan laboratorium relatif sederhana dengan biaya bahan kimia relatif murah (Finkeldey, 2005).

Salah satu kelemahan elektroforesis isozim adalah ketidakmampuannya untuk mendeteksi seluruh variasi genetik pada tingkat nukleotida. Hanya sekitar sepertiga bagian dari substitusi nukleotida yang terekspresikan dalam bentuk perubahan asam amino. Perubahan asam amino tersebut pun hanya dapat terdeteksi hingga sebesar 25% saja (Otrosina *et al.*, 1991). Selain itu, diperlukan lebih banyak analisis sistem enzim untuk dapat mendeteksi setiap perubahan tersebut.

Penggunaan penanda biokimia seperti isozim telah dikenal luas di bidang pertanian dan kehutanan. Penanda biokimia dapat diaplikasikan pada tingkat protein seperti isozim dan kimia organik. Enzim adalah suatu kelas molekul protein yang bersifat fungsional. Enzim sangat penting bagi semua reaksi metabolisme di dalam sel karena bertindak sebagai katalisator bagi reaksi metabolis. Isozim adalah enzim-enzim yang mengatalisasi reaksi metabolisme biokimia yang sama (Finkeldey, 2005).

Menurut Finkeldey (2005), studi variasi genetik populasi dilakukan dengan metode penanda genetik. Investigasi penanda gen memungkinkan pengkajian genotipe individu pada lokus gen tunggal.

Polimorfisme isozim adalah alat terpenting dan paling banyak digunakan dalam analisis berbagai aspek sistem genetik pohon hutan tropis (Hamrick & Godt, 1996). Analisis isozim dapat digunakan untuk berbagai kegiatan seperti studi ortogenetik, polimorfisme, aliran gen, dan isolasi, studi keragaman klinal dan geografik, karakterisasi individu dan populasi, serta analisis keragaman genetik (Lowe *et al.*, 2004). Kedudukan isozim sebagai produk translasi RNA sejajar dengan protein. RNA merupakan hasil transkripsi dari segmen DNA tertentu. Enzim dari jaringan organisme yang telah diekstraksi selanjutnya dipisahkan dengan proses elektroforesis. Gel hasil elektroforesis yang telah diwarnai dengan suatu enzim memunculkan pola pita (*banding pattern*) tertentu (Glaubits & Moran, 2000).

Penelitian mengenai keragaman genetik pada *D. Lowii* dengan penanda isozim dapat dilanjutkan bila dihasilkan pola pita polimorfik dan konsisten. Dengan demikian sampel daun *D. Lowii* perlu diteliti dengan menggunakan perlakuan beberapa enzim. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji sampel daun *D. Lowii* menggunakan tujuh enzim untuk menghasilkan pola pita monomorfik yang konsisten, polimorfik yang tidak konsisten, polimorfik yang konsisten serta jumlah lokus dan alel.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan bulan November hingga Desember 2012. Penelitian dilakukan di laboratorium Pemuliaan Pohon Fakultas Kehutanan

UGM untuk analisis isozim. Pengambilan sampel untuk skrining enzim dari hutan tanaman *D. Lowii* di Jl. Cilik Riwut Km 9 Palangka Raya. Pengambilan sampel juga dilakukan di empat lokasi populasi alam yaitu laboratorium alam hutan rawa gambut Sebangau Universitas Palangka Raya dan Taman Nasional Sebangau, Kota Palangka Raya, hutan alam rawa gambut di hutan Pendidikan Hampangan Universitas Palangka Raya sampai Jl. Cilik Riwut km 39, Kabupaten Katingan, hutan alam rawa gambut di Desa Parahangan, Kabupaten Pulang Pisau, Hutan alam rawa gambut di Selat Nusa, Desa Pilang, Kecamatan Jabiren Raya Kabupaten Pulang Pisau.

Bahan Penelitian

Objek penelitian ini adalah pohon *D. Lowii*. Sampel pohon yang diambil adalah daun dari karangan daun urutan pertama. Pada skrining enzim digunakan sampel sebanyak 20 pohon. Tiap pohon diambil satu helai daun. Pada penelitian keragaman genetik sampel tiap populasi dipilih 55 pohon. Secara keseluruhan jumlah pohon yang dipilih dari lima populasi tersebut sebanyak 275 pohon. Berat masing-masing sampel daun yang diperlukan adalah 100 mg untuk bahan sampel analisis isozim. Sampel tersebut disimpan dalam boks es yang berisi es batu untuk menjaga suhu tetap dingin dan kelembaban 60-70 % pada saat di lapangan. Penyimpanan sampel daun di laboratorium dengan dibungkus *aluminium-foil* disimpan dalam *freezer* pada suhu -30°C sampai saat akan dilakukan analisis isozim.

Sistem enzim yang digunakan untuk skrining ada 7 (tujuh) yaitu *Shikimate Dehydrogenase* (SHD; EC

1.1.1.25), *NAD(P)H-Diaphorase* (DIA; EC 1.6.2.2), *Glutamate Oxaloacetate Transaminase* (GOT; EC 1.11.1.7), *Acid Phosphatase* (ACP; EC 3.1.3.2), *6-Phosphogluconate Dehydrogenase* (6-PG; EC 1.1.1.44), *Esterase* (EST; EC 3.1.1), dan *Peroxidase* (POD; EC 1.11.1.7).

Peralatan Penelitian

Untuk penelitian ini digunakan seperangkat alat ekstraksi enzim, proses elektroforesis gel vertikal, dan pewarnaan serta pengeringan gel.

Cara Kerja

Analisis isozim dilakukan meliputi tahap-tahap: persiapan bahan kimia, persiapan materi yang diuji, pelaksanaan pengujian, dan analisis hasil. Diagram alur kegiatan analisis isozim dapat dilihat pada Gambar 1 dan urutan kegiatan tersebut adalah:

- a. Persiapan bahan (materi yang akan diuji).

Daun muda dari setiap pohon diambil dan dihancurkan dengan mortar dan diberi larutan *extract buffer* sebanyak 1 ml. Sampel yang telah hancur selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* dan diputar dengan kecepatan 15.000 rpm pada suhu 0°C selama kurang lebih 20 menit. Larutan bening pada bagian atas yang disebut *supernatant* selanjutnya digunakan dalam proses elektroforesis menurut Wendel & Weeden (1989).

- b. Pelaksanaan analisis isozim disajikan pada Gambar 1.
- c. Pembacaan hasil analisis isozim berupa pola pita yang muncul pada gel dihitung dengan menggunakan nilai R_f (Relatif *value* dari *Bromphenol Blue*)

dan diberi kode alel pada masing-masing lokus kemudian dibuat zimogram. Pembuatan zimogram dihitung dengan rumus sbb:

$$R_f = \frac{\text{jarak ke alel (cm)}}{\text{jarak total ke Bromophenol Blue}} \times 100\%$$

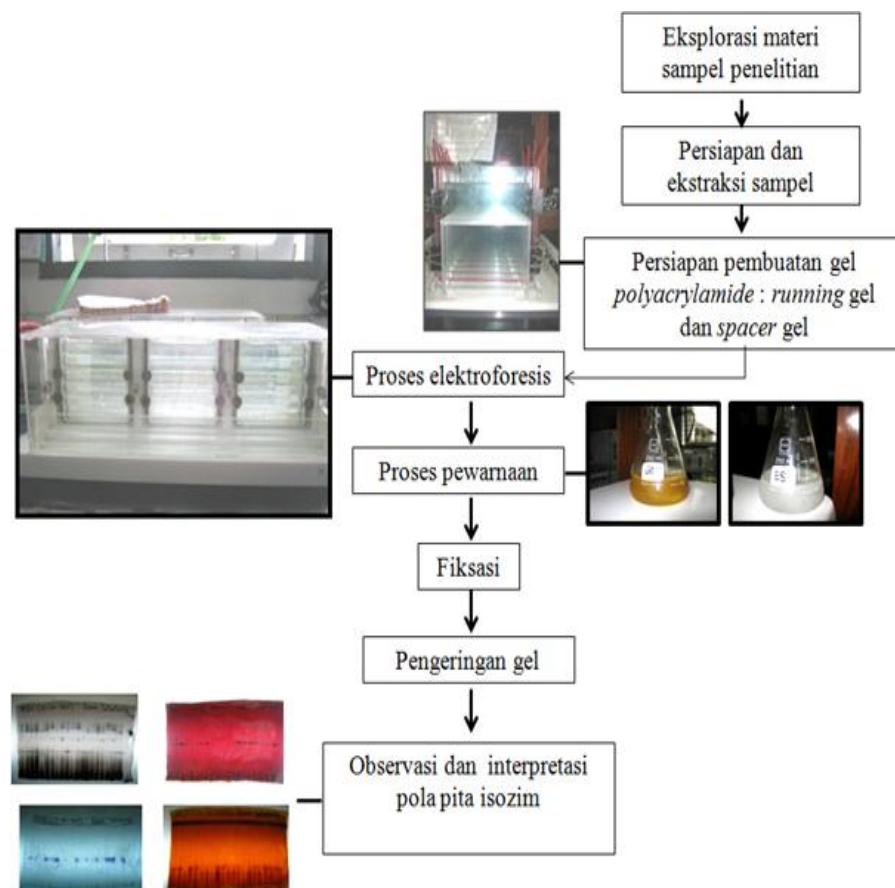
Pembacaan pola pita meliputi monomorfik, polimorfik, dan konsisten atau tidak konsisten muncul pola pita pada gel hasil elektroforesis.

HASIL PENELITIAN

Skrining perlu dilakukan untuk mengetahui enzim yang dapat menghasilkan pola pita polimorfik yang konsisten. Semua hasil pola pita dikelompokkan sebagai berikut.

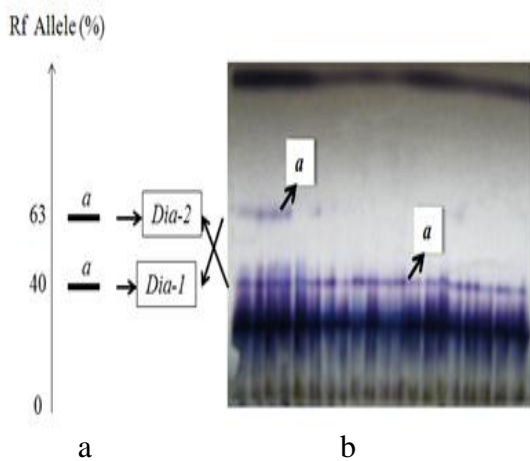
Pola pita monomorfik yang konsisten

Pola pita monomorfik yang konsisten dihasilkan oleh enzim DIA, POD, dan ACP. R_f adalah jarak ke alel



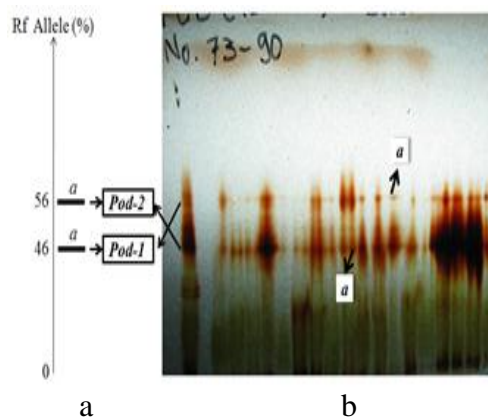
Gambar 1 Diagram alur analisis isozim

dibagi jarak total ke *Bromophenol Blue* dikali seratus persen. Zimogram (Gb. 2a) dan distribusi alel berdasar persentase R_f dari sistem enzim DIA (Gb. 2b) tersebar pada 2 (dua) lokus yaitu lokus *Dia-1* hanya terdapat alel *a* dengan R_f alel 40%, kemudian pada lokus *Dia-2* hanya terdapat satu alel yaitu alel *a* dengan R_f alel 60%.

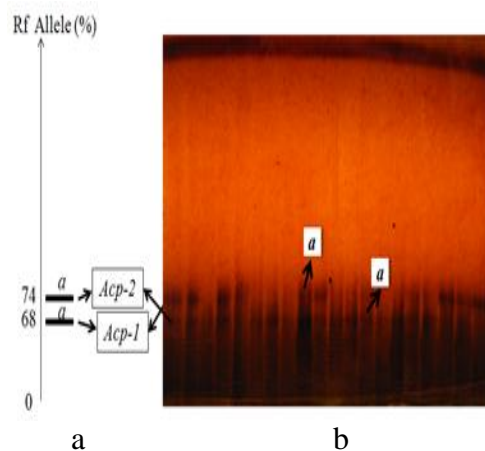


Gambar 2. Zimogram berdasarkan persentase R_f (Gb.a) serta distribusi alel *a* pada lokus *Dia-1* dan *Dia-2* (Gb.b) dari sistem enzim DIA pada *D. lowii*

Zimogram (Gb. 3a) dan distribusi alel berdasar persentase R_f dari sistem enzim POD (Gb. 3) tersebar pada dua lokus yaitu lokus *Pod-1* terdapat alel *a* dengan R_f alel 46% dan lokus *Pod-2* terdapat alel *a* dengan R_f alel 56%. Zimogram (Gb. 4a) dan distribusi alel berdasar persentase R_f dari sistem enzim ACP (Gb. 4b) tersebar pada dua lokus yaitu lokus *Acp-1* (R_f alel 68%) dan *Acp-2* (R_f alel 74%), yang masing-masing hanya terdapat alel *a*.



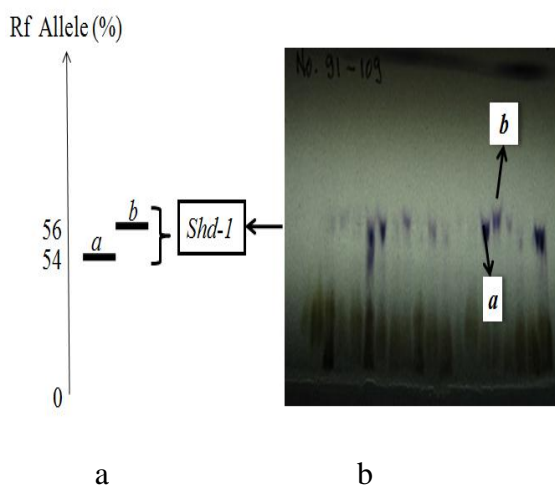
Gambar 3. Zimogram berdasarkan persentase R_f (a) serta distribusi alel *a* pada lokus *Pod-1* dan *Pod-2* (b) dari sistem enzim POD pada *D. lowii*



Gambar 4. Zimogram berdasarkan persentase R_f (a) serta distribusi alel *a* pada lokus *Acp-1* dan *Acp-2* (b) dari sistem enzim ACP pada *D. lowii*

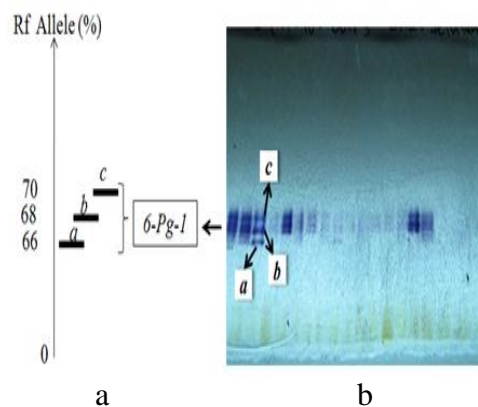
Pola pita polimorfik yang tidak konsisten

Enzim yang menghasilkan pola pita polimorfik tetapi tidak konsisten adalah enzim SHD dan 6-PG. Zimogram (Gb. 5a) dan distribusi alel berdasar persentase R_f dari sistem enzim SHD (Gb. 5b) hanya terdapat satu lokus yaitu lokus *Shd-1* dengan R_f alel *a* 54% dan alel *b* 65%. Pada sistem enzim ini terlihat polimorfik namun banyak sampel yang tidak konsisten muncul pola pita.



Gambar 5. Zimogram berdasarkan persentase R_f (a) serta distribusi alel *a* dan *b* pada lokus *Shd-1* (b) dari sistem enzim SHD pada *D. lowii*

Zimogram (Gb. 6a) dan distribusi alel berdasar persentase R_f dari sistem enzim 6-PG (Gb. 6b) hanya terdapat 1 (satu) lokus yaitu lokus *6-Pg-1* dengan satu alel *a* yang mempunyai R_f alel 66%, alel *b* (R_f alel 68%), dan alel *c* (R_f alel 70%). Pola pita pada sistem enzim ini terlihat polimorfik tetapi tidak konsisten.

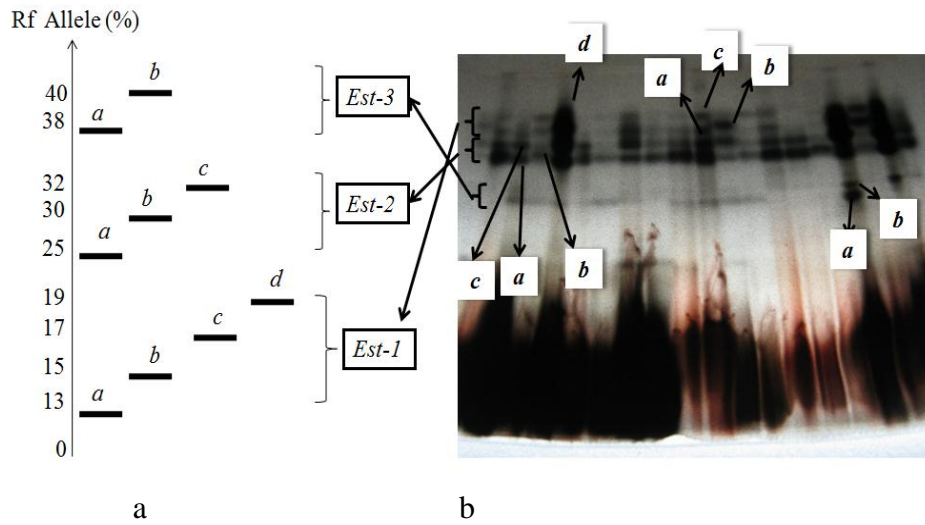


Gambar 6. Zimogram distribusi alel *a* berdasarkan persentase R_f (a) dan distribusi alel *a*, *b*, dan *c* pada lokus *6-Pg-1* (b) dari sistem enzim 6-PG pada *D. lowii*

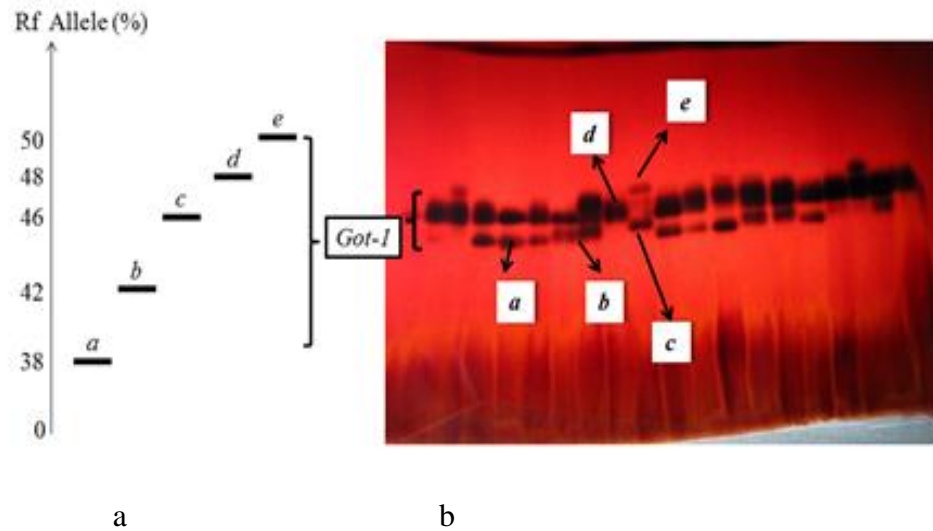
Pola pita polimorfik yang konsisten

Pola pita pada sistem enzim EST menunjukkan pola pita polimorfik yang konsisten. Zimogram (Gb. 7a) dan distribusi alel berdasar persentase R_f dari sistem enzim EST (Gb. 7b) tersebar pada 3 lokus yaitu lokus *Est-1* terdapat alel *a*, *b*, *c* dan *d* (R_f alel 13-19%), lokus *Est-2* terdapat alel *a*, *b*, dan *c* (R_f alel 25-32%), lokus *Est-3* terdapat *a* dan *b* (R_f alel 38-40%).

Pada sistem enzim GOT dihasilkan pola pita polimorfik meskipun hanya terdapat satu lokus yang terlihat konsisten. Zimogram (Gb. 8a) dan distribusi alel berdasar persentase R_f dari sistem enzim GOT (Gb. 8b) hanya ada 1 (satu) lokus yaitu lokus *Got-1* dengan lima alel yaitu alel *a*, *b*, *c*, *d*, dan *e*. Kisaran alel antara 38% sampai 50%.



Gambar 7. Zimogram distribusi alel berdasarkan persentase R_f (a) serta distribusi alel pada lokus *Est-1*, *Est-2*, dan *Est-3* (b) dari sistem enzim EST pada *D. lowii*



Gambar 8. Zimogram distribusi alel *a*, *b*, *c*, *d*, dan *e* berdasarkan persentase R_f (a) serta distribusi alel *a*, *b*, *c*, *d*, *e* pada lokus *Got-1* (b) dari sistem enzim GOT pada *D. lowii*

Berdasar hasil skrining tujuh enzim, maka enzim EST dan GOT kemudian digunakan untuk penelitian keragaman genetik, sistem perkawinan, aliran gen, isolasi, studi keragaman klonal dan geografik serta karakterisasi individu dan populasi. Hal ini disebabkan kedua enzim tersebut menghasilkan pola pita polimorfik yang konsisten.

PEMBAHASAN

Suatu enzim yang diteliti dengan teknik elektroforesis sering dijumpai lebih dari satu pita (*stained zone*) pada gel. Hal ini menunjukkan bahwa campuran warna awal mengandung lebih dari satu jenis enzim yang dapat berperan pada suatu substrat untuk memberikan hasil reaksi yang sama. Enzim tersebut disebut isozim atau iso-enzim. Produk langsung gen berupa protein dan enzim dapat dilacak dan dipelajari keragamannya dengan menggunakan gel dan elektroforesis. Isozim adalah enzim-enzim yang terdiri dari berbagai molekul aktif yang berbeda komposisi asam aminonya dan mengkatalisis reaksi yang sama. Perbedaan komposisi asam amino bisa disebabkan oleh alel berbeda dari lokus yang sama atau alel dari lokus yang berbeda (Novarianto *et al.*, 1999).

Elektroforesis adalah suatu cara pemisahan dalam suatu larutan atas dasar proses pemindahan partikel-partikel bermuatan karena pengaruh medan listrik. Molekul-molekul biologis yang bermuatan listrik dalam larutan akan bergerak ke arah elektroda yang polaritasnya berlawanan dengan muatan molekul. Pemisahan molekul-molekul dengan muatan yang berbeda merupakan prinsip yang digunakan dalam elektroforesis. Metode ini akan

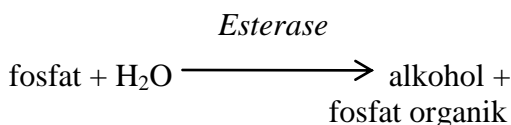
memisahkan nukleotida berbeda dan tiap protein (enzim) yang dianalisis ke dalam pola pita yang dapat dilihat melalui pewarnaan. Pita tersebut adalah hasil dari reaksi enzimatik dari substrat dengan enzim yang diamati. Perbedaan jarak migrasi pada pita-pita merupakan wujud dari perbedaan muatan dan bentuk molekul enzim (Nur & Adijuwana, 1987).

Sistem enzim EST dan GOT menghasilkan pola pita polimorfik yang konsisten. Pola pita pada sistem enzim EST dan GOT bersifat polimorfik karena mempunyai variasi alel dalam suatu populasi. Pola pita monomorfik dihasilkan dari sistem enzim DIA, POD, dan ACP karena tidak mempunyai variasi alel. Pola pita tidak konsisten muncul dihasilkan dari sistem enzim SHD dan 6-PG. Hal ini diduga karena aktivitas metabolit sekunder seperti fenol dan tanin maupun enzim *phenoloxidase* (Wendel & Weeden, 1989).

Hasil analisis isozim *D. lowii* menunjukkan bahwa dari dua sistem enzim yang digunakan yaitu EST dan GOT teridentifikasi empat lokus yaitu *Est-1*, *Est-2*, *Est-3* dan *Got-1* dengan jumlah alel keseluruhan sebanyak 14 alel. Menurut Mahfudz (2011), enzim EST dan GOT juga menghasilkan pola pita polimorfik yang konsisten pada tumbuhan Merbau (*Intsia bijuga*). Liu *et al.* (2010) melaporkan bahwa enzim EST dan DIA juga menghasilkan pola pita polimorfik yang konsisten pada tumbuhan *Myricaria laxiflora*. Enzim EST menghasilkan pola pita polimorfik yang konsisten pada *Shorea macrophylla* dan *S. pinanga* (Syah, 2012). Pada penelitian ini enzim ACP dan DIA menghasilkan pola pita monomorfik, sedangkan menurut Liu *et al.* (2010) pada *M. laxiflora* enzim ACP dan DIA menghasilkan pola pita polimorfik yang konsisten.

Sistem enzim EST pada *D. lowii* menghasilkan tiga lokus yaitu *Est-1* dan lokus *Est-2* masing-masing terdapat tiga alel serta lokus *Est-3* memiliki empat alel. Penggunaan enzim EST pada Merbau hanya dihasilkan satu lokus yaitu *Est-1* (Mahfudz, 2011). Sistem enzim EST pada *Myricaria laxiflora* menghasilkan tiga lokus (Liu *et al.*, 2010) yaitu *Est-1* terdapat tiga alel, lokus *Est-2* terdapat dua alel serta lokus *Est-3* terdapat tiga alel.

Pada sistem enzim EST digunakan metode pewarnaan isozim dengan substrat yang spesifik. Substrat spesifik tersebut adalah senyawa *Naphthyl Ester* yang dihidrolisis oleh enzim *Esterase* menjadi *Naphthol α* dan β . Selanjutnya dengan pewarna *Fast Blue RR* akan menghasilkan endapan berwarna merah kecoklatan. Enzim *esterase* tergolong dalam enzim kelompok III (*Hidrolase*) yang berfungsi melakukan pemotongan ester sederhana pada asam organik, asam anorganik, alkohol dan fenol serta mempunyai berat molekul rendah dan mudah larut. Reaksi yang terjadi adalah monoester sebagai berikut.



Substrat senyawa nitrofenil fosfat dihidrolisis oleh *esterase* menjadi nitrofenol dan fosfat an-organik. Nitrofenol dalam garam diazonium seperti *fast garnet GBC* membentuk endapan berwarna coklat (Vallejos, 1983 dalam Triastuti, 2004). Menurut Mansyah *et al.* (1999), kelebihan enzim EST yaitu pita-pita isozim paling cepat terbentuk dan paling mudah muncul pada pewarnaan dengan sistem enzim EST dibanding dengan sistem enzim yang lain.

Sistem enzim GOT hanya menghasilkan satu lokus (*Got-1*). Hal ini seperti yang terdapat pada tumbuhan *Camelia japonica* dengan sistem enzim SHD (*Shd-1*) (Ozaki *et al.*, 2003) dan pada tumbuhan *M. laxiflora* pada sistem enzim ADH (*Alcohol Dehydrogenase*) dengan lokus *Adh-1*, sistem enzim LDH (*Lactate Dehydrogenase*) dengan lokus *Ldh-1*, sistem enzim SKD (*Shikimate Dehydrogenase*) yaitu *Skd-1* (Liu *et al.*, 2010). Sistem enzim GOT pada Merbau menghasilkan dua lokus yaitu *Got-1* dan *Got-2* (Mahfudz, 2011). Pada *D. lowii* dengan menggunakan sistem enzim GOT terdapat lima alel, sedangkan pada Merbau hanya ada tiga alel (Mahfudz, 2011).

Variasi pola pita yang dibentuk enzim GOT lebih sedikit dibandingkan dengan enzim EST. Bailey (1983, dalam Sriyono, 2006) mengatakan bahwa perbedaan isoenzim akan menghasilkan kecepatan gerak yang tidak sama bila dikondisikan dalam medan listrik dan medium gel yang *semi-porous* sehingga setiap enzim yang berbeda akan menyebabkan pola pita (*banding pattern*) yang berbeda pula.

KESIMPULAN

Sampel daun *D. Lowii* yang diekstraksi kemudian dilakukan proses ekektroforesis dan analisis isozim dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Pola pita monomorfik yang konsisten dihasilkan oleh enzim DIA, POD, dan ACP.
2. Enzim yang menghasilkan pola pita polimorfik tetapi tidak konsisten adalah enzim SHD dan 6-PG.
3. Sistem enzim EST dan GOT menghasilkan pola pita polimorfik dan konsisten, sehingga dapat

digunakan untuk studi awal keragaman genetik. Pita-pita isozim paling cepat terbentuk dan paling mudah muncul pada pewarnaan dengan sistem enzim EST dibanding dengan sistem enzim yang lain.

4. Studi awal keragaman genetik pada *D. Lowii* diperoleh bahwa sistem enzim EST dan GOT teridentifikasi empat lokus yaitu *Est-1*, *Est-2*, *Est-3* dan *Got-1*. Lokus *Est-1* terdapat alel *a*, *b*, *c* dan *d* (R_f alel 13-19%), lokus *Est-2* terdapat alel *a*, *b*, dan *c* (R_f alel 25-32%), lokus *Est-3* terdapat *a* dan *b* (R_f alel 38-40%). Lokus *Got-1* terdapat lima alel yaitu alel *a*, *b*, *c*, *d*, dan *e* dengan kisaran alel antara 38% sampai 50%. Jumlah alel keseluruhan sebanyak 14 alel.

DAFTAR PUSTAKA

- Finkeldey, R. 2005. An introduction to tropical forest genetics, Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georgia-August-University Göttingen. Germany.
- Glaubitz, J.C. dan G.F. Moran. 2000. Genetics tools: The use of biochemical and molecular markers. Dalam Forest conservation genetics principles and practice. (Eds): Young, A.D., Boshier, D. Dan Boyle, T. CSIRO Publishing. Collingwood, Australia. p. 81-90.
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Philo. Trans. Roy. Soc. London. 351: 1291-1297.
- Liu Y., Y. Wang, S. Liu, and H. Huang. 2010. Allozyme variation of the endangered endemic plant *Myricaria laxiflora*: Implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* xxx: 1-8.
- Lowe, A., S. Harris and P. Ashton. 2004. Ecological genetics: design, analysis, and application. Blackwell Publishing. Victoria, Australia.
- Mahfudz. 2011. Pemuliaan Merbau (*Intsia bijuga* O. Ktze.) dan Implikasinya. Disertasi. Fakultas Kehutanan UGM.
- Mansyah, E., M. J. Anwarudinsyah, L. Sadwiyanti dan A. Susiloadi. 1999. Variabilitas genetik tanaman Manggis melalui analisis isozim dan kaitannya dengan variabilitas fenotipik. *Zuriat*. 10(1): 1-10.
- Novariantio, H., A. Hartana, F. Rumawas, M. A. Rifai, E. Guhardja, A. H. Nasoetion. 1999. Studi keterpautan pola pita isozim dengan karakter kuantitatif pada bibit kelapa F2. *Zuriat*. 10 (1) : 48-53.
- Nur, A., dan Adijuwana. 1987. Teknik pemisahan dalam analisis biologi. Depdikbud Dirjen Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. IPB. Bogor.
- Ozaki, Y., M. Kanda, I. Miyajima, and H. Okubo. 2003. Variation of self-incompatibility in *Camelia japonica* L. Cultivars. Journal of Faculty of Agriculture, Kyusu University 47:251-255.
- Otrosina, W.J., T.E. Chase and F.E. Cobb. 1991. Allozymes differentiation of intersterility group of *Hererobusidion annosum* isolated from conifer in Western US. *Phytopathology* 82(5): 540-45.
- Sriyono. 2006. Identifikasi dan keragaman genetik pohon induk durian (*Duria zibethinus* Murr) lokal di Jawa Tengah berdasarkan penanda morfologi dan pola pita isoenzim.

- Tesis S2 Program Pasca Sarjana
UNS. Surakarta.
- Syah, T.H. 2012. Sistem perkawinan
Shorea macrophylla dan *Shorea
pinanga* di areal Tegakan alam PT
Sari Bumi Kusuma, Kalimantan
tengah. Tesis. Fakultas kehutanan
UGM.
- Triastuti, Y. 2004. Identifikasi tanaman
kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill)
lokal Gunung Kidul melalui studi
morfologi dan uji isozim. Skripsi S1
Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Wendel, J.F. & N.F. Weeden. 1989.
Visualization and interpretation of
plant isozymes. In 'Isozymes in
Plant Biology'. (eds P. Soltis dan D.
Soltis) vol 4, chapter 1, p. 5-45.
Dioscorides Press. Portland.
- White, T.L. W.T. Adams and D.B. Neale.
2007. Forest genetics. CABI
Publishing.
- Yeh, F.C. 2000. Population Genetics. In A
Young, D. Boshier dan T. Boyle
(Eds), Forest Conservation
Genetics, Principle and Practice.
CABI Publishing.
-