

Penggunaan Teknik Elektroforesis Gel Pati untuk Mendeteksi Variasi Isozim Empat Jenis Tanaman Buah (*Garcinia mangostana*, *Parkia javanica*, *Nephelium lappaceum*, dan *Artocarpus heterophyllus*)

N. Sri Hartati¹, E. Sudarmonowati¹, A. Fahdiar¹, dan U.J. Siregar²

¹*Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI, Cibinong*

²*Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor*

ABSTRAK

Teknik elektroforesis isozim khususnya pada gel pati kentang merupakan metode yang telah lama dikembangkan untuk analisis keragaman genetik tanaman. Oleh karena kualitas pita enzim yang bagus sangat diperlukan untuk mendukung ketepatan analisis, maka dilakukan optimisasi metode elektroforesis yang meliputi pemilihan komposisi bufer pengestrak, sistem bufer elektroforesis, prosedur pewarnaan enzim serta pemilihan material tanaman. Sebelas sistem enzim diekstraksi dari daun, embrio, atau bakal tunas manggis (*Garcinia mangostana*), petai (*Parkia javanica*), rambutan (*Nephelium lappaceum*) dan nangka (*Artocarpus heterophyllus*), menggunakan tiga macam bufer pengestrak. Sistem enzim yang diidentifikasi adalah Aspartat Amino Transferase (AAT), Posfatase asam (ACP), Alkohol dehidrogenase (ADH), Esterase (EST), Alkaline posfatase (ALP), Peroksidase (PER), Malat dehidrogenase (MDH), Isositrat dehidrogenase (IDH), dehidrogenase (SDH), dan 6-Posfogluconat dehidrogenase (6-PGD). Faktor lain yang dicoba adalah jenis sistem bufer elektroforesis yaitu Lithium (L), Histidin (H) pH 8,0 atau pH 6,0 Morfolin sitrat (MC) dan Sodium borat (SB). Dari sebelas sistem enzim yang dicoba, delapan enzim dapat dideteksi pada manggis, sembilan enzim pada nangka, sembilan enzim pada petai, dan delapan enzim pada rambutan. Berdasarkan jumlah enzim yang dapat dideteksi serta kualitas pita yang dihasilkan material tanaman yang paling baik digunakan adalah daun. Sistem bufer elektroforesis yang terbaik untuk keempat jenis tanaman adalah MC karena resolusi sebagian besar sistem enzim baik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keragaman genetik dapat dideteksi sehingga dapat mendukung penelitian selanjutnya untuk mendapatkan nilai keragaman genetik (*genetik diversity value*) pada jumlah sampel yang besar.

Kata kunci: Elektroforesis, gel pati, isozim.

ABSTRACT

Isozymes electrophoretic technique, especially, starch gel potato is an established method that has been developed for plant genetic diversity analysis. As the accuracy of electrophoretic method including the composition of enzyme extraction buffer, electrophoretic buffer system, enzyme staining procedure and choice of plant materials for enzyme extraction were carried out. Eleven enzyme systems were extracted from leaves and embryos of *Garcinia mangostana*, *Artocarpus heterophyllus*, *Parkia javanica*, and *Nephelium lappaceum* using three kind of enzyme extraction buffer. Enzyme systems identified were Aspartate Amino Transferase (AAT), Acid Phosphatase (ACP), Alcohol Dehydrogenase (ADH), Esterase (EST), Alkaline Phosphatase (ALP), Peroxidase (PER), Malate Dehydrogenase (MDH), Isocitric Dehydrogenase (IDH),

Sikimic Dehydrogenase (SDH), and 6-Phosphogluconic Dehydrogenase (6-PGD). Other factors tried were buffer electrophoretic systems namely Lithium (L), Histidin (H) pH 8.0 and pH 6.0, Morpholine Citrate (MC) and Sodium Borate (SB). Of 11 enzymes system used 8, 9, 9, and 8 enzymes could be detected in mangosteen, jackfruit, parkia and in rambutan, respectively. Based on the number of enzymes detected and its band quality, leaves were the most suitable material for enzyme extraction. The best resolution of most enzymes detected in four species was obtained using MC electrophoretic buffer system. Result indicated that genetic diversity could be detected so it will be useful for further work to obtain genetic diversity value in large number of samples.

Key words: Electrophoretic, starch gel, isozymes.

PENDAHULUAN

Manggis (*Garcinia mangostana*), nangka (*Artocarpus heterophyllus*), dan rambutan (*Nephelium lappaceum*) merupakan tanaman buah daerah tropis yang digemari masyarakat Indonesia karena rasanya lezat serta mengandung berbagai vitamin yang diperlukan tubuh. Manggis dan rambutan adalah tanaman asli daerah Asia Tenggara. Manggis menyebar ke seluruh daerah tropis yakni Indonesia, Burma, Muangthai, Filipina, dan Australia bagian utara (Sunarjono, 1987). Sampai saat ini perbanyakan tanaman manggis kebanyakan dilakukan dari biji karena perbanyakan secara vegetatif seperti cangkok dan okulasi sulit menghasilkan bibit, sedangkan rambutan diperbanyak dari bibit vegetatif baik okulasi maupun cangkok (Sunarjono, 1987). Pohon nangka umumnya heterozigot, di alam ragamnya cukup banyak dan dapat dibedakan berdasarkan keadaan dan sifat buahnya (Suharti dan Alrasyid, 1993).

Petai termasuk ke dalam famili *leguminosae* dan dapat ditemukan di daerah tropis yang beriklim lembab. Bagian tanaman yang biasa dimanfaatkan adalah buahnya baik dimakan langsung maupun sebagai campuran pada beberapa jenis masakan. Di Malaysia, daun dan kulit batang petai banyak digunakan sebagai obat. Pemanfaatan kayu pohon petai sebagai bahan pembuatan kertas telah dilakukan di Filipina, di samping itu di kepulauan Filipina kulit batangnya digunakan sebagai bahan pewarna jala (Burkill, 1966).

Potensi jenis-jenis tanaman di atas sangat besar baik untuk pangan maupun untuk bahan baku industri kertas, maka dipandang perlu untuk melakukan evaluasi dari segi keragaman genetik plasma nutfahnya. Studi mengenai keragaman genetik plasma nutfah sangat penting, baik dari segi biologi maupun dalam program pemuliaan (Hadisunarso *et al.*, 1994). Elektroforesis isozim pada gel pati kentang adalah salah satu metode yang dapat diterapkan untuk mengevaluasi keragaman genetik.

Teknik analisis isozim telah terbukti merupakan metode yang cepat dan cukup ekonomis dalam studi genetik tanaman. Beberapa jenis jaringan dapat digunakan untuk keperluan analisis dan pilihan akhir tergantung pada ketersediaan material tanaman dan aktivitas biokimianya. Pada jaringan tanaman dengan kandungan metabolit sekunder tinggi seperti halnya daun kerusakan enzim dapat dicegah dengan menghilangkan senyawa fenolik (Liengsiri *et al.*, 1992).

Tujuan penelitian ini adalah mencari metode elektroforesis yang optimum untuk identifikasi isozim tanaman manggis, nangka, petai, dan rambutan pada gel pati kentang dengan mengamati pengaruh perbedaan jaringan tanaman yang digunakan, komposisi bufer pengekstrak enzim serta sistem bufer elektroforesis terhadap intensitas dan resolusi isozim.

BAHAN DAN METODE

Material tanaman yang digunakan berupa daun diperoleh dari kebun plasma nutfah Puslitbang Bioteknologi LIPI di Cibinong sedangkan embrio diambil dari buah yang diperoleh dari pasar lokal di daerah Bogor dan Citeureup (Jawa Barat). Ekstraksi enzim dilakukan pada kondisi dingin dengan menggerus 0,5 g daun bersama dengan nitrogen cair kemudian ditambahkan 1 ml bufer pengekstrak, atau satu buah embrio dengan satu tetes bufer pengekstrak hingga homogen. Homogenat ditempatkan pada tabung eppendorf 1 ml yang berlubang dan diletakkan kapas di dalamnya, kemudian diletakkan pada tabung eppendorf lain untuk selanjutnya disentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan pada 5000 rpm dan 4°C selama 10 menit. Ekstrak enzim diserap dengan potongan kecil kertas saring dan langsung dielektroforesis pada 11% gel pati kentang di dalam lemari pendingin. Pita isozim diamati pada dua arah migrasi yaitu katoda dan anoda untuk peroksidase (PER), esterase (EST), posfatase asam (ACP), aspartat amino transferase (AAT), alkalin posfatase (ALP), sedangkan untuk alkohol dehidrogenase (ADH), isositrat dehidrogenase (IDH), malat dehidrogenase (MDH), 6-posfoglukonat dehidrogenase (6PGD), sikimat dehidrogenase (SDH), dan malik enzim (ME) hanya diamati pada satu arah saja (anoda).

Komposisi bufer pengekstrak yang digunakan ada dua jenis yaitu bufer C dan W (Tabel 1). Sistem bufer elektroforesis (Tabel 2) ada lima jenis yaitu: Litium (L), Histidin pH 8,0 dan pH 6,0 (H), morfolin sitrat (MC) serta sodium borat (SB). Prosedur pewarnaan enzim adalah menurut Wickneswari (1995), (EST, ADH, IDH, MDH, ME, 6PGD, SDH), Cheliak dan Pitek (1984) (ACP), Seido (1993) (PER), Vallejos (1983) (ALP), Soltis (1989) (AAT).

Tabel 1. Jenis dan komposisi bufer pengekstrak enzim.

No.	Jenis pengekstrak	Komposisi	Pustaka
1.	C	8% polivinil pirolidon (PVP) 25000 0,3 M sukrosa 0,5 mM etilen diamin tetra asetat (EDTA) 1 mM ditionitritol (DTT) 1 mM asam askorbat 0,1% bovin serum albumin (BSA) 0,4 mM nikotinamida adenin dinukleotida (NAD) 0,3 mM nikotinamida adenin dinukleotida posfat (NADP) 0,2 mM piridoksal 5 - posfat 0,66 ml mercaptoetanol per 100 ml bufer atur pH hingga 6,7 dengan 1 M tris	Cheliak dan Pitel, 1984
2.	W	0,05% bufer borat 0,01 M asam askorbat 0,5 M sukrosa 1% tween 80 0,2% $MgCl_2$ 1% 20 M polietilen glikol (PEG) 1% targikol 0,1% mercapto etanol 0,5% 2 - fenoksi etanol 0,005 M EDTA 2% egg albumin 0,006 M DTT 0,05 M sodium dietil ditio karbamat (DIECA) 0,02 M natrium bisulfat ($Na_2S_2O_5$) 5% PVP 25000	Wickneswari dan Norwati, 1992

Tabel 2. Jenis dan komposisi sistem bufer elektroforesis.

Sistem bufer elektroforesis	Komposisi		Pustaka
	Gel bufer	Elektroda bufer	
1. H pH 6,0	5 mM L - Histidin, pH diatur hingga 6,0 dengan Tris	50 mM asam sitrat monohidrat, 150 mM Tris, pH diatur hingga 6,0	Horry, 1989
2. H pH 8,0	0,005 M Histidin Hcl, pH diatur hingga 8,0 dengan 10 N NaOH	0,41 M trisodium sitrat, pH diatur hingga 8,0 dengan 0,41 M asam sitrat	Wickneswari, 1995
3. L	9 bagian larutan 0,065 M Tris + 0,01 M asam sitrat monohidrat serta 1 bagian elektroda bufer, pH 8,2	0,005 M litium hidroksida, 0,19 M asam borat, pH 8,5	Wickneswari, 1995
4. MC	20 X pengenceran larutan elektroda bufer	0,04 M asam sitrat monohidrat, pH diatur hingga 1 dengan N-(3-amino - profil) - mofrolin	Wickneswari, 1995
5. SB	9 bagian larutan 0,046 M Tris + 0,0064 M asam sitrat serta 1 bagian elektroda bufer, pH 8,3	0,192 M asam borat, pH diatur hingga 8,3 dengan NaOH	Soltis dan Soltis, 1989

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pewarnaan isozim manggis, nangka, petai, dan rambutan dapat dilihat pada Tabel 3, 4, 5, dan 6. Sistem gel bufer MC dapat mendeteksi enzim paling banyak. Enzim manggis tampaknya paling sulit diekstraksi dibanding tiga tanaman lainnya yang terlihat dari jumlah enzim dengan resolusi dan intensitas warna pita yang baik yaitu PER, EST dan 6PGD, sedangkan yang paling mudah diekstraksi adalah enzim petai. Isozim ALP tidak terdeteksi pada semua spesies.

Jenis jaringan tanaman dengan kandungan senyawa fenolik atau produk metabolit sekundernya tinggi dapat diatasi dengan menghilangkan senyawa fenolik (Liengsiri *et al.*, 1992). Metode untuk menghilangkan senyawa fenolik adalah dengan menambahkan beberapa jenis polimer untuk mengabsorpsi fenol, kontrol pH untuk menjaga interaksi ionik, penambahan sejenis senyawa tiol seperti sistein dan merkaptoetanol serta senyawa sejenis seperti asam askorbat juga BSA (Andersdon, 1968; Loomis dan Battaile, 1966 dalam Liengsiri *et al.*, 1992). Untuk mengatasi kesulitan ekstraksi enzim manggis mungkin perlu ditingkatkan konsentrasi senyawa yang dapat melepaskan senyawa fenolik.

Tabel 3. Hasil pewarnaan isozim manggis pada sistem bufer elektroforesis H, L, SB dan MC.

Sistem enzim dan jenis bufer pengekstrak		Sistem gel bufer dan material tanaman									
		H pH 6,0		H pH 8,0		L		MC		SB	
		D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
AAT	C					++	-	+			+
	W						+	++	-		
ACP	C					+	-	++			
	W							++			
ADH	C				+	-		-	-		
	W		-		-			-			
ALP	C						-				
	W										
EST	C					++	-	+++			
	W						+	+++	++		+
IDH	C							+			
	W							++			
MDH	C				+			-			
	W		+		+			+	++		
ME	C							-			
	W							-			
PER	C				+	++	+	+++	+		+++
	W		++		+		++	+++	+++		++
6PGD	C							+++			
	W							+++			
SDH	C							-			
	W							++			

Keterangan: (-) = tidak ada aktivitas
(+) = ada aktivitas enzim tetapi tidak terpisah
(++) = ada aktivitas enzim tetapi pemisahan kurang baik
(+++) = ada aktivitas enzim pemisahan baik
() = tidak dicoba

Tabel 4. Hasil pewarnaan isozim angka pada sistem bufer elektroforesis H, L, SB, dan MC.

Sistem enzim dan jenis bufer pengekstrak		Sistem gel bufer dan material tanaman									
		H pH 6,0		H pH 8,0		L		MC		SB	
		D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
AAT	C					+++	-	+			-
	W							++	-		
ACP	C					+	-	++			
	W							+++			
ADH	C				++	-		-	-		
	W		++		-			-	-		
ALP	C						-				
	W										
EST	C					++	-	+++			
	W						+	+++	+		+++
IDH	C							+			
	W							+++			
MDH	C				++			-	++		+
	W			+	+			+	+++		+
ME	C							-			
	W							+			
PER	C				+	++	+++	+++	+		+++
	W			+	+		++	+++	++		++
6PGD	C							+++			
	W							+++			
SDH	C							+++			
	W							+++			

Keterangan: (-) = tidak ada aktivitas
 (+) = ada aktivitas enzim tetapi tidak terpisah
 (++) = ada aktivitas enzim tetapi pemisahan kurang baik
 (+++) = ada aktivitas enzim pemisahan baik
 () = tidak dicoba

Tabel 5. Hasil pewarnaan isozim petai pada sistem bufer elektroforesis H, L, SB dan MC.

Sistem enzim dan jenis bufer pengekstrak		Sistem gel bufer dan material tanaman									
		H pH 6,0		H pH 8,0		L		MC		SB	
		D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
AAT	C					+++	++	+			++
	W						++	++	+		
ACP	C					+	-	+++			
	W							-			
ADH	C				-	-		-	+++		
	W		-		+				-		
ALP	C						-				
	W										
EST	C					++	++	+++			
	W						++	+++	+++		
IDH	C							+			
	W							+			
MDH	C				++			-			++
	W		+		+			+	+++		+
ME	C							-	+++		
	W							-			
PER	C		+			+++	+++	++	+		++++
	W		+		+		++	++	+++		+
6PGD	C							+++			
	W							+++			
SDH	C							+++			
	W							+			

Keterangan: (-) = tidak ada aktivitas
 (+) = ada aktivitas enzim tetapi tidak terpisah
 (++) = ada aktivitas enzim tetapi pemisahan kurang baik
 (+++) = ada aktivitas enzim pemisahan baik
 () = tidak dicoba

Isozim PER, EST dan ACP bergerak ke kutub katoda dan anoda. Pada keempat tanaman, isozim PER adalah yang paling mudah dideteksi karena selalu muncul baik diekstrak dari daun maupun embrio dengan menggunakan kedua jenis bufer peng-ekstrak (W dan C) serta semua jenis bufer elektroforesis yang dicoba. Pada daun lebih banyak enzim yang terdeteksi dibanding embrio kecuali MDH hasil terbaik hanya diperoleh dari embrio.

Tabel 6. Hasil pewarnaan isozim rambutan pada sistem bufer elektroforesis H, L, SB, dan MC.

Sistem enzim dan jenis bufer pengekstrak		Sistem gel bufer dan material tanaman									
		H pH 6,0		H pH 8,0		L		MC		SB	
		D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
AAT	C					+++	++	+			++
	W						++	++	+		
ACP	C					+	-	++			
	W							+++			
ADH	C				++	-		-	++		
	W		-		-			-			
ALP	C						-				
	W										
EST	C					++		+++			++
	W						++	+++	+++		
IDH	C							+			
	W							+			
MDH	C		+					-	+++		++
	W		+		+			+	+++		
ME	C							-			
	W							-			
PER	C		+			++	+++	+++	+		++++
	W		+		++		++	+++	+++		
6PGD	C							+++			
	W							-			
SDH	C								-		
	W								-		

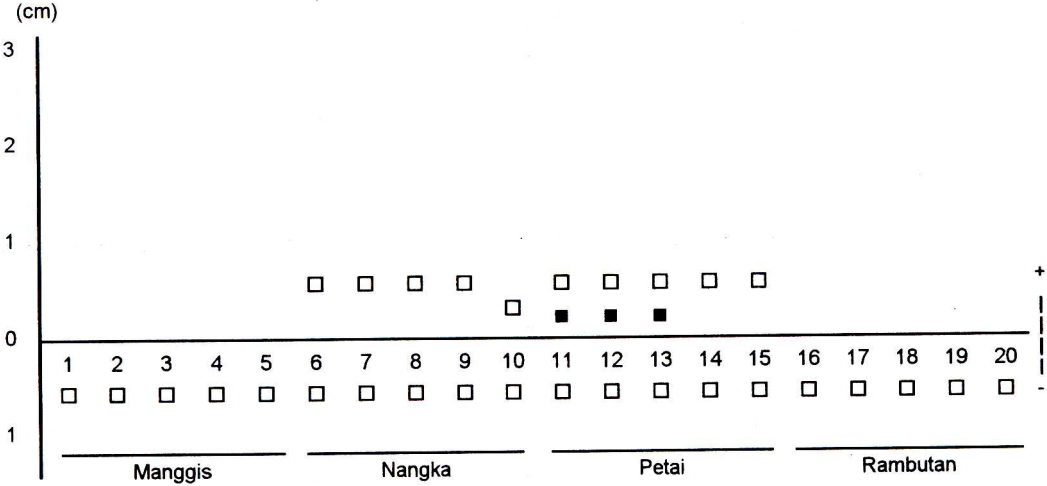
Keterangan: (-) = tidak ada aktivitas
 (+) = ada aktivitas enzim tetapi tidak terpisah
 (++) = ada aktivitas enzim tetapi pemisahan kurang baik
 (+++) = ada aktivitas enzim pemisahan baik
 () = tidak dicoba

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap pita isozim ada beberapa jenis enzim dengan resolusi dan intensitas warna pita sangat baik yaitu tiga jenis untuk manggis (EST, PER, dan 6 PGD), lima jenis untuk nangka (ACP, EST, IDH, MDH, dan PER), enam jenis untuk petai (PER, AAT, ACP, EST, 6PGD, dan SDH) serta enam jenis untuk rambutan (AAT, PER, ACP, EST, MDH, dan 6PGD). Hasil terbaik untuk enzim EST, PER, dan MDH diperoleh dengan menggunakan bufer pengekstrak W dan C, sedangkan pita isozim AAT terbaik (manggis dan rambutan) diperoleh dengan bufer pengekstrak C. Bufer W cocok untuk mengekstrak isozim ACP (petai dan rambutan).

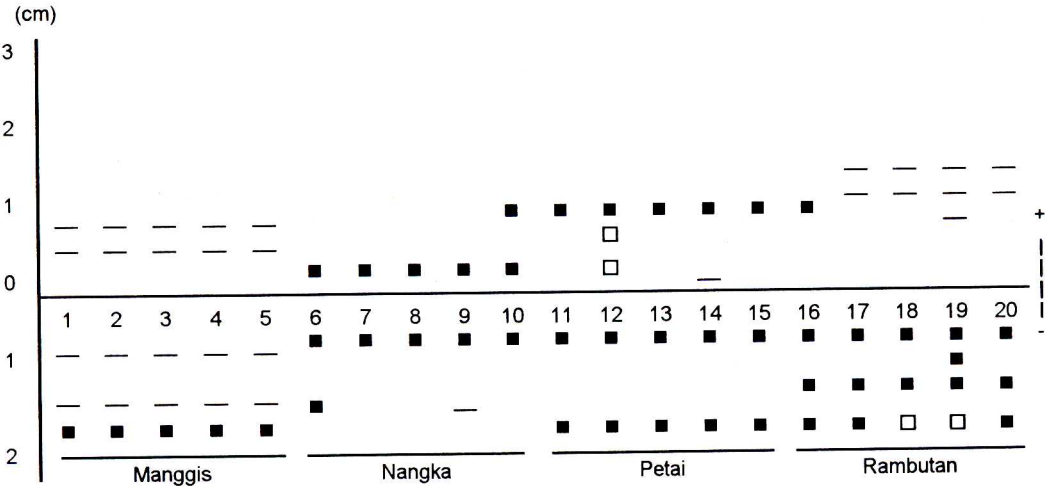
Tabel 7. Kondisi elektroforesis optimum hasil percobaan untuk manggis, nangka, petai, dan rambutan.

Jenis tanaman	Sistem enzim	Material tanaman	Jenis bufer pengestrak	Sistem bufer elektroforesis
Manggis	EST	D	C	MC
		D	W	MC
	PER	E	W	MC
		D	C	MC
		D	W	MC
		E	C	SB
		E	W	SB
	6 PGD	D	C	MC
		D	W	MC
Nangka	ACP	D	W	MC
		D	C	MC
	EST	D	W	MC
		E	W	SB
		E	C	SB
		D	W	MC
		E	W	MC
	IDH	D	W	MC
	MDH	E	W	MC
Petai	PER	E	C	L
	AAT	D	C	L
	ACP	D	W	MC
	EST	E	W	MC
		D	C	MC
	PER	D	W	MC
		E	W	SB
		D	C	L
		E	C	L
		E	W	MC
Rambutan	6 PGD	D	C	MC
		D	C	MC
	SDH	D	W	MC
		D	C	MC
		D	W	MC
		D	C	MC
		D	C	MC
	PER	E	C	L
		D	C	MC
	6 PGD	D	W	MC
		D	C	MC
	MDH	D	C	MC

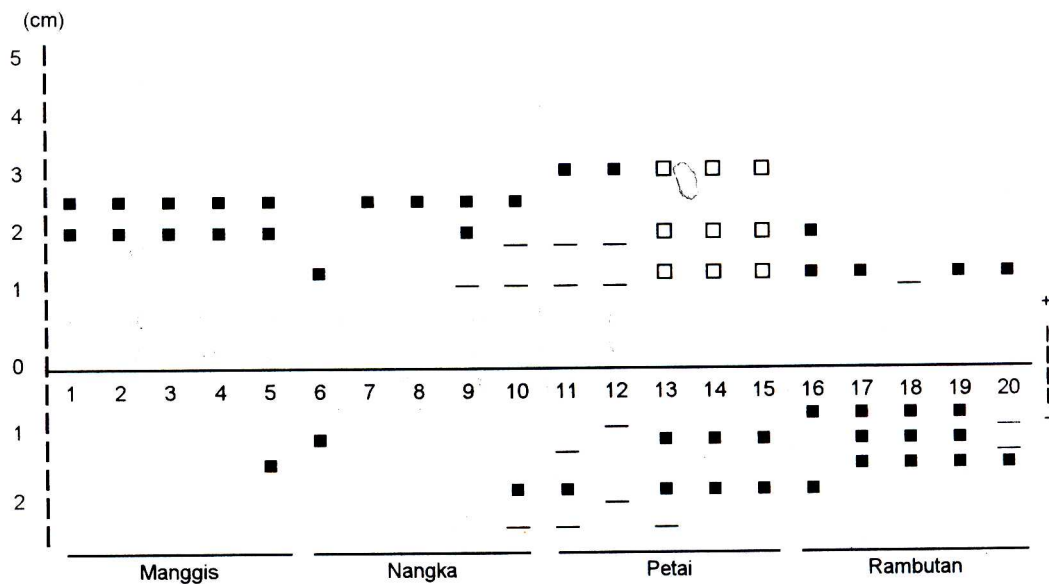
Polimorfisme isozim, angka, petai, dan rambutan dapat teramati seperti tampak pada Gambar 1-8.



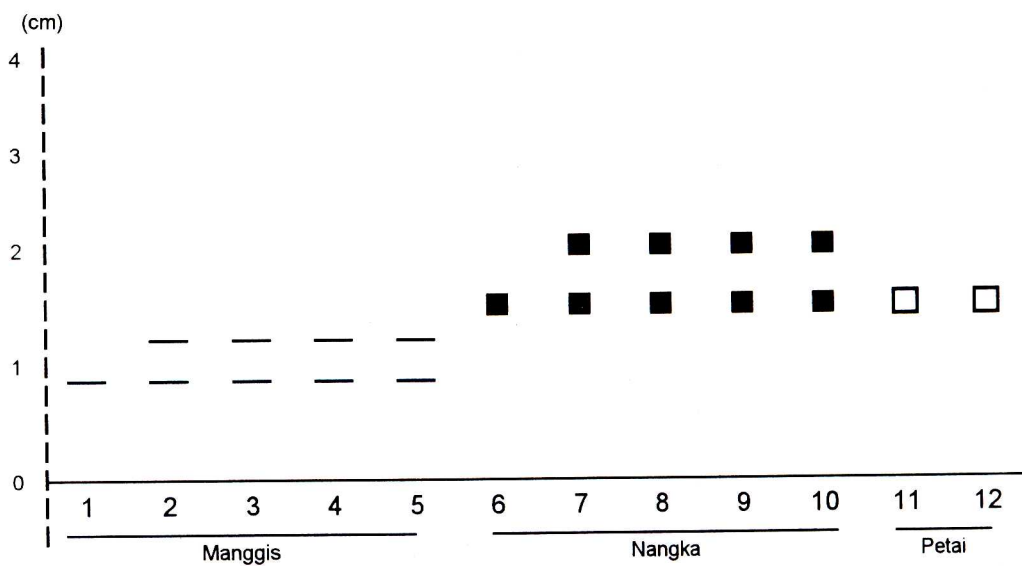
Gambar 1. Zimogram AAT sampel daun manggis, nangka, petai, dan rambutan pada sistem bufer elektroforesis MC.



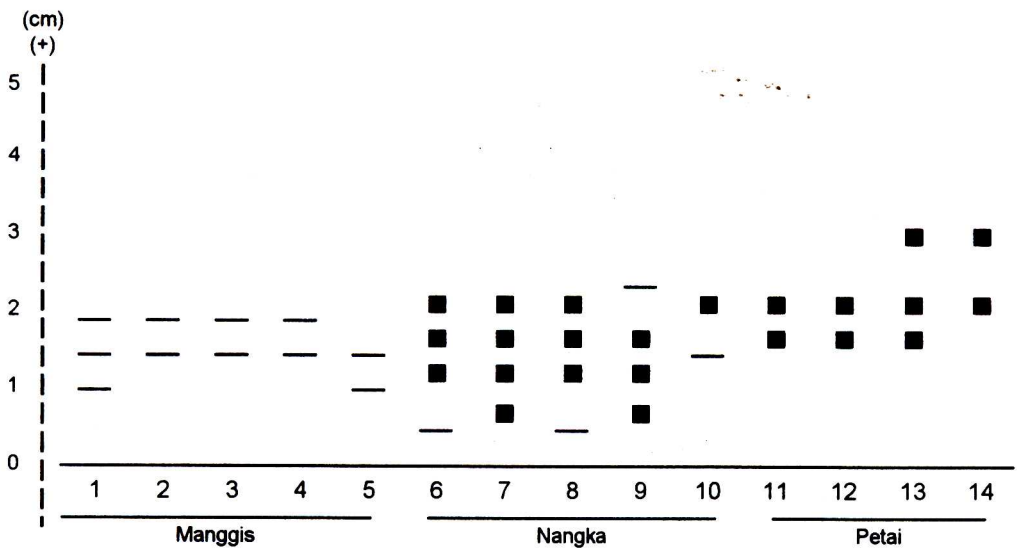
Gambar 2. Zimogram EST sampel daun manggis, nangka, petai, dan rambutan pada sistem bufer elektroforesis MC.



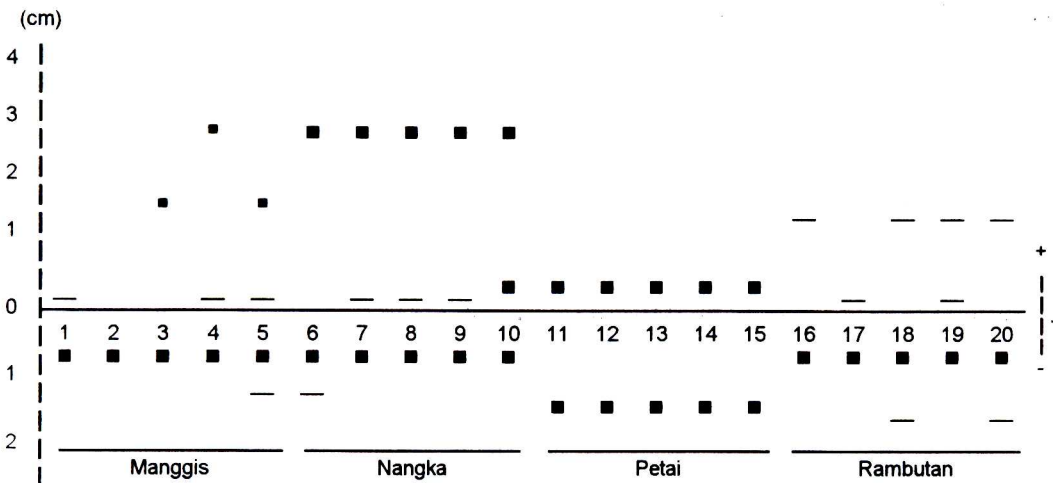
Gambar 3. Zimogram PER sampel daun manggis, nangka, petai, dan rambutan pada sistem bufer elektroforesis MC.



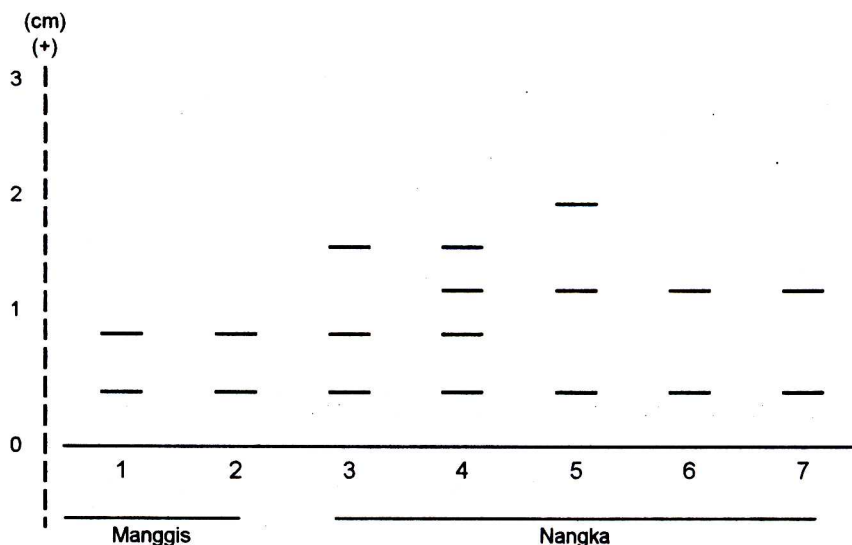
Gambar 4. Zimogram SDH sampel daun manggis, nangka, dan petai, pada sistem bufer elektroforesis MC.



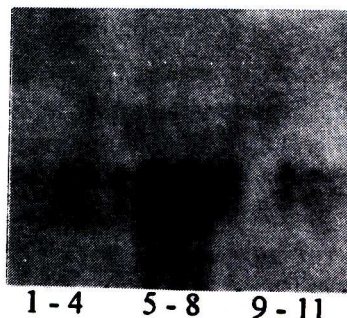
Gambar 5. Zimogram 6 PGD sampel daun manggis, nangka, dan petai pada sistem bufer elektroforesis MC.



Gambar 6. Zimogram ACP sampel daun manggis, nangka, petai, dan rambutan pada sistem bufer elektroforesis MC.



Gambar 7. Zimogram IDH sampel daun manggis dan nangka pada sistem bufer elektroforesis MC.



Gambar 8. Zimogram MDH sampel embrio nangka (1-4), petai (5-8), dan rambutan (9-11) pada sistem elektroforesis MC.

Umumnya pola isozim yang teramati adalah multi lokus (lebih dari satu lokus). Pada PER, EST, AAT, ACP, MDH, dan ADH terdeteksi adanya inter dan intra spesifik polimorfisme. Manggis sampai saat ini diperbanyak dengan biji di mana biji manggis bersifat *apomixis* sehingga kemungkinan terjadinya variabilitas sangat kecil (Sunarjono, 1987). Fenomena tersebut dapat terlihat dari hasil identifikasi isozim manggis, hampir keseluruhan isozim tidak menunjukkan keragaman.

KESIMPULAN

Dari keempat sistem bufer elektroforesis yang dicoba sistem bufer MC dapat mendeteksi enzim paling banyak. Isozim PER adalah yang paling mudah terdeteksi. Manggis, nangka, petai, dan rambutan baik yang diekstrak dari daun maupun embrio serta pada semua sistem bufer elektroforesis yang dicoba. Pada nangka, petai, dan rambutan terdeteksi adanya inter dan intraspesifik polimorfisme pada beberapa enzim.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terselenggara atas dukungan dana dari CIFOR. Terima kasih diucapkan kepada saudari Santi Sugiharti atas bantuan teknis di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Burkill, I.H. 1966.** A dictionary of the economic product of the Malay Peninsula. Vol. II : 1697-1700
- Cheliak, W.M. and J.A. Pitel. 1984.** Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report PI - X - 42. Petawawa National Forestry Institute:17, 24.
- Hadisunarso, U. Widyastuti, Miftahudin, dan H. Aswidinnoor. 1994.** Studi keragaman genetik plasma nutfah kedelai menggunakan penanda isoenzim. Prosiding Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II, Cibinong 6-7 September. 187-188
- Horry, J.P. 1989.** The genetic structure of wild and cultivated bananas as perceived through isozyme variation. *In* Horry, J.P. (Ed.). Chimiotaxonomie et Organisation Genetic dans Le Genre Musa. Universite De Paris-SUD, Centre D'Orsay: pp. 1-21.
- Liengsiri, C., C. Piewluang, and T.J.B. Boyle. 1992.** Characterization of isozyme of three tropical tree species - effect of extraction and running buffers on staining intensity and resolution. ASEAN - Canada Forest Tree Seed Centre Project. Technical Publication No. 8: 111-112.
- Seido, K. 1993.** Manual of isozyme analysis. JICA and Ministry of Forestry in Indonesia : 21,22
- Soltis, D.E and P.S. Soltis, 1989.** Isozim in plant biology. Dioscorides. Press. Portland. Oregon. 268 pp.

- Suharti, S. dan H. Alrasyid. 1993.** Pedoman teknis penanaman pohon nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk). Departemen Kehutanan Badan Litbang Kehutanan. Pusat Penelitian Hutan dan Konservasi Alam. Informasi Teknis. No. 41: 1.
- Sunarjono, H. 1987.** Ilmu produksi tanaman buah - buahan: 166, 173, 174.
- Vallejos, C.E. 1983.** Enzyme activity staining. *In* Tanksley, S.D. (Ed.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. Elsevier Science Publishers. Netherland: 498 pp.
- Wickneswari, R. and M. Norwati. 1992.** Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from acacias. *In* Breeding Technologies for Tropical Acacias. ACIAR Proceedings No. 37, ACIAR, Canberra. pp. 88-100.