

PENGGUNAAN MARKA ISOZIM UNTUK ANALISIS KERAGAMAN GENETIK TANAMAN

Oleh :

Dra. Fauziah Harahap, M.Si

I. PENDAHULUAN

Program pelestarian plasma nutfah dalam rangka perbaikan genetik tanaman sangat bergantung pada sumber keragaman genetik yang tersedia. Yang menjadi kendala adalah masih relatif sedikit informasi genetik tanaman yang diketahui. Keragaman genetika bukan hanya masalah koleksi plasma nutfah secara fisik, tetapi juga penilaian sejauh mana keragaman genetika tersebut diperlukan untuk kegiatan manipulasi genetika dari sifat-sifat yang mendukung hasil tetua yang digunakan (Makmur, 1988).

Kemajuan dalam genetika dan biologi molekuler telah memberikan alat untuk analisis genetik secara mendetail pada organisme tingkat tinggi, termasuk tanaman. Analisis keragaman genetik suatu populasi tanaman dapat diamati dengan pengamatan secara langsung sifat morfologi tanaman, analisis kandungan kimiawi jaringan tanaman, juga pada level protein sampai DNA. Pada tingkat DNA dikenal marka RFLP (Restriction fragment length polymorphism), RAPD (Random amplified polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) dan SSR (Simple sequence repeats). Pada tingkat protein, dikenal studi analisa dengan menggunakan marka isozim.

Enzim merupakan protein biokatalisator untuk proses fisiologis tanaman, yang pembentukan dan pengaturannya dikontrol secara genetik. Isoenzim atau isozim adalah enzim polimorfis yang terdapat pada organisme, mengkatalis reaksi kimia yang sama tetapi mempunyai berat molekul dan muatan listrik yang berbeda (Weeden dan Wendel, 1989). Isozim dapat dipisahkan dengan metode elektroforesis yang hasilnya berupa pola pita. Pola pita individu tanaman dapat bercorak khas sehingga dapat digunakan untuk penciri adanya perbedaan genetik. Struktur kimia isozim yang berbeda menyebabkan

terjadinya perbedaan kecepatan dalam proses pemisahannya. Variasi mobilitas suatu protein secara langsung mencerminkan perbedaan sekuen DNA dari struktur gen (Weeden dan Wendel, 1989). Pola pita individu tanaman bervariasi dalam hal ada tidaknya pita, jumlah pita dan pergerakan relatifnya. Hal ini disebabkan oleh perbedaan alel pada lokus yang sama atau lokus yang berbeda.

Pemanfaatan pola pita isozim untuk menganalisis keragaman genetik dapat dipercaya karena hanya diatur oleh gen tunggal dan bersifat kodominan dalam pewarisannya dan bersegregasi menurut nisbah Mendel (Adam, 1983).

Secara luas, analisis isozim dapat digunakan untuk: - Mempelajari evolusi dengan melihat sistem perkawinan, aliran gen dan seleksi, - Menilai tingkat variasi dalam populasi (Hamrick, 1989), - Mengevaluasi plasma nutfah dan konservasi (Balagtas dan Ramirez, 1991), - Analisis variasi protein dan enzim, - Identifikasi keterkaitan antara lokus enzim dan gen yang mengontrol resistensi terhadap penyakit atau sifat kuantitatif pada suatu tanaman (Kahler dan Wehrhain, 1986), Mengidentifikasi spesies, varietas hibrida dan keberhasilan persilangan buatan, - Mempelajari pola kekerabatan tanaman, - Melihat hubungan filogenik populasi (Stebbin, 1989).

II. KEUNGGULAN DAN KEKURANGAN MARKA ISOZIM

Keunggulan marka isozim antara lain penggunaannya cukup luas, teknik pelaksanaan lebih mudah dan murah dibanding RAPD, RFLP, AFLP, mudah didapat dan bersifat netral. Marka ini bersifat kodominan, sehingga dapat membedakan individu heterozigot dan homozigot, dapat memperlihatkan alel gen resesif. Gen resesif sering menjadi penentu karakter spesifik yang bermanfaat, yang pada marka yang lain tertutup oleh gen dominan. Beberapa penggunaan marka isozim yang sudah berhasil dilakukan adalah Isozim 6 PGD (fosfoglukonat dehidrogenase) dan AAT (aspartat amino

transferase) untuk mengidentifikasi kultivar Apel. Isozim MDH (malat dehidrogenase) untuk mengidentifikasi Cherry, isozim PGDc (fosfoglukonat dehidrogenase) melihat keterkaitan sifat morfologi dan lokus isozim yang mengontrol pertumbuhan, isozim GPT2 (glukosa 1 fosfat transferase) terkait dengan warna bunga, warna epikotil, warna kulit biji dan permukaan biji (Weeden dan Lamb, 1985). Manganaris dan Alston (1987), melaporkan keterpautan marka genetik isozim di lokus GOT-1 (glutamat oxaloacetat transaminase) dengan faktor inkompatibilitas pada tanaman apel.

Kekurangan marka ini, ekspresinya dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, kondisi ini mengganggu akurasi hasil, sampel harus dalam keadaan segar, ini membatasi masa penyimpanan dan kendala jika jarak laborototium cukup jauh, jumlah staining isozim sampai saat ini hanya 40, sehingga tidak dapat dijadikan sebagai alat untuk mapping, karena tidak mencerminkan jumlah gen.

III. METODE

A. Penyediaan bahan dan alat

Bahan yang diperlukan : organ tanaman (biasanya : daun), bahan kimia untuk pembuatan buffer ekstraksi, buffer gel, buffer elektroda (beberapa metoda dapat dipakai : Metode Soltis, metode Horry atau metode Gadrinab), gel pati kentang atau poliacrilamide, substrat pewarna, aquades, alumunium foil, brom timol blue, pasir kuarsa, kertas saring, selotip, air dan lain lain.

Alat yang diperlukan antara lain: Refrigerator, cetakan gel, power supply, pompa vakum, microwave, pembelah gel, sumur gel, kamera, lampu pengamatan, stirrer, mortar, pestle, spatula dan alat pendukung lain.

B. Analisis Isozim

1. Penyediaan Organ Tanaman

Jenis organ, umur tanaman, tingkat perkembangan organ harus relatif homogen. Kondisi pertumbuhan sampel yang berhubungan dengan kesuburan tanah, pencahayaan, ketersediaan air, harus sama. Persyaratan ini berguna untuk mengeliminir pengaruh lingkungan terhadap hasil analisis isozim yang akan dilakukan.

2. Penyediaan Larutan Buffer

Larutan buffer yang disediakan adalah buffer pengestraks, digunakan untuk mengekstrak enzim organ tanaman, buffer gel, berguna untuk pencampur pati kentang dalam pembuatan gel, buffer elektroda, untuk elektroforesis.

3. Pembuatan Gel

Gel dibuat dari pati kentang yang khusus untuk elektroforesis atau menggunakan poliacrilamide.

4 Ekstraksi Enzim

Sampel digerus dalam mortar, bersama pasir kuarsa dan buffer pengestrak. Kertas saring dimasukkan kedalam mortar untuk menyerap enzim.

5. Pembuatan dan Pemuatan Sumur Gel

Bersamaan dengan ekstraksi enzim, gel dimasukkan ke refrigerator selama 30 menit, kemudian dikeluarkan dan dibuat sumuran dengan ukuran tertentu. Kertas saring yang mengandung ekstrak enzim dimasukkan ke sumur gel secara berurutan.

6. Elektroforesis

Elektroforesis dilaksanakan didalam refrigerator (suhu : 4°C), Selotip pada kaki cetakan gel dilepas, cetakan dan gel yang berisi ekstrak enzim dimasukkan ke dalam

Tray yang telah diisi larutan elektroda. **Tray** dihubungkan dengan power supply (100-150 volt) dan enzim dielektroforesis sampai indikator mobilitas elektroforesis mencapai 8 cm.

7. Pembuatan Larutan Pewarna

Larutan pewarna untuk setiap isozim bersifat spesifik. Larutan ini disiapkan 30 menit sebelum elektroforesis selesai.

8. Pembelahan Gel, Pewarnaan dan Pencucian

Setelah elektroforesis selesai, cetakan gel dikeluarkan dari tray, kertas saring dikeluarkan dari sumur gel, gel dipisahkan menjadi bagian anoda dan katoda. Potongan gel dibelah menjadi 2 lembaran atau lebih, dengan tebal 2 mm, setiap lembaran dimasukkan dalam nampan plastik. Larutan pewarna dimasukkan ke nampan sampai gel terendam, nampan dimasukkan dalam ruang gelap selama 2 jam sampai pita isozim kelihatan jelas. Kemudian gel dicuci dengan air mengalir.

9. Pengamatan dan Pembuatan Zimogram

Pola pita pada gel diamati dengan bantuan lampu pengamatan dan digambarkan diatas kertas grafik. Zimogram digambar diatas kertas grafik dengan skala cm atau dalam skala mobilitas relatif dari masing-masing pita.

10. Dokumentasi, Pengemasan, Penyimpanan Gel

Gel dengan pola pita yang jelas diletakkan diatas nampan plastik transparan, ditempatkan diatas lampu pengamatan, kemudian diphoto. Setelah itu gel diangkat, kemudian dibungkus dengan *plastik saran wrap*, dimasukkan kedalam nampan plastik dan disimpan dalam refrigerator pada suhu 4 - 6 °C.

IV. INTERPRETASI POLA PITA ISOZIM DAN ANALISIS DATA

A. Interpretasi Pola Pita Isozim

Pola pita setiap enzim terbagi ke dalam zona-zona aktivitas yang diinterpretasikan sebagai suatu lokus, perbedaan bentuk pita akibat perbedaan mobilitas elektroforesisnya diinterpretasikan sebagai alel yang bersangkutan.

Suatu lokus dapat polimorfis (memiliki lebih dari 1 bentuk pita yang tercermin dari bentuk-bentuk pita yang berbeda mobilitas elektroforesisnya), atau monomorfis (hanya 1 bentuk pita untuk seluruh individu yang dianalisis).

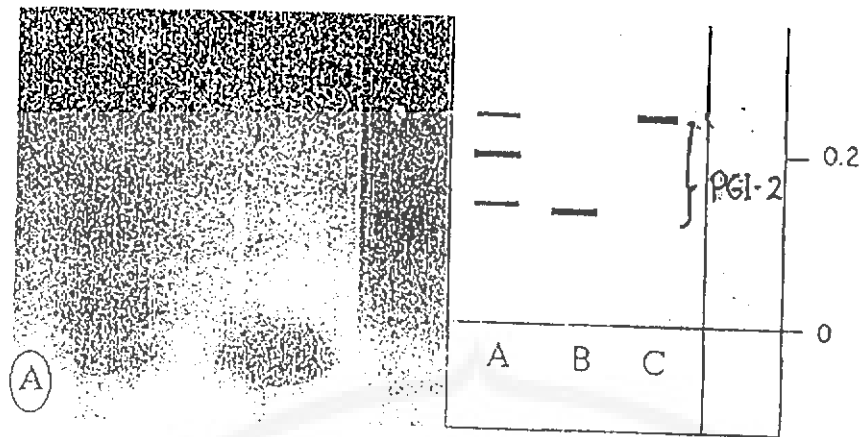
Berdasarkan struktur molekul proteinnya, lokus polimorfis dapat bersifat monomerik (individu heterozigot yang memiliki 2 pita), dimerik (individu heterozigot yang memiliki 3 pita, pita yang ditengah merupakan pita hasil interaksi antara 2 alel lainnya) dan polimerik (memiliki struktur yang kompleks).

Untuk analisis keragaman genetik beberapa populasi, penentuan lokus dan alel dilakukan secara bersamaan menurut setiap isozim. Pola pita setiap isozim dari seluruh populasi yang diteliti dijejerkan dari kiri ke kanan dengan posisi absis yang sama. Kemudian dilakukan penentuan lokus dan alel.

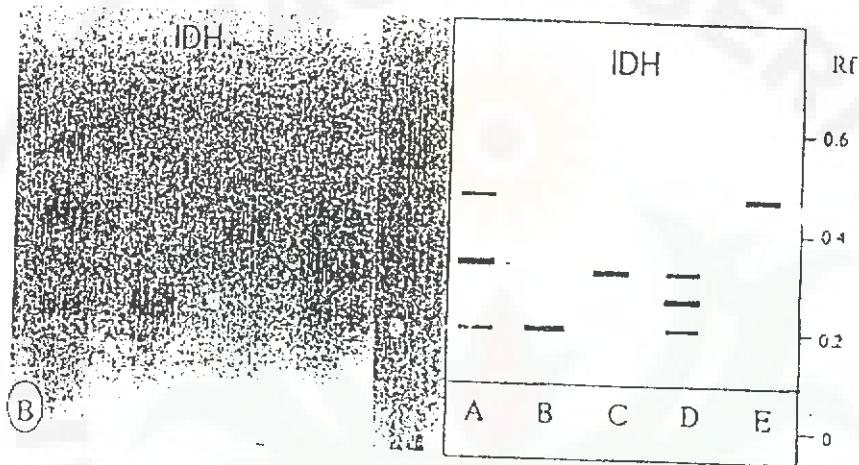
B. Analisis Data Isozim

Untuk menganalisis data hasil penggunaan marka isozim berikut diberikan contoh kasus analisis keragaman genetik 58 kultivar mangga berdasar 3 jenis sistem isozim yaitu PGI-2 (Pospo glukosa isomerase), IDH (isositrat dehidrogenase), ADH (alkohol dehidrogenase) (data mentah diperoleh dari Eiadthong et al, 1998. Isozyme polymorphism of mango cultivars in Thailand. Thai. J. Agri. Sci. 31: 555-568).

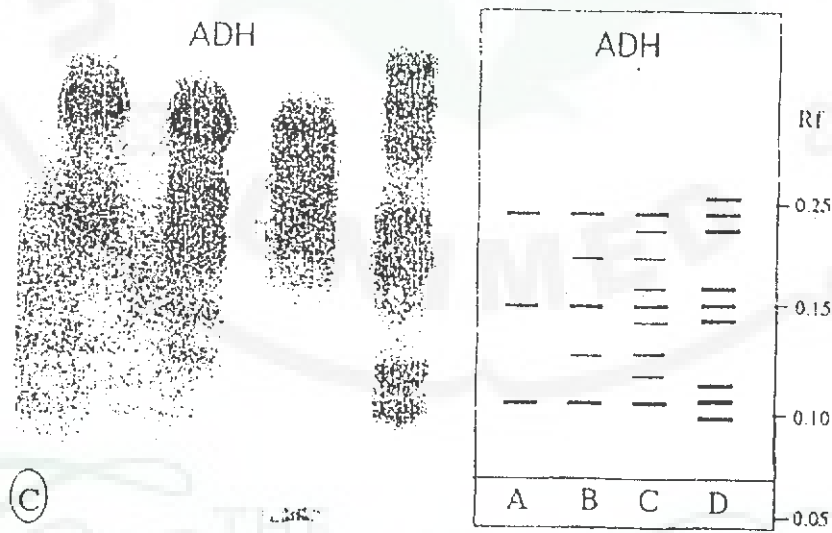
Data dari pola isozim sistem PGI-2 menghasilkan 3 macam pola pita yaitu: A, B, C (gambar 1). Pola isozim IDH menghasilkan 5 pola pita : A, B, C, D, E (gambar 2), isoenzim ADH menghasilkan 4 pola pita : A, B, C, D (gambar 3). Masing-masing



Gambar 1. Isoenzim (isozim) banding pattern untuk sistim PGI-2 yang dijadikan referensi untuk tabel 1.



Gambar 2. Isoenzim (isozim) banding pattern untuk sistim IDH yang dijadikan referensi untuk tabel 1.



Gambar 3. Isoenzim (isozim) banding pattern untuk sistim ADH yang dijadikan referensi untuk tabel 1.

kultivar mempunyai phenotip isozim yang berbeda-beda untuk ke 3 sistim enzim yang digunakan (tabel 1). Pola pita tersebut kemudian diterjemahkan kedalam data biner (1 = ada pita , 0 = tidak ada pita). Total data biner ke 3 jenis sistem isozim tersebut sebanyak 20 jenis, masing-masing 3 untuk PGI, 5 untuk IDH, 12 untuk ADH (tabel 2)

Data biner kemudian digunakan sebagai input dalam analisis kluster dengan UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) dengan Program NTSys (Numerical taxonomy and Multivariate System) atau Biosys (Biological system) dan Popgen 1 (Population Genetic-1), dengan bantuan program Windist.

Dalam tulisan ini penulis menggunakan program NTSys, dihasilkan dendogram (gambar 4) dengan pembahasan sebagai berikut: Berdasarkan persentase kesamaan genetik 66 %, 78 % dan 89 % berturut-turut menghasilkan : 3, 5, 8 group , dengan persentase 55 % membentuk 1 group, sedangkan persentase kemiripan 100 % membentuk 21 group. Pemotongan dendogram berdasarkan kriteria persentase kemiripan 95 % telah mereduksi 58 kultivar menjadi 14 group kultivar, dari 14 group tersebut, 8 group mempunyai anggota masing-masing 1 kultivar, 2 group dengan anggota 2 kultivar, 1 group dengan 3 kultivar dan sisanya mempunyai anggota lebih dari 4.

Selain NTSys, dengan menggunakan program lain diatas akan lebih banyak diperoleh informasi genetik seperti: Frekwensi alel, rata-rata jumlah alel per lokus, rata-rata jumlah alel efektif, % polimorfik, rata-rata heterozigositas, indeks fiksasi dan keseimbangan Hardy- Weinberg, jarak genetik dan dendogram.

Tabel 1: Fenotip isozim untuk 3 sistem isozim pada 58 kultivar mangga, fenotip isozim ini berhubungan pola isozim pada gambar 1, 2, 3.

Cultivar or accession	PGI-2 ^(a)	IDH	ADH	Cultivar or accession	PGI-2 ^(a)	IDH	ADI
Malila	A	B	A	Adams	A	D	A
Manwaan	C	B	A	Alphonso	C	B	A
Nam Dok Mai	C	D	A	Bangalnapalli	C	D	A
Nang Klangwan	C	D	A	Brooks	A	B	A
Nang Mon	C	D	A	Carabao	C	E	A
Neelum	C	D	A	Chao Khoonthip	C	D	A
Nga	C	D	A	Davis Haden	B	B	B
Nong Saeng	C	B	A	Duncan	C	C	A
Ok-Rong	C	D	A	Edward	A	C	A
On Zon ^(d)	C	D	A	Falan	A	D	A
Palmer	A	B	A	Haden	A	A	A
Pimsen Man	A	B	A	Harumanis (or Arumanis)	C	C	A
Pimsen Man Lukdam	C	D	A	Hong Saowadee	C	C	A
Pimsen Daeng	C	C	A	Irwin	A	B	A
Pope	B	B	A	Kaem Daeng	C	C	A
Praam	A	D	A	Kalon Khieo ^(c)	C	A	D
Raed	A	C	A	Kalon Thong ^(c)	C	A	D
Sampee	A	D	A	Kaew Khieo	A	B	A
Talubnak	B	C	A	Kaew	A	D	A
Tawai	A	B	A	Kent	A	B	A
Tehangir	A	D	A	Khaen-On	A	D	A
Thai-1 ^(d)	C	B	A	Khieo Sawoey	A	B	A
Thai-2 ^(d)	C	D	A	Lippens	B	D	C
Thai-3 ^(d)	C	B	A				
Thai-4 ^(d)	C	D	A				
Thai-5 ^(d)	C	B	A				
Thai-6 ^(d)	C	B	A				
Thai-7 ^(d)	C	B	A				
Thong Dam	C	D	A				
Thong Dam Kangmu	A	D	A				
Thong Pai Khaen	A	D	A				
Thurian	A	B	A				
Tommy Atkins	A	B	A				
Tooltawaai	A	D	A				
Zill	C	A	A				

Tabel 2: Data bimer 58 kultivar mangga berdasarkan 3 sistem isozim : PGI - 2, IDH, ADH

No	Kultivar	PGI			IDH					ADH													
		1	2	3	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	K01	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0		
2	K02	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
3	K03	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
4	K04	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
5	K05	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
6	K06	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
7	K07	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
8	K08	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
9	K09	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
10	K10	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
11	K11	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
12	K12	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
13	K13	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
14	K14	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
15	K15	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
16	K16	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	
17	K17	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	
18	K18	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
19	K19	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
20	K20	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
21	K21	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
22	K22	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
23	K23	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	
24	K24	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
25	K25	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
26	K26	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
27	K27	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
28	K28	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
29	K29	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
30	K30	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
31	K31	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
32	K32	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
33	K33	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
34	K34	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
35	K35	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
36	K36	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
37	K37	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
38	K38	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
39	K39	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
40	K40	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
41	K41	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
42	K42	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
43	K43	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
44	K44	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
45	K45	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
46	K46	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
47	K47	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
48	K48	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
49	K49	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
50	K50	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
51	K51	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
52	K52	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
53	K53	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
54	K54	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
55	K55	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
56	K56	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
57	K57	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
58	K58	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	

Catatan: Data bimer diregenerasi dari pola isoenzim menggunakan program SAS (Lihat Lampiran 1).

V. PENUTUP

Marka iusozim dengan segala keterbatasannya, masih mempunyai peran penting dalam perkembangan pemuliaan tanaman khususnya dalam menganalisis diversitas (keragaman) genetik tanaman, walaupun marka DNA yang lebih maju sudah ditemukan.

Prinsip dasar dalam penggunaan marka isozim sangat membantu dalam membekali pemakaian marka molekuler lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, W.T., 1983. Application of isozymes in tree breeding. In S.B. Tanksley and T.J. Orton (eds) : *Isozymes in plant genetics and breeding, part A*. Elsevier, New York, P. 381-400.
- Balagtas, A.E. and D.A. Ramirez, 1981. Genetic Variation in Philippine collections of mungbean (*Vigna-radiata* (L.) Wilczek), ricebean (*Vigna-umbellata* (L.) Thumb and Ohwi)and cowpea (*Vigna - unguiculata* (L.)Walp.) *The Philippine Agriculturest* 74 (1) : 103-119.
- Hamrick, T.L. 1989. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant population. In D.E Soltis and P.S.Soltis (Eds): *Isozymes in plant biology*. Diacorides Press, Portland, Orewgon.
- Kahler, A.L. and C.F. Wehrhahn, 1986. Association between quantitative trait and enzyme loci in the F2 population of a maize hybrid. *Theor. Appl.Genet.*74 : 154-161
- Makmur, A. 1988. Masalah Pemuliaan Tanaman Pada Lada, Cengkeh, Kelapa dan Kapas , hal; 57-58, *Prosiding Lokakarya Pemuliaan Tanaman Cengkeh, Lada, Kapas dan Kelapa*, Puslitbangtri, Bogor.
- Manganaris, A.G. dan F.H.Alston. 1987. Inheritance and linkage relationship of glutamate oxaloacetate transaminase isozymes in apple. *Theor. Appl Genet.* 74 : 154-161.
- Stebbins, G.L. 1989. Introduction. *Isozymes in plant biology*. Diacorides Press. Portland, Oregon,p. 1-4.
- Weeden, N.F. and R.C.Lamb, 1985. Identification of apple cultivars by isozymes phenotypes. *J. Amer. Soc.Sci.* 110 (4) : 509-515.