

Review: Aplikasi DNA barcoding untuk analisis keragaman genetik lai-durian (*Durio zibethinus x kutejensis*) asal Kalimantan Timur

DNA barcoding application to analyze the genetic diversity of lai-durian (*Durio zibethinus x kutejensis*) from East Kalimantan

WIDI SUNARYO

Fakultas Pertanian, Universitas Mulawarman. Kampus Gunung Kelua, Jl. Pasir Balengkong, No. 1, Samarinda 75123, Kalimantan Timur. Tel.: +62-541-749343, email: w_sunaryo@outlook.com, w_sunaryo@faperta.unmul.ac.id

Manuskrip diterima: 6 Mei 2015. Revisi disetujui: 6 Juli 2015.

Abstrak. Sunaryo W. 2015. Aplikasi DNA barcoding untuk analisis keragaman genetik lai-durian (*Durio zibethinus x kutejensis*) asal Kalimantan Timur. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1273-1277*. Keragaman buah-buahan lokal di Indonesia merupakan modal dasar untuk meningkatkan daya saing menghadapi membanjirnya buah-buahan import. Lai-durian (*Durio zibethinus x kutejensis*) yang awalnya merupakan hasil silangan alami antara buah durian (*Durio zibethinus*) dan lai (*Durio kutejensis*) adalah buah khas Kalimantan Timur yang mempunyai sifat-sifat unggul dalam hal rasa dan performa buah, sehingga sering memenangkan kontes durian bahkan beberapa varietas sudah di lepas sebagai varietas unggul Nasional. Eksplorasi dan identifikasi keragaman genetik dari buah ini berdasarkan analisis morfologi tanaman telah dikaji oleh penulis. Penggunaan marka molekuler seperti DNA barcoding mempunyai prospek yang sangat cerah untuk menelusuri keragaman genetik diantara tanaman lai-durian itu sendiri ataupun dengan induk asalnya yaitu tanaman durian dan lai. Teknologi baru identifikasi tanaman melalui DNA barcoding dapat dilakukan dengan cepat, akurat, dan tidak ambigu (bias) karena memerlukan jumlah sampel yang sedikit dan mampu mengungkapkan variasi baru/keragaman baru pada species-species yang sebelumnya belum diungkapkan. Selain itu DNA barcoding dapat dilakukan oleh orang yang bukan ahli taksonomi sekalipun, dengan keakuratan yang sama, karena DNA barcoding bersifat *reproducible*, sehingga ketergantungan akan ahli taksonomi dapat dikurangi. Sementara itu identifikasi species/varietas berdasarkan pada penanda/ciri-ciri morfologi (kunci-kunci taksonomi) yang dilakukan oleh ahli taksonomi mempunyai kelemahan yaitu hanya bisa diterapkan untuk tanaman dewasa, memerlukan waktu lama karena pengambilan sampel/pengamatan harus menunggu masa tertentu seperti masa berbunga atau berbuah misalnya. Selain itu pengamatan morfologi membutuhkan seorang pakar taksonomi yang sampai saat ini jumlahnya sangat terbatas. Oleh karena itu disini akan diuraikan prospek aplikasi penggunaan teknologi DNA barcoding untuk analisis keragaman genetik tanaman lai-durian asal Kalimantan Timur.

Kata kunci: DNA barcoding, keragaman genetik, Kalimantan Timur, lai-durian, varietas lokal

Abstract. Sunaryo W. 2015. DNA barcoding application to analyze the genetic diversity of lai-durian (*Durio zibethinus x kutejensis*) from East Kalimantan. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1273-1277*. Indonesian local fruit diversity is the important basic factor to increase the competitiveness of the Indonesian fruit against the imported fruit. Lai-durian (*Durio zibethinus x kutejensis*), the result of a natural crossing between durian (*Durio zibethinus*) and lai (*Durio kutejensis*), is an endemic fruit in East Kalimantan having a superior fruit performance and specific taste, therefore lai-durian often win a price in Durian Contest. Even, some of lai-durian varieties have been released as a National superior variety. The exploration and identification of lai-durian genetic diversity have been studied based on morphological characters. The application of molecular marker such as DNA barcoding has a good prospect to analyze the genetic diversity of lai-durian and/ or compared to the parents (*Durio zibethinus* and *Durio kutejensis*). A new technology in plant identification of DNA barcoding could be performed quickly and accurately because this technique needs a small sample and could discriminate new variation on the undescribed species. In addition, DNA barcoding could be carried out even by a non-taxonomist expert, with the same accuracy, because it is a high reproducible technique. On the other hand, the identification of species or varieties based on morphological characters (Taxonomy keys) performed by taxonomist is usually applied in mature/adult plant, therefore it needs longer time because of more time to wait until the plant blooming or fruiting. In addition, the morphological character observation requires a taxonomist experts that are recently very limited. Therefore, here we describe the future prospect of DNA barcoding application to analyze the genetic diversity of lai-durian from East Kalimantan..

Keywords: DNA barcoding, East Kalimantan, genetic diversity, lai-durian, local variety

PENDAHULUAN

Indonesia adalah salah satu negara yang mempunyai hutan hujan tropis terbesar di dunia setelah Brazilia,

dengan keragaman hayati yang sangat tinggi baik untuk keragaman tanaman, hewan, dan biota yang lainnya. Kekayaan keragaman hayati akan menjadi sangat menguntungkan apabila keragaman tersebut mampu di

eksplorasi, dimanfaatkan, dan dipertahankan melalui konservasi yang berkesinambungan. Kekayaan keragaman hayati merupakan modal yang sangat besar untuk dimanfaatkan dalam rangka pemenuhan kebutuhan pangan, pemenuhan kebutuhan energi, terutama energi terbarukan. Selain itu keragaman hayati juga merupakan modal dasar untuk merakit varietas/kultivar unggul. Salah satu keragaman hayati yang berpotensi untuk di eksplorasi dan dikembangkan adalah keragaman tanaman buah-buahan tropis seperti durian.

Kalimantan Timur adalah salah satu propinsi di Indonesia yang merupakan daerah asal dan endemik dari buah lai-durian. Masyarakat Kalimantan timur memberi nama yang berbeda terhadap lai-durian. Banyak yang menganggap lai-durian di golongan sebagai tanaman lai namun berasa durian karena lebih manis dan lezat. Di Kutai Barat lai-durian di namakan *holai* atau *lai sentawar*. Di Kutai Kartanegara di namakan *lai mandong* sementara itu di Bulungan di beri nama *lai kayan*. Di daerah Batuah di namakan *lai mading batuah*. Sementara itu di tempat-tempat lain disebut sebagai durian-lai.

Klasifikasi dan identitas tanaman lai-durian selama ini masih belum jelas, kadang-kadang masyarakat menggolongkan sebagai durian (dinamakan *Durian Lai*) dan di tempat lain di golongan sebagai lai (*Lai Durian*). Bahkan ada sebagian ahli tanaman menggolongkan dalam species *Durio excelcus* (*Komunikasi Pribadi*). Dalam sebuah laporan disebutkan bahwa *Durio excelcus* adalah golongan durian *inedible fruits* dengan karakteristik yang sangat berbeda dengan lai-durian (Year of Durian 2013). Kesalahpahaman masyarakat akan penamaan maupun penggolongan tersebut disebabkan oleh belum adanya penelitian yang menyeluruh tentang tanaman tersebut.

Tanaman lai-durian tumbuh dengan baik di hampir semua kabupaten dan kota di Kalimantan Timur. Berdasarkan Sunaryo et al. (2015) lai-durian merupakan hasil persilangan alami (*natural outcrossing*) antara durian (*Durio zibethinus*) dan lai (*Durio kutejensis*). Buah lai-durian tidak seperti buah durian ataupun lai pada umumnya. Buah ini memiliki cita rasa yang khas, enak, manis, tekstur lembut dan kering, kadar alkohol rendah dan tidak mempunyai aroma yang menyengat, seperti halnya durian. Beberapa varietas tanaman buah lai-durian asal Kalimantan Timur telah dilepas sebagai varietas unggul nasional yaitu *lai kayan*, *lai mandong*, dan *lai sentawar*.

Eksplorasi keragaman tanaman lai-durian asal Kalimantan Timur telah dilakukan oleh Sunaryo et al. (2015). Dari informasi lengkap tentang keberadaan/lokasi, karakter dan keunggulannya juga lai-durian mempunyai potensi besar untuk di daftarkan sebagai varietas unggul nasional.

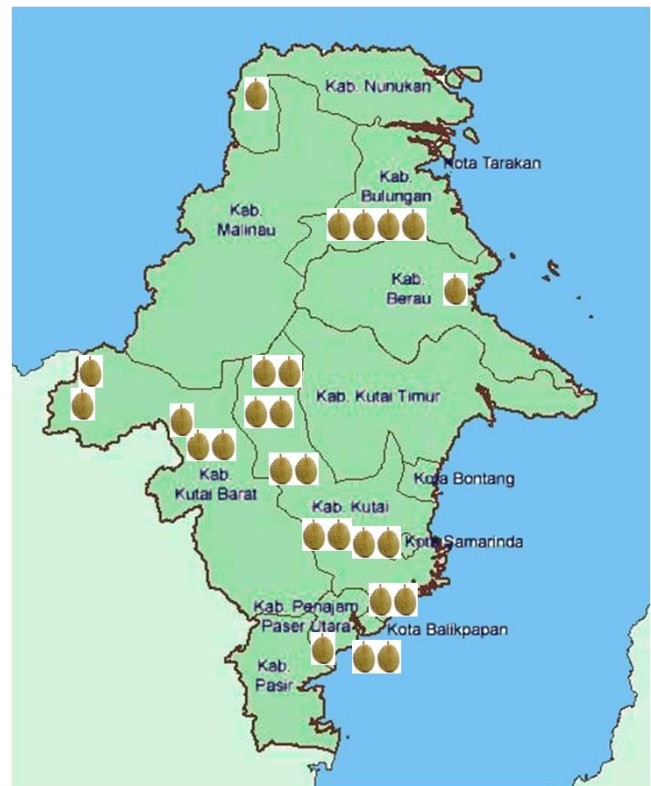
Identifikasi tanaman selama ini dilakukan dengan marka/penanda/ciri-ciri morfologi (kunci-kunci taksonomi) oleh ahli taksonomi. Pengamatan dilakukan terhadap seluruh bagian tanaman seperti daun, batang, akar, bunga, biji dan lain lain. Hasil pengamatan ini kemudian di bandingkan dengan koleksi spesimen tanaman (database) berdasar kunci-kunci taksonomi dari museum tanaman/herbarium. Salah satu kelemahan sistem ini adalah identifikasi hanya bisa diterapkan untuk tanaman dewasa,

memerlukan waktu lama karena pengambilan sampel/pengamatan harus menunggu masa berbunga/berbuah misalnya. Selain itu pengamatan morfologi membutuhkan seorang pakar taksonomi yang sampai saat ini jumlahnya sangat terbatas (Virgilio et al. 2012).

Diagnosis pada skala molekuler melalui DNA barcoding memberikan alternatif identifikasi tanaman yang cepat, akurat, dan tidak ambigu (bias) (Virgilio et al. 2012). Identifikasi tanaman dengan DNA barcoding memerlukan jumlah sampel yang sedikit dan pada prinsipnya DNA dapat diambil dari bagian tanaman apa saja. Oleh karena itu, penggunaan Teknologi DNA barcoding untuk analisis keragaman genetik tanaman lai-durian di Kalimantan Timur perlu dikaji untuk membuktikan efektifitas dan efisiensi teknologi ini.

KERAGAMAN LAI DURIAN DI KALIMANTAN TIMUR

Hasil eksplorasi yang dilakukan pada tahun 2014 jumlah sampel/tanaman lai-durian yang didapatkan dari propinsi Kalimantan Timur adalah 26 tanaman yang tersebar di 9 kabupaten dan kota di Kalimantan Timur. Tanaman lai-durian tidak dijumpai di Kabupaten Pasir, Malinau, dan Kutai Timur. Peta penyebaran letak tanaman lai-durian yang didapatkan dapat di lihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Peta penyebaran lokasi tanaman lai-durian (*Durio zibethinus x kutejensis*) di Propinsi Kalimantan Timur

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lokasi tanaman lai-durian adalah selalu berada di daerah-daerah yang merupakan sentra/pusat keberadaan tanaman durian dan lai secara bersama. Di suatu daerah yang endemik tanaman durian saja, seperti di daerah kecamatan Sebatik (Nunukan), ataupun di Bayur, Samarinda maka tidak dijumpai tanaman lai-durian. Kutai Kertanegara merupakan pusat tanaman lai di Kalimantan Timur yang tersebar luas di hampir seluruh kecamatan. Disamping itu secara bersama-sama juga merupakan daerah penanaman durian, sehingga dalam penelitian ini juga di dapatkan tanaman lai-durian paling beragam dan banyak jumlahnya (Gambar 1). Pusat penanaman lai maupun durian di Kutai Kertanegara adalah Loa Janan, Samboja, Muara Jawa, dan Rapak Lambur. Pusat/sentra lai ataupun durian juga di jumpai disepanjang daerah aliran sungai Kayan di Kabupaten Bulungan dan daerah Bigung, Linggang Bigung, Melak, dan Long Iram di Kutai Barat. Oleh karena itu tidak mengherankan jika nama latin tanaman lai adalah *Durio kutejensis* karena asal tanaman ini adalah dari daerah Kutai (Backer and van den Brink, 1965). Tanaman lai-durian juga dijumpai di daerah Nunukan, Berau, Samarinda, Balikpapan dan Penajam Pasir Utara (PPU), namun intensitasnya tidak sebanyak dan beragam seperti di Kabupaten Kutai (Kutai Kertanegara ataupun Kutai Barat). Sementara itu, walaupun wilayah Kutai Timur sangat luas, namun akibat adanya peralihan fungsi lahan, menjadi perkebunan (kelapa sawit, karet, kakao) maupun tambang (batu bara) maka jarang dijumpai sentra pertanaman durian ataupun lai dalam skala luas. Sehingga tidak didapatkan tanaman lai-durian selama masa ekplorasi.

DNA BARCODING UNTUK ANALISIS KERAGAMAN GENETIK

DNA barcoding di usulkan pertama kali oleh Hebert et al. (2003), yang menyatakan bahwa semua spesies organisme dapat diidentifikasi dengan menggunakan sekuen pendek dari sebuah gen yang posisinya di dalam genom telah terstandarisasi (disepakati bersama) yang disebut sebagai “DNA Barcode”.

Beberapa keunggulan DNA barcoding menurut Virgilio et al. (2012) adalah (i) memerlukan spesimen/yang sangat sedikit/kecil (ii) mampu mendokumentasikan keragaman group-group taksonomi yang belum di kenal atau group-group taksonomi yang berasal dari daerah yang belum pernah teridentifikasi, (iii) mampu mengungkapkan variasi baru/keragaman baru pada species-species yang sebelumnya digolongkan pada satu species saja. Menurut Bhalke dan Schmidt (2012) DNA barcoding dapat digunakan untuk dua tujuan, yaitu sebagai perangkat baru untuk membantu para ahli taksonomi yang biasa bekerja keras pada spesimen-spesimen yang sulit diidentifikasi and merupakan perangkat inovatif bagi yang bukan ahli taksonomi dan untuk mengidentifikasi tanaman secara cepat. Sehingga identifikasi tanaman dengan menggunakan DNA barcoding bisa dilakukan oleh siapa saja (yang bukan ahli taksonomi) asal memiliki pengetahuan dan ketrampilan teknis tentang DNA barcoding. Hal ini menjawab

permasalahan minimnya ahli taksonomi yang tersedia dan masih sangat banyaknya keragaman tanaman indonesia yang belum teridentifikasi. Sementara itu secara umum Kress et al. (2009) menyatakan bahwa kegunaan DNA barcoding adalah sebagai (i) perangkat riset bagi ahli taksonomi untuk (a) membantu mengidentifikasi spesies, (b) memperluas pendugaan/diagnose spesies ke arah semua tahapan sejarah perkembangan kehidupan organisme hidup, termasuk buah-buahan, biji-bijian, penentuan kelamin, specimen-spesimen yang rusak dan lain-lain, (c) menguji konsistensi definisi spesies dengan acuan variabilitas DNA, (ii) perangkat bagi pengguna taksonomi untuk (a) mengidentifikasi spesies-spesies yang dilindungi/dikendalikan, termasuk spesies infasive, (b) menguji kemurnian dan identitas produk-produk biologi, (c) membantu para ahli ekologi dalam studi lapang terhadap organisme yang masih belum diketahui identitasnya, (iii) perangkat penemuan terutama menandai spesies-spesies baru yang belum terdeskripsi dengan baik.

Pada tanaman, analisa DNA barcoding dilakukan dengan mengisolasi dan mengamplifikasi gen-gen genom kloroplas yaitu gen *rbcL*, *matK* ataupun *trnH-psbA* (Kress et al. 2005; Kress and Erickson, 2007; CBOL Plant Working Group, 2009). Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan dengan menggunakan sepasang primer dari gen-gen tersebut diatas. Produk dari amplifikasi biasanya berukuran pendek sekitar 600-800 base pair (bp). Dengan mengamati susunan/runtunan basa DNA pada ruas gen-gen diatas atau „DNA barcode“, perbedaan antar species ditentukan. Semakin banyak jumlah perbedaan runtunan basa DNA dua organisme, maka jarak kekerabatan/hubungan filogenetik mereka semakin jauh. Hasil dari sequencing terhadap ruas pendek gen-gen tersebut di atas kemudian dimasukkan dalam data base yang di dalamnya meliputi seluruh tanaman yang telah terkarakterisasi runtunan basanya pada sekuen pendek gen-gen tersebut diatas, disertai dengan informasi taksonomi tanaman yang bersangkutan. Sehingga keberadaan species/varietas sampel kita bisa dibandingkan dengan tanaman-tanaman yang telah terkarakterisasi sebelumnya.

PRINSIP-PRINSIP DNA BARCODING

DNA barcoding terutama untuk tanaman merupakan teknologi analisis keragaman/identifikasi spesies yang pelaksanaannya sangat sederhana meliputi berbagai tahapan kegiatan sebagai berikut:

Pengambilan sampel dan preservasinya. Tujuan dari tahapan ini adalah untuk mendapatkan sampel yang baik dan terfiksasi agar dalam proses ekstraksi mendapatkan DNA berkualitas baik. Sampel berupa daun segar/bagian tanaman yang lain diambil dari bagian tanaman yang sehat. Setelah daun di petik dari tanaman, kemudian langsung diisolasi DNAnyanya atau dipreservasi terlebih dahulu. Preservasi dilakukan apabila sampel tida langsung diisolasi DNAnyanya. Sementara itu berbagai metode untuk preservasi diantaranya dikeringkan dengan silika gel, atau difiksasi dengan alkohol/CTAB.

Ekstraksi DNA dari sampel. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mengisolasi DNA genom tanaman (terutama dari genom Kloroplas). Prosedur ekstraksi DNA dilakukan menurut manual pada *Produk Isolasi DNA kit* atau disolasi dengan metode konvensional. Berbagai macam metode isolasi DNA tanaman telah dipublish. DNA kemudian diuji kualitasnya dengan merunning di gel agarose dan spectrophotometer untuk melihat konsentrasi dan kemurniannya (kontaminasinya).

Amplifikasi DNA Barcode dengan menggunakan PCR (Polimerase Chain Reaction). Tujuan dari tahapan ini adalah untuk menggandakan/multiplikasi DNA pada lokasi-lokasi khusus yang dikehendaki dengan panjang fragmen sesuai dengan *primer* spesifik yang digunakan. DNA hasil ekstraksi di amplifikasi dengan PCR dengan menggunakan pasangan primer spesifik dari gen-gen *rbcL*, *matK* ataupun *trnH-psbA* seperti yang dilaporkan Kress et al. (2005). Efektifitas primer dari masing-masing gen akan dibandingkan dan di uji.

Purifikasi hasil amplifikasi dengan PCR. Tujuan dari purifikasi adalah untuk membersihkan DNA hasil amplifikasi terhadap kontaminan yang lain seperti protein, RNA dan sisa debris sel tanaman yang belum bersih dari pada proses ekstraksi DNA. DNA yang sudah dipurifikasi akan digunakan untuk proses sequencing.

Sequencing. Sequencing bertujuan membaca urutan basa DNA pada fragmen yang teramplifikasi. Urutan DNA ini akan menjadi DNA barcode. Sequencing akan dilakukan sendiri atau dengan dengan mengirimkannya ke perusahaan/institusi sequencing dengan tarif tertentu. Berbagai macam metode sequencing juga telah di publish. Namun dengan semakin mudahnya tarif sequencing, kebanyakan peneliti menyewakan pada perusahaan sequencing.

Analisis data hasil sequencing. Hasil sequencing akan dianalisis diantaranya dengan assembling, editing dan alignment pendahuluan dengan software *MEGA 5.05*. Sekuen juga di input ke *GeneBank* untuk melihat kemungkinan adanya kontaminasi.

Input data hasil sequencing ke database BOLD (Barcode of Life Data Systems). Data hasil sequencing yang sudah di analisis kemudian dimasukkan ke Database BOLD. Output dari proses ini adalah informasi lengkap mengenai spesies (data morfologi, taksonomi, dan pendukung) yang kita masukkan bila spesies yang kita input sudah terdapat datanya di sistem, bila belum artinya kita menemukan spesies/varietas yang baru. Selain kita bisa mengunduh pohon filogenetik yang menggambarkan kekerabatan antara spesies yang kita masukkan dengan spesies-spesies yang sudah di input dalam sistem. Sebagai perbandingan data hasil sequencing dapat dianalisis alignment, dengan ClustalW (<http://ch.embnet.org>; Thompson et al. 1994) dan pembuatan pohon filogenetik dengan software Treeview (<http://taxonomy.Zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) yang menggambarkan kekerabatan di antara sampel-sampel tanaman yang diteliti.

PROSPEK DNA BARCODING UNTUK ANALISIS KERAGAMAN GENETIK BANGSA *Durio* spp.

Aplikasi DNA barcoding pada tanaman telah banyak dilakukan oleh para peneliti diantaranya adalah pada tanaman berbunga (Kress et al. 2005), pada Famili Araliaceae (Liu et al. 2012), pada tanaman kentang liar (Spooner 2009), pada tanaman *Amomum* (Zingiberaceae) (Segersäll 2011), pada tanaman-tanaman di daerah Amazon (Gonzalez et al. 2009) dan pada tanaman tropis hutan afrika (Parmentier et al. 2013). Namun penggunaan teknologi ini pada tanaman dari bangsa (genus) *Durio* sp. belum pernah dilakukan, walau aplikasi beberapa teknik molekuler marker yang lain telah dilakukan, seperti marka RFLP yang diaplikasikan pada 10 varietas durian (Santosa et al. 2005) dan marka RAPD pada varietas durian sukun (Ruwaida et al. 2009).

Identifikasi tanaman secara morfologi/taksonomi sulit dilakukan khususnya untuk tanaman tropis seperti halnya lai-durian. Individu-individu dari spesies yang sama dapat bervariasi secara morfologi menurut umur dan kondisi pertumbuhannya, sehingga tanaman yang berkerabat dekat mungkin sekali secara morfologi tidak berbeda. Oleh karena itu pengembangan metode identifikasi tanaman dengan menggunakan DNA barcoding menjadi sangat penting. Penggunaan DNA barcoding ini diharapkan dapat membantu menemukan identitas tanaman, menemukan species/varietas baru, memperkecil kesalahan dalam menelusuri pohon induk tunggal, duplikat, ataupun bibit komersial tersertifikasi tanaman buah lai-durian yang akan dan telah di daftarkan sebagai buah unggul Nasional. Selain itu DNA barcoding juga diharapkan dapat mengidentifikasi kesamaan dan perbedaan species/varietas lai-durian dari daerah/kabupaten/kota di Kalimantan Timur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada proyek penelitian Insentif Ristek Sinas tahun 2014-2015, Kemenristek-dikti yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Backer A, van den Brink B. 1965. Flora of Java I, Wolters Noordhoff N.V. Groningen. Netherlands, 143.
- Balke M, Schmidt S. 2012. Indonesian-German Network for Teaching, Training and Research Collaborations (IGN-TTRC) Training of Trainers and Students Module II: DNA barcoding course material. Zoologische Staatssammlung Munich, Germany.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. PNAS 106 (31): 12794-12797.
- Gonzalez MA, Baraloto C, Engel J, et al. 2009. Identification of amazonian trees with DNA barcodes. PLoS One 4 Doi:10.1371/0007483.
- Kress WJ, Erickson DL. 2007. A two-locus global DNA Barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements with the no-coding *trnH-psbA* spacer region. PLoS One 2(6). Doi:10.1371/0000508.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA et al. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. PNAS 102 (23): 8369-8374.

- Liu Z, Zeng X, Yang D et al. 2012. Applying DNA barcodes for identification of plant species in the family Araliaceae. *Gene* 499: 76-80.
- Parmentier I, Duminil J, Kuzmina M et al. 2013. How effective are DNA barcodes in the Identification of African rainforest trees? *Plos One* 8(4). Doi: e54921.
- Ruwaida IP, Supriyadi, and Parjanto. 2009. Variability analysis of Sukun durian plant (*Durio zibethinus*) based on RAPD marker. *Bioscience* 1 (2): 84-91.
- Santoso PJ. 2005. Phylogenetic relationships amongst 10 *Durio* species based on PCR-RFLP analysis of two chloroplast genes. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 6 (1): 20-27.
- Segersäll M. 2011. DNA barcoding of commercialized plants; an examination of Amomum (*Zingiberaceae*) (Dissertation). Uppsala University, Swedia.
- Sunaryo W, Hendra M, Rudarmono et al. 2015. Exploration and identification of Lai Durian, new highly potential cultivar derived from natural crossing between *Durio zibethinus* and *Durio kutejensis* in East Kalimantan. *Asian J Microbiol Biotech Env Sci* 17 (2): 1-7
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Virgilio M, Jordaens K, Breman F, et al. 2012. Turning DNA barcodes into an alternative tool for identification: African fruit flies as a model (Poster). Consortium for the Barcode of Life (CBOL).
- Year of Durian. 2013. Inedible durian. <http://www.yearofthedurian.com/2013/05/the-non-edible-durians.html#.VzoKcxuqqkq>. (4 Juli, 2015).