

**TEKNIK PENGHITUNGAN KOEFISIEN REKOMBINASI
DENGAN CONTOH KASUS LOKUS MDH, ESTERASE DAN
WARNA HIPOKOTIL PADA *Setaria italica*¹⁾**

(Computation Technique to Estimate Recombination Value,
With an Example Loci of MDH, Esterase and Hypocotyl Colour
of *Setaria italica*)¹⁾

Muhammad Jusuf²⁾

PAU Bioteknologi IPB, dan Lab Genetika

ABSTRACT

Coefficient of recombination between two loci can be estimated from its maximum likelihood function. Newton approximation method that was combined with computer programation can be used on that estimation.

Application of this method to data of *Setaria italica* F2 population, showed recombination coefficient between Est-3 and MDH-I loci is $33.25 \pm 2.92\%$ and between hypocotyl color and EST-2 loci is $10.21 \pm 3.25\%$.

PENDAHULUAN

Cara penghitungan koefisien rekombinasi antara dua lokus yang paling sederhana dapat dilakukan berdasarkan data segregasi silang uji (test cross), sedangkan untuk analisis rekombinasi dari data F2 diperlukan suatu metode yang lebih rumit. Tetapi kebalikannya bila dilihat dari segi teknis di lapang, terutama dalam percobaan dengan tanaman, ternyata tidak mudah memperoleh data silang uji atau silang balik, kecuali untuk tumbuhan alogami. Pada tanaman menyerbuk sendiri untuk melakukan perkawinan buatan diperlukan proses kastrasi, sehingga sering sekali ditemukan tingkat keberhasilan pembentukan hibrid menjadi sangat rendah. Akibat hambatan semacam ini, sulit sekali memperoleh data yang cukup untuk analisis statistik yang akurat.

Pada percobaan-percobaan yang melibatkan proses hibridisasi, misalnya dalam pemuliaan tanaman, data F2 akan mudah sekali diperoleh. Tersedianya

¹⁾Contoh numerik diambil dari thesis Doctorat 3^e cycle penulis dalam Ilmu Genetika, Universite de Paris-Sud, Orsay.

²⁾Staf Pengajar pada jurusan Biologi FMIPA-IPB, dan PAU Bioteknologi IPB, Bogor.

teknik penghitungan koefisien rekombinasi dari data F2, akan mempermudah pekerjaan para pakar genetika atau pemulia **tanaman** dalam studi pemetaan kromosom. Stevens (1939) dan Allard (1956) telah mengembangkan **metode** untuk maksud tersebut di atas. Stevens mengembangkan **metode** yang didasarkan pada nisbah hasil penggandaan fenotipe F2, sedangkan Allard menduga koefisien rekombinasi dari persamaan kemungkinan maksimumnya. **Metode** Allard mempunyai keunggulan dari **metode** lain, yaitu dapat diterapkan pada semua kasus persilangan. Pada tulisan ini akan disajikan suatu teknik perhitungan yang didasarkan pada pemikiran yang telah diletakan oleh Allard tersebut.

Allard dalam makalahnya telah menyusun **tabel** yang cukup panjang yang berisi angka-angka yang dapat dimanfaatkan oleh setiap peneliti atau pemakai dalam melakukan perhitungan. Pemakaian **tabel** tersebut pada saat ini dapat **diganti** dengan teknik iterasi berdasarkan **metode** Newton yang dibantu dengan program komputer sederhana. Pada saat ini komputer mikro telah berkembang dan menjadi **alat** yang **mudah** ditemukan di berbagai laboratorium. Para peneliti menjadi lebih mungkin untuk memanfaatkannya. Pada tulisan ini akan disajikan teknik penyusunan program komputer untuk maksud tersebut. Hal ini akan meliputi penyusunan persamaan kemungkinan maksimum, penggunaan **metode** Newton dan penulisan program komputer.

PENYUSUNAN PERSAMAAN KEMUNGKINAN MAKSIMUM

Frekuensi genotipe F2 Dihybrid

Dalam persilangan antara genotipe AABB dengan aabb, dan bila antara lokus A dan B terdapat pautan dengan koefisien rekombinasi r , maka gamet yang dihasilkan oleh F1 akan mempunyai frekuensi seperti pada **Tabel 1**. Pada **Tabel** tersebut terlihat bahwa frekuensi gamet jenis sebrangan (repulsion) dapat **diperoleh** dari frekuensi gamet jenis gandengan (coupling) melalui penggantian nilai r dengan $(1-r)$.

Tabel 1. Frekuensi garnet **F1 (AaBb)** untuk tipe persilangan jenis gandengan dan tolakan.
Table 1. **F1 garnet frequency (AaBb) of coupling and repulsion crossed type.**

No.	Garnet Garnet	Frekuensi Frequency	
		Gandengan Coupling	Sebrangan Repulsion
1.	AB	$0.5 (1-r)$	$0.5 r$
2.	Ab	$0.5 r$	$0.5 (1-r)$
3.	aB	$0.5 r$	$0.5 (1-r)$
4.	ab	$0.5 (1-r)$	$0.5 r$

Dalam pembentukan individu-individu F2 akan terjadi proses **pengembangan** gamet-gamet tersebut di atas secara acak, dan frekuensi genotipenya akan diperoleh seperti yang tercantum pada **Tabel 2** dan **Tabel 3**. Frekuensi genotipe yang tertera pada **Tabel 3** merupakan frekuensi dasar untuk semua jenis persilangan yang melibatkan dua lokus. Untuk berbagai kasus persilangan frekuensi fenotipe dapat disusun dari frekuensi genotipe tersebut di atas, dengan cara menggabungkan genotipe-genotipe yang menghasilkan fenotipe yang sama. Misal pada **Tabel 4** diperlihatkan kasus persilangan **3:1/3:1** atau kasus adanya hubungan dominan resesif antara **alel-alel** yang terdapat pada setiap lokus. Pada **Tabel 5** ditunjukkan frekuensi genotipe untuk persilangan seandainya hanya pada satu lokus terdapat hubungan dominan resesif, sedangkan pada lokus lainnya tidak terdapat hubungan tersebut. Kasus persilangan seperti yang dijelaskan itu dapat disebut sebagai kasus **1:2:1/3:1**. Bila tidak terdapat hubungan dominan resesif untuk kedua lokusnya atau kasus **1:2:1/1:2:1**, maka fenotipe yang muncul akan melambungkan frekuensi genotipe. Contoh kasus seperti ini sama dengan yang ditunjukkan pada **Tabel 3**.

Tabel 2. Proses perpaduan gamet secara acak dalam pembentukan genotipe F2 serta frekuensinya pada hibrid jenis gandengan. Untuk jenis sebrangan r diganti dengan 1-r.

Table 2. Garnet union in formation of F2 genotype and its frequency on coupling type of crossing. For the case of repulsion r must be replaced by 1-r.

Garnet	0.5 (1-r) AB	0.5 r Ab	0.5 r aB	0.5 (1-r) ab
0.5 (1-r) AB	AABB $0.25 (1-r)^2$	AABb $0.25 r (1-r)$	AaBB $0.25 r (1-r)$	AaBb $0.25 (1-r)^2$
0.5 r Ab	AABb $0.25 r (1-r)$	AAbb $0.25 r^2$	AaBb $0.25 r^2$	Aabb $0.25 r (1-r)$
0.5 r Ab	AaBB $0.25 r (1-r)$	AABb $0.25 r^2$	aaBB $0.25 r^2$	aaBb $0.25 r (1-r)$
0.5 (1-r) ab	AaBb $0.25 (1-r)^2$	Aabb $0.25 r (1-r)$	aaBb $0.25 r (1-r)$	aabb $0.25 (1-r)^2$

Suatu ciri mungkin dikendalikan oleh lebih dari satu lokus, misalnya untuk kasus yang dikendalikan dua lokus bebas dikenal perbandingan **9:7; 13:3** dan **15:1**. Untuk ciri semacam ini, bila berpasangan dengan karakter lain, untuk melihat frekuensi genotipenya harus disusun frekuensi gamet F1 nya. Kasus **9:7/3:1** diragakan pada contoh numerik bagian 4 tulisan ini.

Tabel 3. Frekuensi genotipe F2 persilangan dihibrid dengan koefisien rekombinasi r.
Table 3. F2 genotype frequency of **dihybrid** crossing with recombination coefficient r.

No.	Genotipe Genotype	Frekuensi Frequency	
		Gandengan Coupling	Sebrangan Repulsion
1.	AABB	$0.25 (1-r)^2$	$0.25 r^2$
2.	AABb	$0.50 r(1-r)$	$0.50 r(1-r)$
3.	AAbb	$0.25 r^2$	$0.25 (1-r)^2$
4.	AaBB	$0.50 r(1-r)$	$0.50 r (1-r)$
5.	AaBb	$0.50 ((1-r)^2 + r^2)$	$0.50 (r^2 + (1-r^2))$
6.	Aabb	$0.50 r(1-r)$	$0.50 r (1-r)$
7.	aaBB	$0.25 r^2$	$0.25 (1-r)^2$
8.	aaBb	$0.50 r (1-r)$	$0.50 r (1-r)$
9.	aabb	$0.25 (1-r)^2$	$0.25 r^2$

Tabel 4. Frekuensi fenotipe pada kasus persilangan 3:1/3:1 atau jika terdapat hubungan dominan resesif pada kedua lokus.

Table 4. Phenotype frequency dihybrid crossed in the case of dominance in two loci.

No.	Fenotipe Phenotype	Frekuensi Frequency	
		Gandengan Coupling	Sebrangan Repulsion
1.	A-B-	$0.25(r^2-2r+3)$	$0.25(2 + r^2)$
2.	A-bb	$0.25(2r - r^2)$	$0.25(2 - r^2)$
3.	aaB-	$0.25(2r - r^2)$	$0.25(2 - r^2)$
4.	aabb	$0.25 (1 - r)^2$	$0.25 r^2$

Tabel 5. Frekuensi fenotipe pada kasus persilangan 1:2:1/3:1, atau jika terdapat hubungan **domi-**nan resesif hanya pada satu lokus (lokus B).

Table 5. Phenotype frequency dihybrid cross in the case of dominance in one locus.

No.	Fenotipe Phenotype	Frekuensi Frequency	
		Gandengan Coupling	Sebrangan Repulsion
	AAB-	$0.25 (1 - r^2)$	$0.25(2r - r^2)$
	AABb	$0.25 r^2$	$0.25 (1 - r)^2$
	AaB-	$0.50 (1-r+r^2)$	$0.50 (1-r+?)$
	Aabb	$0.50 (r - r^2)$	$0.50 (r - r^2)$
	aab-	$0.25 r(2 - r)$	$0.25 (1 - r^2)$
	aabb	$0.25 (1 - r)^2$	$0.25 r^2$

Persamaan Kemungkinan Maksimum

Persamaan kemungkinan maksimum digunakan untuk menduga nilai koefisien rekombinasi r . Nilai r ini merupakan jawaban persamaan $f(r)=0$, yang diperoleh melalui pemaksimalan suatu persamaan kemungkinan.

Fenotipe F2 akan **menyebarkan menurut** sebaran maksimum, $f(n, n_1, n_2, \dots, n_k, p_1, p_2, \dots, p_k)$. Bila dalam F2 fenotipe ke $1, 2, \dots, k$ mempunyai peluang p_1, p_2, \dots, p_k dan frekwensi pengamatannya n_1, n_2, \dots, n_k , maka fungsi kemungkinannya, yang mengikuti sebaran multinom, adalah sebagai berikut:

$$L = \binom{n}{n_1, n_2, \dots, n_k} p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_k^{n_k} \quad [1]$$

Umpamanya untuk kasus persilangan $3:1/3:1$ bila genotipe A-B-; A-bb; **aaB-**; dan aabb masing-masing bernisbah pengamatan a; b; c; dan d, maka fungsi kemungkinannya adalah:

$$L = \binom{n}{a, b, c, d} \left[\frac{r^2 - 2r + 3}{4} \right]^a \left[\frac{2r - r^2}{4} \right]^b \left[\frac{(1-r)^2}{4} \right]^c d \quad [2a]$$

Persamaan (2) diperoleh dengan memasukkan frekuensi fenotipe **harapan** yang terdapat pada **Tabel 4**. Untuk jenis persilangan gandengan. Untuk kasus **persilangan tolakan** persamaan dapat dibentuk dengan memasukkan frekuensi **fenotipe** untuk tolakan kedalam persamaan (1) atau dengan cara mengganti nilai r dengan $1-r$ pada persamaan (2a) hasilnya adalah sebagai berikut:

$$L = \binom{n}{a, b, c, d} \left[\frac{2-r^2}{4} \right]^a \left[\frac{1-r^2}{4} \right]^b \left[\frac{r^2}{4} \right]^c d \quad [2b]$$

Persamaan kemungkinan maksimum diperoleh dengan cara **memaksimalkan** fungsi logaritme dari persamaan kemungkinan. Fungsi logaritme dari **persamaan (1)** ialah:

$$\log L = \log \binom{n}{n_1, n_2, \dots, n_k} + n_1 \log p_1 + n_2 \log p_2 + \dots + n_k \log p_k.$$

Pemaksimalan dilakukan melalui pembentukan turunan pertama dari fungsi $\log L$. Karena p_i merupakan fungsi r maka turunan pertama yang dicari ialah turunan terhadap r , yaitu sebagai berikut:

$$f(r) = \frac{d \log L}{dr} = n_i \frac{d \log p_i}{dp_i} \frac{dp_i}{dr} = 0 \quad [3]$$

Misalnya untuk persamaan (2) akan diperoleh persamaan **kemungkinan maksimum** sebagai berikut:

$$f(r) = a \frac{2(r-1)}{3-2r+r^2} + (b+c) \frac{2(1-r)}{2r-r^2} + d \frac{-2(1-r)}{(1-r)^2} = 0 \quad [4a]$$

Untuk tipe tolakan persamaan kemungkinan maksimumnya dapat disusun dengan mengganti r dengan $(1-r)$ dan kemudian keseluruhan persamaan diubah tanda. Jadi dari persamaan [4a] dapat disusun persamaan untuk jenis tolakan sebagai berikut:

$$f(r) = a \frac{2r}{2+r^2} + (b-c) \frac{-2r}{1-r^2} + d \frac{2}{r} = 0 \quad [4b]$$

Teknik yang sama dapat dimanfaatkan untuk berbagai kasus persilangan. Juga seperti yang telah disinggung pada bagian terdahulu pada suatu ciri kadang-kadang terdapat lebih dari satu lokus yang mengendalikannya. Untuk karakter-karakter semacam ini dalam penyusunan persamaan kemungkinan maksimum penting diketahui terlebih dahulu frekuensi harapan genotipenya. Pada bagian 4 (contoh numerik) diperlihatkan cara penyusunan fungsi kemungkinan maksimum untuk kasus karakter yang dikendalikan dua lokus yaitu persilangan 9:7:3:1.

PENDUGAAN NILAI KOEFISIEN REKOMBINASI

Pendekatan Newton

Dalam mencari jawaban untuk persamaan kemungkinan maksimum $f(r)=0$, untuk menduga nilai r , dapat digunakan pendekatan Newton. Teknik pendekatan Newton dapat dilihat pada buku-buku Analisis Numerik, misalnya Carnahan et al. (1969).

Langkah pertama adalah memberikan sembarang nilai r sehingga akan diperoleh nilai $f(r)$, dan kemudian dicari nilai r berikutnya yang akan memberikan nilai $f(r)$ yang mendekati nilai $f(r)=0$. Caranya adalah sebagai berikut:

$$r'(r_t) = \frac{f(r_t)}{r_{t+1}-r_t}$$

$$\text{Sehingga } r_{t+1} = r_t + \frac{f(r_t)}{f'(r_t)} \quad [5]$$

$$\text{dan } A \quad r_t = r_{t+1} - r_t = \frac{f(r_t)}{f'(r_t)} \quad [6]$$

Penghitungan nilai r_{t+1} pada persamaan [5] dilakukan berulang kali, untuk mendapatkan nilai r_{t+2} , r_{t+3} , dan seterusnya sampai diperoleh nilai r yang memenuhi syarat $f(r)=0$. Nilai $A \quad r$ pada persamaan [6] merupakan persamaan yang konvergen; dan pada $f(r)=0$, $A \quad r$ akan mempunyai nilai sama dengan nol (0). Jadi proses iterasi dilakukan sampai diperoleh $A \quad r=0$, yang berarti nilai r yang diperoleh akan memenuhi syarat $f(r) = 0$.

Dalam melakukan iterasi persamaan [5] dan [6] digunakan $f'(r)$ atau turunan pertama dari fungsi kemungkinan maksimum. Karena $f(r) = d \log L/dr$ maka:

$$f'(r) = \frac{d^2 \log L}{dr^2}$$

Allard (1954) telah **mendekati** persamaan tersebut dengan informasi (I_r) yaitu:

$$I_r = E \left(\frac{d^2 \log L}{dr^2} \right)$$

Bila informasi masing-masing individu sama dengan i_r , maka I atau informasi total adalah penjumlahan dari nilai i_r untuk setiap individu. Nilai i_r untuk setiap individu ialah:

$$i_r = - \sum p_i \frac{d^2 \log p_i}{dr^2} \text{ atau } \sum \frac{1}{p_i} \left[\frac{dp_i}{dr} \right]^2 \quad [7]$$

Nilai i_r ternyata hanya ditentukan oleh nilai r , sehingga besarnya akan sama untuk setiap individu. Oleh karena itu bila banyaknya individu dalam percobaan sama dengan r maka informasi total I_t akan sama dengan $n i_r$.

Untuk kasus hibrida 3:1/3:1 jenis gandengan nilai i_r , persamaan [7] dihitungkan dengan menggunakan dp_i/dr dari persamaan [4a] dan akan diperoleh hasil sebagai berikut:

$$i_r = \frac{2(3-4r + 2r^2)}{(3-r+r^2)(2r-r^2)} \quad [8a]$$

Sedangkan untuk jenis tolakan:

$$i_r = \frac{2(1+2r^2)}{(2+r^2)(1-r^2)} \quad [8b]$$

Persamaan i_r pada 8b diperoleh dengan cara mengganti nilai r dengan $1-r$ pada persamaan 8a. Atau dapat juga dengan cara menggunakan persamaan [7] dengan memasukkan nilai dp_i/dr yang diambil dari persamaan [4b].

Program r dapat dihitung sebagai $1/I_r$ jadi nilai simpangan baku untuk r adalah:

$$S_r = \sqrt{1/I_r} \text{ atau } \sqrt{1/n i_r}$$

Dengan diketahui nilai S_r maka selang dari nilai r di duga sebagai berikut:

$$\text{Koefisien rekombinasi} = r \pm \sqrt{1/n i_r}$$

Penyusunan Program Iterasi

Telah dijelaskan sebelumnya bahwa nilai koefisien rekombinasi r dicari melalui proses iterasi dengan menggunakan persamaan [5] dan persamaan [6]. Juga telah dijelaskan bahwa $f'(r)$ pada persamaan tersebut didekati dengan informasi I_r . Jadi dalam perhitungan kedua persamaan tersebut diubah menjadi:

$$r_{t+1} = r_t + \frac{f(r_t)}{I_r}$$

$$\Delta r_t = r_{t+1} - r_t = f(r_t)/I_r$$

Sedangkan $I_r = n \cdot I_r$.

Telah dijelaskan bahwa iterasi dilakukan dengan memasukkan sembarang nilai r , dan akan berhenti bila diperoleh nilai r yang menghasilkan $f(r)=0$; yaitu pada saat $A \ r_t = 0$.

Dalam mencari nilai koefisien rekombinasi, nilai r pertama yang dimasukkan kedalam persamaan-persamaan tersebut diatas ialah 0.5, yaitu nilai r terbesar, yang merupakan kasus lokus **bebas**. Sedangkan **batas** $A \ r_t$ untuk menentukan nilai r yang dimaksud tidak perlu sampai betul-betul sama dengan nol (0), karena **hal** ini akan memerlukan waktu yang cukup lama, atau sama **sekali** tidak akan pernah tercapai. Dalam proses iterasi **batas** akhir ditentukan bila:

$$|\Delta r| \leq \epsilon$$

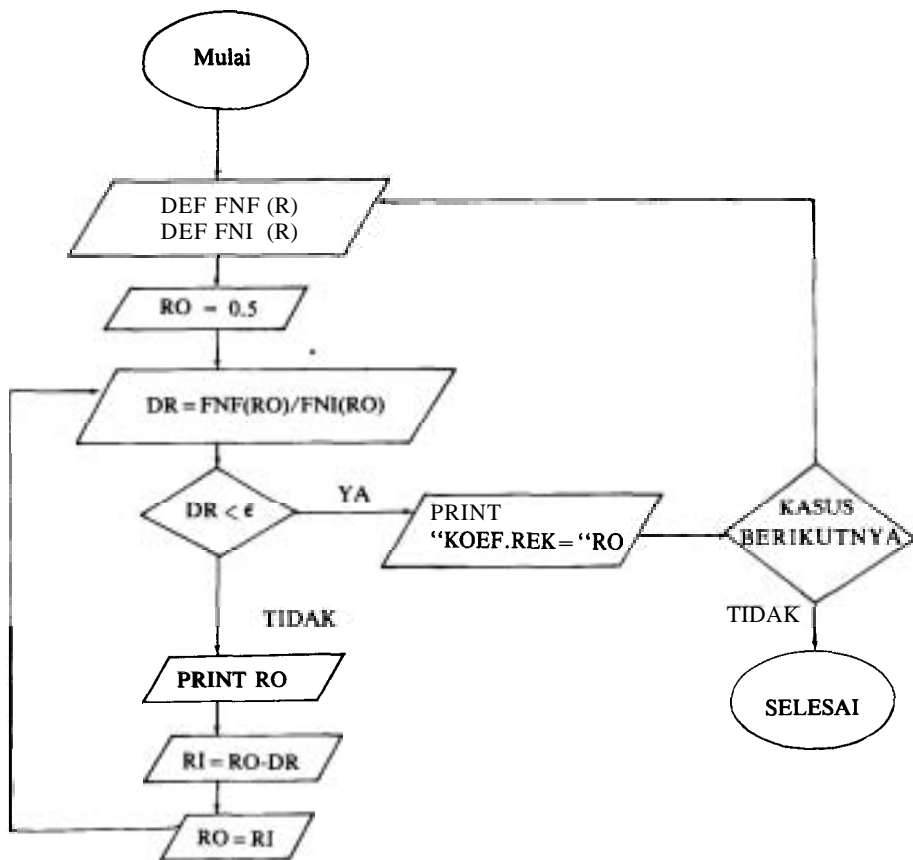
ϵ mempunyai nilai yang **sangat** kecil, dan nilainya ditentukan sesuai dengan desimal, atau ketelitian yang diinginkan. Dalam kasus koefisien rekombinasi dapat digunakan nilai 0,000099, karena koefisien rekombinasi mempunyai satuan **persen**, sehingga diperlukan nilai **empat** desimal dibelakang satuan bila kita memerlukan angka dua desimal dibelakang satuan **persen**. Dengan $\epsilon = 0.000099$ akan diperoleh nilai yang tetap untuk **empat** desimal dibelakang **satuan**.

Untuk melakukan iterasi dapat dibuat suatu program komputer seperti yang diperlihatkan pada **bagan** akhir Gambar 2. Inti perhitungan yang menentukan hasil akhir terletak pada fungsi $f(r)$ dan informasi I_r . Pembuatan fungsi dalam bahasa BASIC ditentukan dengan perintah DEF FN. Misalkan untuk **men**-definiskan fungsi $f(r)$ pada persamaan 4b dan informasi pada persamaan 8a, dapat ditulis perintah sebagai berikut:

$$\text{DEF FNF (R)} = \frac{A * 2 * (R - 1)}{(3 - 2 * R + R^2)} + \frac{(b + c) * 2 * (1 - R)}{(2 * R - R^2)} + \frac{d * (-2 * (1 - R))}{(1 - R)^3}$$

$$\text{DEF FNI (R)} = \frac{2 * (3 - 4 * R + 2 * R^2)}{(3 - R + R^2) * (2 * R - R^2)}$$

Contoh numerik untuk penggunaan program ini akan disajikan pada bagian berikutnya.



Gambar 1. Bagan alir program untuk menghitung koefisien rekombinasi dengan menggunakan pendekatan Newton.

Figure 1. Flow chart procedure of coefficient recombination calculation base on Newton approach.

Contoh Numerik Pada *Setaria italica*

Jusuf (1983) telah melakukan persilangan antara dua tanaman *Setaria italica*, yaitu koleksi no 37.80 dan no 511.80. Keduanya merupakan bagian dari koleksi laboratorium GPDP-CNRS Gif-sur-Yvette. Kedua tanaman tersebut mempunyai perbedaan pada empat karakter yaitu warna hipokotil, lokus Est-2, lokus Est-3 dan MDH-1 (lihat Tabel 6). Lokus Est-2, Est-3 dan MDH-1,

merupakan lokus atau gen yang mengendalikan pembentukan isoenzim **estrase** dan malat dehidrogenase. Kedua enzim ini dipelajari dengan menggunakan teknik elektroforesis.

Tabel 6. Ciri yang membedakan **tanaman** yang disilangkan (no. 37.80 X no. 511.80).

Table 6. **The observed characters of cross plant (no. 37.80 X no. 511.80).**

Ciri Character	No. 37.80	No. 511.80
Hipokotil	hijau (green)	merah (red)
Lokus Est-2	Est-2^{aa}	Est-2^{cc}
Lokus Est-2	Est-2^{bb}	Est-2^{aa}
Lokus MDH-1	MDH-1^{bb}	MDH-1^{aa}

Hipokotil mempunyai dua warna yaitu merah dan hijau, yang pada **populasi** F2 mempunyai perbandingan 9:7 (Hasil pengamatan dari percobaan lihat pada **Tabel 9**). Data **tersebut** menunjukkan bahwa warna hipokotil **dikendalikan** oleh dua lokus yang **bebas**. **Bila alel-alel** pada kedua lokus **tersebut** adalah A, a, B dan b, maka A-B- akan berwarna merah dan genotipe lainnya berwarna hijau. Atau dengan perkataan lain kehadiran alel dominan secara serempak pada kedua lokus akan memunculkan warna merah, dan bila pada salah satu lokus bukan alel dominan, hipokotil akan berwarna hijau.

Pada esterase terdapat 3 lokus yaitu **Est-1**; **Est-2**; dan **Est-3** dan pada MDH terdapat dua lokus MDH-1 dan MDH-2. Pada lokus **Est-1**, **Est-2**, dan MDH-1 terdapat **empat** alel; pada **Est-3** terdapat tiga alel, dan pada MDH-2 terdapat dua alel. Masing-masing alel ditandai dengan pemberian **huruf** a, b, c, atau d dibelakang angka tanda lokus; misal alel **Est-2^a**, **Est-2^b**, dsb (Jusuf dan Pernes, 1985). Pengertian tanda **Est 2^{aa}** atau MDH **1^{aa}** pada **Tabel 6** ialah bahwa lokus-lokus **tersebut** homozigot untuk alel a.

Diantara **empat** karakter yang membedakan persilangan kedua tetua **tersebut** diatas (lihat **Tabel 5**), terdapat pautan antara karakter warna hipokotil dengan lokus **Est-2** dan antara lokus **Est-3** dengan lokus MDH-1 (data lihat **Tabel 9**), sedangkan untuk **pasangan** karakter lainnya terjadi segregasi yang **bebas**. Penghitungan koefisien rekombinasi untuk kedua **pasang** karakter **tersebut** diatas akan menjadi contoh penerapan **metode** yang telah dijelaskan terdahulu. Sebelumnya perlu dijelaskan bahwa pada lokus **Est-2** alel **Est-2^c** dominan terhadap alel **Est-2c**. Sedangkan pada lokus **Est-3** dan lokus MDH-1 tidak terdapat hubungan dominan resesif untuk **alel-alel** yang dilibatkan **dalam** percobaan. Jadi **pasangan** warna hipokotil dengan **Est-2** merupakan kasus persilangan **9:7/3:1**, sedangkan **pasangan** **Est-3** dengan MDH-1 merupakan persilangan **1:2:1/1:2:1**.