*Jurnal Bioteknologi Pertanian*, Vol. 7, No. 1, 2002, pp. 8-16

# Keragaman genetik plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD

*Genetic performance of citrus germplasm based on RAPD marker analysis*

Karsinah[1], Sudarsono[2], Lilik Setyobudi[1], dan Hajrial Aswidinnoor[2]

[1]*Balai Penelitian Tanaman Buah, Kotak Pos 5 Solok 27301, Indonesia*
[2]*Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia*

## ABSTRACT

Information on genetic diversity in citrus germplasm is necessary to support breeding programs and efforts of conservation. Random amplified polimorphic DNA (RAPD) marker could enhance the efficiency of early selection stage and reduce time consuming in citrus breeding. The objectives of this research were to study the genetic diversity of citrus germplasm and to identify citrus cultivar by RAPD markers. The results showed that thirty accessions of citrus germplasm analyzed by ten selected-primers generated 37 RAPD markers, which were polymorphic. Cluster analysis at 0.75 similarities level produced four groups: orange-mandarin, pummelo, JC-RL rootstock, and Flying Dragon-Citrumelo 4475 rootstock groups. Further analysis utilizing WinBoot showed that two groups, i.e., orange-mandarin and JC-RL rootstock groups had low degree of confidence (< 90%). Two specific RAPD markers were identified in this experiment. The two markers are OPN16-400 that specific for mandarin cv. Cina Konde and OPW19-1900 that specific for pummelo cv. Krikilan Merah.

[*Keywords*: *Citrus*, genetic variation, germplasm, RAPD]

## ABSTRAK

Informasi tentang keragaman genetik plasma nutfah sangat diperlukan untuk mendukung program pemuliaan dan upaya konservasi. Penanda *random amplified polimorphic DNA* (RAPD) dapat meningkatkan efisiensi pada tahap awal seleksi dan dapat memperpendek waktu yang diperlukan untuk program pemuliaan tanaman jeruk. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik plasma nutfah jeruk dan mengidentifikasi kultivar jeruk berdasarkan penanda RAPD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 30 asesi plasma nutfah jeruk yang dianalisis dengan menggunakan 10 primer terseleksi, diperoleh 37 penanda RAPD, di mana 34 dari penanda tersebut adalah polimorfik. Analisis pengelompokan pada tingkat kesamaan 0,75 menghasilkan empat kelompok, yaitu jeruk keprok-jeruk manis, jeruk besar, batang bawah JC-RL, dan batang bawah Flying Dragon-Citrumelo 4475. Berdasarkan analisis *bootstrap* diketahui bahwa pengelompokan jeruk keprok-jeruk manis dan batang bawah JC-RL mempunyai tingkat kepercayaan rendah (< 90%). Terdapat dua pita spesifik yaitu OPN16-400 sebagai identifikasi jeruk keprok Cina Konde dan OPW19-1900 sebagai identifikasi jeruk besar Krikilan Merah.

[*Kata kunci*: *Citrus*, keragaman genetik, plasma nutfah, RAPD]

## PENDAHULUAN

Jeruk (*Citrus* spp.) merupakan salah satu genus dari famili Rutaceae yang mempunyai nilai ekonomi paling tinggi. Keragaman genetik jeruk sangat tinggi, yang ditunjukkan oleh tingginya jumlah unit taksonomi (spesies dan hibrida) (Cottin, 1997). Poliembrioni, hibridisasi, mutasi, dan keragaman fenotip menyebabkan identifikasi dan klasifikasi jeruk sulit dilakukan. Banyak terdapat koleksi plasma nutfah jeruk yang berasal dari varietas lokal dengan nama sesuai dengan daerah asalnya, atau kultivar yang sama dengan nama yang berbeda (Machado *et al.*, 1996).

Hasil eksplorasi jenis-jenis jeruk dan kerabat liarnya menunjukkan bahwa Indonesia kaya akan sumber plasma nutfah. Tanaman jeruk menyebar hampir di seluruh wilayah Indonesia. Di beberapa daerah banyak dijumpai jenis-jenis jeruk yang tidak diketahui asal-usulnya, seolah-olah asli daerah tersebut dan dikenal sebagai kultivar lokal (Sugiyarto dan Supriyanto, 1992).

Dari sekitar 200 nomor koleksi plasma nutfah jeruk di Loka Penelitian Jeruk dan Hortikultura Subtropik Tlekung dan Balai Penelitian Tanaman Buah di Solok, baru sekitar 15% yang telah dikarakterisasi dan dimanfaatkan. Teknik karakterisasi yang dilakukan memiliki keterbatasan, karena hanya didasarkan pada pengamatan morfologi dengan bahan tanaman yang sebagian besar terinfeksi penyakit sistemik. Dengan demikian, hasil deskripsinya belum menunjukkan karakter sebenarnya dari masing-masing individu dalam plasma nutfah. Program pemuliaan jangka panjang yang memanfaatkan plasma nutfah untuk memperbaiki sifat-sifat agronomi dari kultivar-kultivar terpilih harus didasarkan pada perkiraan determinasi genetik yang lebih akurat, sehingga penentuan individu tanaman sebagai bahan dalam perbaikan genetik dapat dilakukan dengan tepat.

Penanda molekuler merupakan teknik yang efektif dalam analisis genetik dan telah diaplikasikan secara luas dalam program pemuliaan tanaman. Penanda isozim merupakan produk ekspresi gen yang telah diaplikasikan untuk identifikasi bibit hasil perkecambahan biji dan studi hubungan kekerabatan antargenera dan antarspesies pada tanaman jeruk (Anderson *et al.*, 1991; Herrero *et al.*, 1996). Walaupun demikian, menurut Asins *et al.* (1995), penggunaan penanda isozim mempunyai keterbatasan, yaitu umur tanaman berpengaruh terhadap pola pita yang dihasilkan. Di samping itu, penanda isozim menghasilkan polimorfisme yang terbatas, sehingga sulit untuk membedakan kultivar yang berkerabat dekat.

Penanda molekuler *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) telah digunakan untuk identifikasi kultivar jeruk (Ollitrault, 1990), dan pemetaan genetik (Durham *et al.*, 1992; Jarrell *et al.*, 1992). Teknik RFLP dapat menghasilkan polimorfisme yang tinggi, namun teknologi ini sangat mahal, memerlukan waktu lama, memerlukan *probe* (DNA pelacak), bahan radioaktif dan keahlian pelaksananya.

Penanda molekuler *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) dihasilkan melalui proses amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan *polymerase chain reaction* (PCR) yang dikembangkan oleh Williams *et al.* (1990). Menurut Demeke dan Adams (1994), prosedur RAPD lebih murah, lebih cepat, membutuhkan sampel DNA lebih rendah (0,5-50 ng), tidak memerlukan radioisotop, dan tidak terlalu membutuhkan keahlian untuk pelaksanaannya dibandingkan dengan RFLP. Teknik RAPD telah banyak diaplikasikan dalam kegiatan pemuliaan tanaman, antara lain untuk analisis keragaman genetik plasma nutfah tanaman padi (Virk *et al.*, 1995), kapas (Tatineni *et al.*, 1996), dan jeruk mandarin (Filho *et al.*, 1998); analisis genetik populasi tanaman kakao (Ronning *et al.*,1995) dan kelapa (Ashbumer *et al.*, 1997); pemetaan genom dan pembuatan peta keterpautan genetik pada tanaman jeruk melalui analisis segregasi keturunan dari persilangan intergenerik (Cai *et al.*, 1994; Luro *et al.*, 1996); dan identifikasi kultivar apel (Koller *et al.*, 1993), mutan lemon (Deng *et al.*, 1995), dan klon kimera jeruk dari hasil *grafting* (Sugawara *et al.*, 1995).

Sampai saat ini evaluasi keragaman genetik plasma nutfah jeruk di Indonesia belum pernah dilakukan. Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengetahui keragaman genetik plasma nutfah jeruk dan mengidentifikasi kultivar jeruk berdasarkan penanda RAPD.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Biologi Molekuler Tanaman dan laboratorium terpadu Pusat Studi Pemuliaan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (IPB) dari bulan Oktober 1998 sampai Mei 1999. Bahan tanaman berupa daun dari 30 asesi jeruk yang berasal dari koleksi plasma nutfah Balai Penelitian Tanaman Buah dan IPB (Tabel 1).

Penelitian dilakukan dalam dua tahap, yaitu: (1) seleksi primer untuk amplifikasi PCR dengan DNA jeruk, dan (2) keragaman genetik plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. Prosedur penelitian dari tiap tahapan percobaan diuraikan berikut ini.

### Percobaan 1: Seleksi primer untuk amplifikasi PCR dengan DNA jeruk

*Isolasi DNA*

Metode isolasi DNA dilakukan mengikuti prosedur yang dikembangkan oleh Deng *et al.* (1995). DNA diisolasi dari 30 nomor koleksi jeruk yang meliputi 14 nomor jeruk keprok (*C. reticulata*), 7 nomor jeruk manis (*C. sinensis*), 5 nomor jeruk besar (*C. grandis*), dan 4 nomor jeruk batang bawah yaitu JC dan RL (*C. limon*), Citrumelo 4475 (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*) dan Flying Dragon (*P. trifoliata*).

Daun ± 0,25 g ditambah PVP ± 10 mg dan nitrogen cair digerus sampai halus di dalam mortar dingin. Selanjutnya daun dimasukkan ke dalam tabung mikro berisi 1 ml bufer ekstraksi CTAB (3% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; dan 1% *β-mercaptoethanol* yang ditambahkan saat akan melakukan ekstraksi) bersuhu 60°C. Campuran diinkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit diikuti sesekali pengocokan.

Pemurnian DNA dilakukan dengan menambahkan 0,7 ml bufer purifikasi kloroform: isoamil alkohol (24:1)

**Tabel 1. Daftar koleksi jeruk yang digunakan untuk analisis RAPD.**
*Table 1. List of citrus collections used for RAPD analysis.*

| Spesies[1] *Species* | Kultivar *Cultivars* | Asal *Origin* | Koleksi *Collection* |
|---|---|---|---|
| *Citrus reticulata* | K. Kacang | Sumatera Barat/*West Sumatra* | Balitbu |
| (jeruk keprok/*mandarin*) | K. Batu 55 | Jawa Timur/*East Java* | Balitbu |
| | K.M. Singkarak | Sumatera Barat/*West Sumatra* | Balitbu |
| | K. Selayar Ponkan | Sulawesi Selatan/*South Sulawesi* | Balitbu |
| | K. Pulung | Jawa Timur/*East Java* | Balitbu |
| | K. Mandarin Cimahi | Jawa Barat/*West Java* | Balitbu |
| | K. Cina Konde | Jawa Barat/*West Java* | Balitbu |
| | K. Siem Tlekung | Jawa Timur/*East Java* | Balitbu |
| | K. Tejakula | Bali/*Bali* | Balitbu |
| | K. Jepun Madura | Jawa Timur/*East Java* | Balitbu |
| | K. Keling | Sumatera Utara/*North Sumatra* | Balitbu |
| | K. Jepun Betawi | DKI Jakarta/*Jakarta* | Balitbu |
| | K. Tawangmangu | Jawa Tengah/*Central Java* | Balitbu |
| | K. Temple | Introduksi/*Introduction* | Balitbu |
| *Citrus sinensis* | M. Pacitan | Jawa Timur/*East Java* | Balitbu |
| (jeruk manis/*orange*) | M. Waturejo | Jawa Tengah/*Central Java* | Balitbu |
| | M. Punten | Jawa Timur/*East Java* | Balitbu |
| | M. Grovery | Introduksi/*Introduction* | Balitbu |
| | M. Washington Navel Orange | Introduksi/*Introduction* | Balitbu |
| | M. Hamlin | Introduksi/*Introduction* | Balitbu |
| | M. Carter Navel | Introduksi/*Introduction* | Balitbu |
| *Citrus grandis* | B. Nambangan | Jawa Timur/*East Java* | Balitbu |
| (jeruk besar/*pummelo*) | B. Bali | Bali/*Bali* | Balitbu |
| | B. Pasaman | Sumatera Barat/*West Sumatra* | Balitbu |
| | B. Krikilan Merah | Jawa Timur/*East Java* | Balitbu |
| | B. Cikoneng | Jawa Barat/*West Java* | IPB |
| *Citrus limon* | Japansche Citron (JC) | Tidak diperoleh informasi/ *No information obtained* | Balitbu |
| (kultivar batang bawah/ *rootstocks*) | Rough Lemon (RL) | Tidak diperoleh informasi/ *No information obtained* | Balitbu |
| *Poncirus trifoliata* | Flying Dragon | Introduksi/*Introduction* | Balitbu |
| *C.paradisi* x *P. trifoliata* | Citrumelo 4475 | Introduksi/*Introduction* | Balitbu |

[1]Klasifikasi spesies menurut sistematika Swingle (1943) (Swingle dan Reece, 1967).
*Species classification based on Swingle systematic (1943) (Swingle and Reece, 1967).*

ke dalam campuran tersebut, dan pemisahan dengan sentrifugasi (10.000 rpm) selama 10 menit. Fase cair yang telah dipisahkan dimasukkan ke dalam tabung mikro baru dan dimurnikan lagi dengan 1 ml kloroform: isoamil alkohol (24:1) dengan cara yang sama seperti sebelumnya. Fase cair yang didapat dari pemurnian kedua dimasukkan ke dalam tabung mikro baru, ditambah dengan 1 ml isopropanol dingin, dikocok perlahan-lahan sampai terlihat benang-benang putih dan diinkubasi dalam *freezer* selama 30 menit. DNA yang didapat dipisahkan dengan sentrifugasi (10.000 rpm) selama 10 menit. Endapan DNA dicuci dengan 0,5 ml bufer pencuci (76% etanol, 10 mM amonium asetat) dan dikeringkan dengan cara membalikkan tabung mikro di atas kertas tisu. Selanjutnya, endapan DNA diresuspensikan ke dalam 0,5 ml bufer TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0) dan diinkubasikan dengan RNase A (20 µg/ml) pada suhu 37°C selama 60 menit untuk menghilangkan RNA dari preparasi. Selanjutnya ditambahkan 50 µl Na-asetat pH 5,2 dan 1 ml etanol absolut dingin, dikocok perlahan-lahan sampai terlihat benang-benang putih dan diinkubasi dalam *freezer* selama 30 menit. DNA diendapkan dengan sentrifugasi (10.000 rpm) selama 15 menit.

Endapan DNA yang diperoleh dikeringkan dengan cara membalikkan tabung mikro di atas kertas tisu, kemudian dilarutkan dalam 0,1 ml bufer TE dan disimpan pada suhu -20°C.

Kuantitas dan kemurnian DNA dari masing-masing contoh diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Pembacaan $A_{260}$ = 1 berarti konsentrasi DNA adalah 50 µg/ml dan dianggap sebagai faktor konversi. Kemurnian DNA ditetapkan berdasarkan nilai rasio $A_{260}/A_{280}$ sekitar 1,8-2,0 (Sambrook *et al.*, 1989). Kualitas DNA diuji berdasarkan kemampuannya untuk dipotong menggunakan enzim restriksi *Eco*RI.

### *Reaksi amplifikasi dan elektroforesis*

Amplifikasi DNA dilakukan menurut metode Williams *et al.* (1990). Reaksi amplifikasi dilaksanakan menggunakan 25 µl campuran larutan yang terdiri atas 1x bufer reaksi (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9, 0,1% Triton X-100); 0,2 mM dNTP; 2,5 mM $MgCl_2$; 1 unit *Taq* DNA polimerase (Promega); 50 ng DNA templat dan 0,3 µM primer (10-mer kit Operon) dengan menggunakan alat Perkin-Elmer Cetus Gene Amp PCR system 2400. Alat diprogram sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit sebanyak satu siklus; amplifikasi pada suhu 94°C selama 30 detik, suhu 36°C selama 30 detik, dan 72°C selama 80 detik sebanyak 45 siklus; perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit sebanyak satu siklus.

Pada percobaan ini reaksi amplifikasi bertujuan untuk menyeleksi primer yang dapat menghasilkan produk amplifikasi, yang dilakukan dengan menggunakan DNA templat yang berasal dari dua campuran DNA (*DNA bulk*), yaitu: (1) 14 nomor jeruk keprok, dan (2) 7 nomor jeruk manis + 5 nomor jeruk besar + 4 nomor jeruk batang bawah. Amplifikasi DNA untuk menyeleksi 10 primer acak yang sesuai dilakukan dengan menggunakan 20 primer acak (10-mer) dari Operon yaitu: OPA-02, OPA-07, OPA-11, OPA-13, OPA-16, OPD-03, OPE-08, OPE-14, OPH-04, OPK-04, OPN-06, OPN-10, OPN-14, OPN-15, OPN-16, OPN-17, OPN-18, OPN-19, OPW-15, dan OPW-19.

DNA hasil amplifikasi kemudian ditambahkan 6x *loading buffer* [0,25% *bromophenol blue* dan 40% (w/v) sukrosa] dengan konsentrasi akhir 1x dan dielektroforesis bersama DNA standar 1 Kb DNA Ladder (Promega) pada 1,4% gel agarose pada kondisi voltase konstan 70 volt selama 2 jam 25 menit. Gel kemudian direndam dalam larutan etidium bromida 0,5 µg/ml selama 20 menit dan dibilas dengan akuades selama 10 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan di atas *UV transiluminator* dan dilakukan pemotretan menggunakan film Polaroid 667.

### Percobaan 2: Keragaman genetik plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD

Analisis RAPD dilakukan pada 30 nomor koleksi jeruk yang DNA-nya telah diisolasi pada percobaan 1. Amplifikasi dan visualiasi DNA dilakukan sesuai dengan prosedur pada percobaan 1. Pada percobaan ini reaksi amplifikasi DNA menggunakan 10 primer terpilih hasil seleksi pada percobaan 1.

### Analisis data

Data yang diperoleh dari pemotretan gel hasil RAPD berupa pita-pita diskrit dengan ukuran tertentu dari masing-masing koleksi jeruk. Jarak pita diukur dari batas bawah sumur sampai batas bawah pita yang masih tampak. Nomor pita diurutkan dari jarak pita terdekat dengan batas bawah sumur. Pengukuran potongan DNA genom dilakukan dengan membandingkannya dengan berat molekul standar 1 Kb DNA Ladder. Perbedaan antarnomor koleksi jeruk ditunjukkan oleh jumlah pita dan jarak migrasinya.

Analisis data didasarkan pada ada atau tidaknya pita. Profil pita DNA diterjemahkan ke dalam data biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada pita dan 1 untuk adanya pita DNA pada satu posisi yang sama dari individu-individu yang dibandingkan. Pengelompokan data matrik (*cluster analysis*) dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic* (UPGMA) menggunakan program *Numerical Taxonomy and Multivariate System* (NTSYS) versi 1,80. Untuk mengetahui derajat ketelitian data UPGMA dilakukan analisis *bootstrap* dengan menggunakan program *WinBoot* (Yap dan Nelson, 1996).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

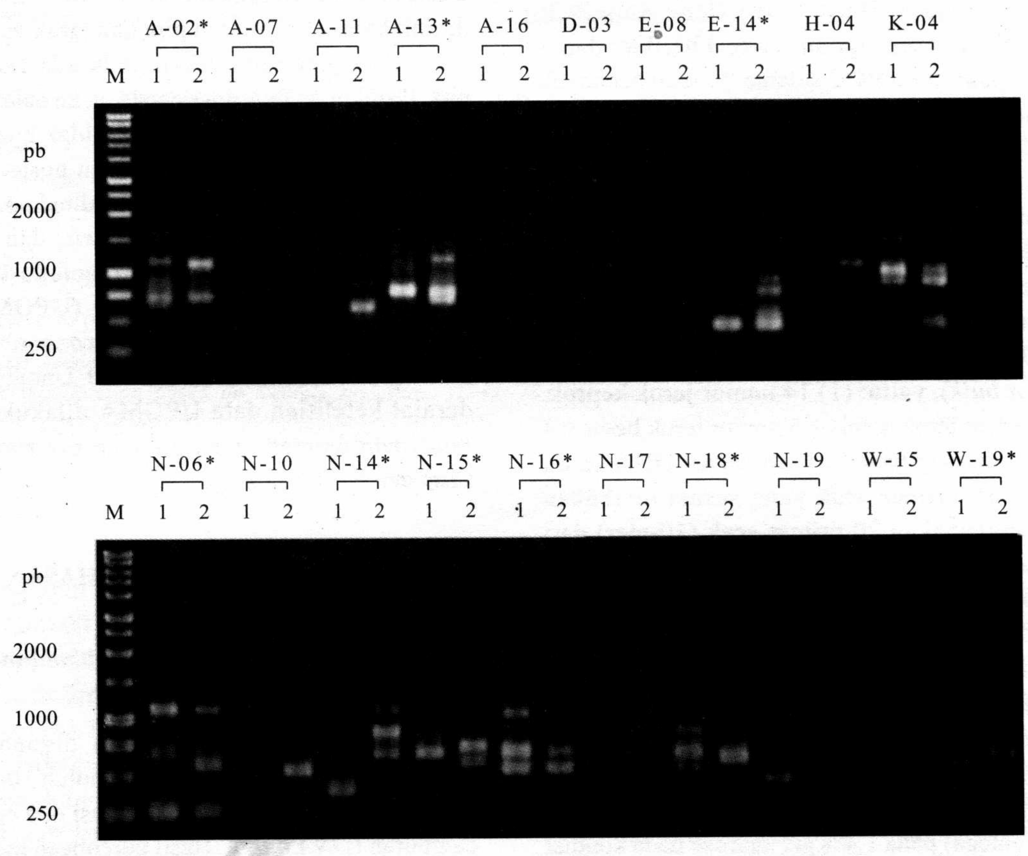
### Percobaan 1: Seleksi primer untuk amplifikasi PCR dengan DNA jeruk

Penyeleksian primer yang akan digunakan untuk analisis RAPD menggunakan dua puluh 10-mer primer yang dipakai untuk mengamplifikasi dua contoh DNA campuran (*DNA bulk*). Hasil percobaan menunjukkan bahwa 10 primer mampu menghasilkan produk amplifikasi pada kedua campuran DNA (OPA-02, OPA-13, OPE-14, OPK-04, OPN-06, OPN-14, OPN-15, OPN-16, OPN-18, dan OPW-19); lima primer menghasilkan produk amplifikasi hanya pada salah satu campuran DNA (OPA-11, OPD-03, OPH-04, OPN-10, dan OPN-19); dan lima primer lainnya tidak menghasilkan produk amplifikasi (OPA-07, OPA-16, OPE-08, OPN-17 dan OPW-15) (Gambar 1). Berdasarkan hasil percobaan ini maka 10 primer yang mampu menghasilkan produk amplifikasi pada kedua campuran DNA digunakan untuk analisis RAPD pada percobaan 2.

**Percobaan 2: Keragaman genetik plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD**

Jumlah fragmen DNA hasil amplifikasi berkisar antara 2 dan 9 pita tergantung pada primer dan genotipe jeruk yang dianalisis, dengan rata-rata 3,7 pita per primer. Ukuran fragmen yang diperoleh berkisar antara 250 dan 1900 bp. Dari 37 total fragmen yang diproduksi oleh 10 primer, 34 fragmen (91,89%) adalah polimorfik (Tabel 2). Dari data yang didapat, polimorfisme terlihat lebih besar antarspesies dibandingkan dengan antarkultivar dalam satu spesies.

Berdasarkan profil pita DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 10 primer, ditentukan matrik kesamaan untuk menentukan hubungan kesamaan genetik antarindividu dalam 30 nomor koleksi jeruk. Hasil analisis kelompok menunjukkan bahwa 30 nomor koleksi yang dianalisis terbagi menjadi empat kelompok pada tingkat kesamaan 0,75, yaitu: (1) jeruk keprok-jeruk manis, (2) jeruk besar, (3) batang bawah JC-RL, dan (4) batang bawah Flying Dragon-Citrumelo 4475. Setelah hasil analisis pengelompokan dengan program NTSYS dilanjutkan dengan program *WinBoot* untuk mengetahui tingkat signifikansi pengelompokan. Hasilnya menunjukkan bahwa pengelompokan jeruk besar dan batang bawah Flying Dragon-Citrumelo 4475 mempunyai tingkat kepercayaan yang cukup tinggi, masing-masing 90,1% dan 96,0%, sedangkan pengelompokan jeruk keprok-jeruk manis dan batang bawah JC-RL mempunyai tingkat kepercayaan yang rendah yaitu di bawah 90% (Gambar 2). Menurut Bustamam dan Moeljopawiro (1998), agar pengelompokan mempunyai nilai signifikansi yang



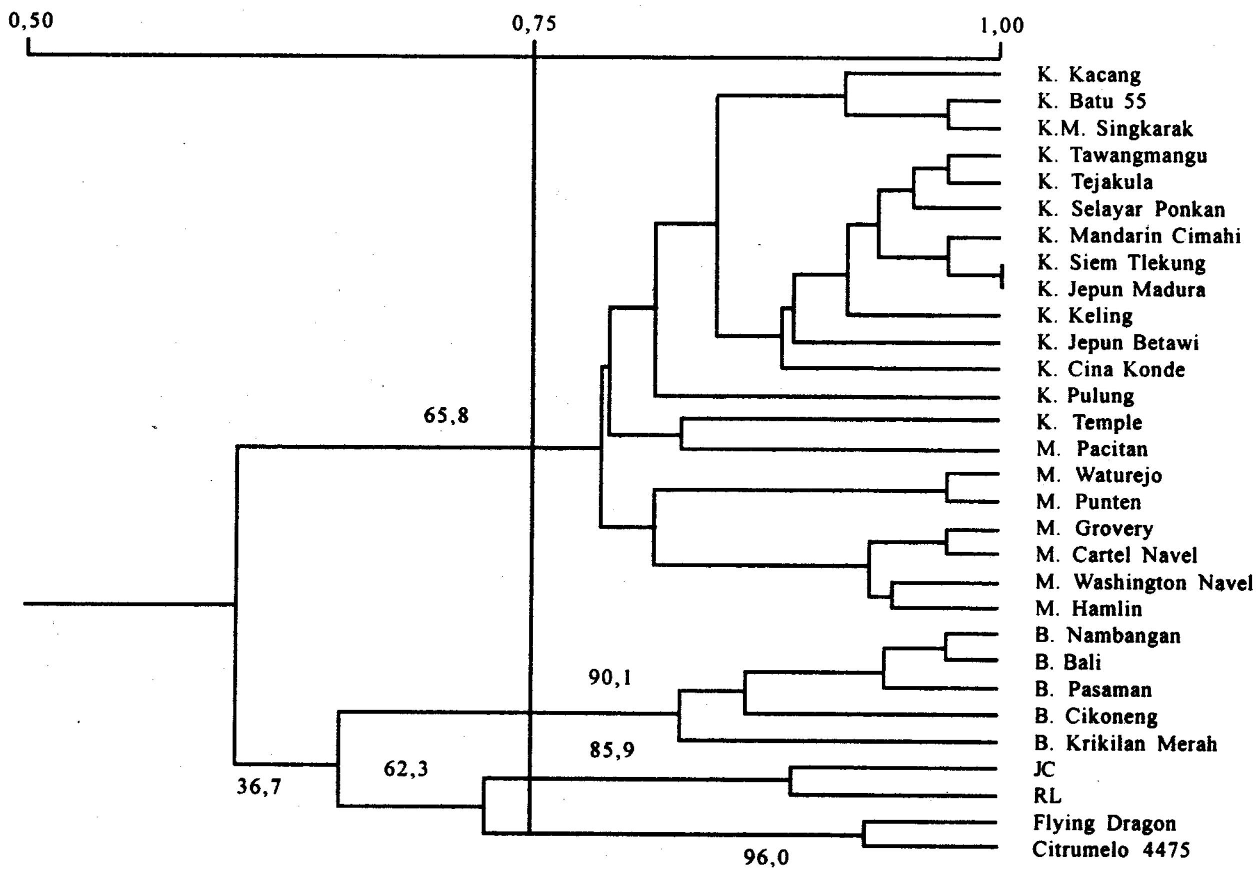

**Gambar 1.** Amplifikasi dua campuran DNA: (1) 14 jeruk keprok, dan (2) 7 jeruk manis + 5 jeruk besar + 4 jeruk batang bawah dengan menggunakan 20 primer; M = 1 Kb DNA Ladder; * = primer terpilih untuk analisis RAPD.

***Fig. 1.*** *Amplification of two DNA bulks: (1) 14 mandarins, and (2) 7 oranges + 5 pummeloes + 4 rootstocks used 20 primers; M = 1 Kb DNA Ladder; * = selected primers for RAPD analysis.*

**Tabel 2. Primer, susunan basa, dan jumlah pita DNA hasil amplifikasi dari 30 nomor koleksi jeruk.**

*Table 2. Primers and their sequences, and the number of DNA bands amplified from 30 accessions of citrus collection.*

| Primer *Primers* | Susunan basa *Sequences* 5'-3' | Jumlah pita *Number of bands* Monomorfik *Monomorphic* | Polimorfik *Polymorphic* | Total *Total* |
|---|---|---|---|---|
| OPA-02 | TGCCGAGCTG | 0 | 9 | 9 |
| OPA-13 | CAGCACCCAC | 0 | 2 | 2 |
| OPE-14 | TGCGGCTGAG | 0 | 4 | 4 |
| OPK-04 | CCGCCCAAAC | 0 | 4 | 4 |
| OPN-06 | GAGACGCACA | 1 | 3 | 4 |
| OPN-14 | TCGTGCGGGT | 0 | 3 | 3 |
| OPN-15 | CAGCGACTGT | 0 | 2 | 2 |
| OPN-16 | AAGCGACCTG | 1 | 3 | 4 |
| OPN-18 | GGTGAGGTCA | 1 | 1 | 2 |
| OPW-19 | CAAAGCGCTC | 0 | 3 | 3 |
| Total | | 3 | 34 | 37 |




**Gambar 2.** Dendrogram 30 nomor koleksi plasma nutfah jeruk yang dihasilkan dari analisis UPGM gabungan 10 primer. Angka-angka pada 'garpu' merupakan persentase ketelitian setelah dilakukan analisis *bootstrap* dengan program *WinBoot*. K = jeruk keprok, M = jeruk manis, dan B = jeruk besar.

***Fig. 2.** Dendrogram among 30 accessions of citrus germplasm generated based on UPGM analysis with ten arbitrary primers. The numbers on fork are the percentage of confidence based on bootstrap analysis by WinBoot program. K = mandarin, M = orange, and B = pummelo.*

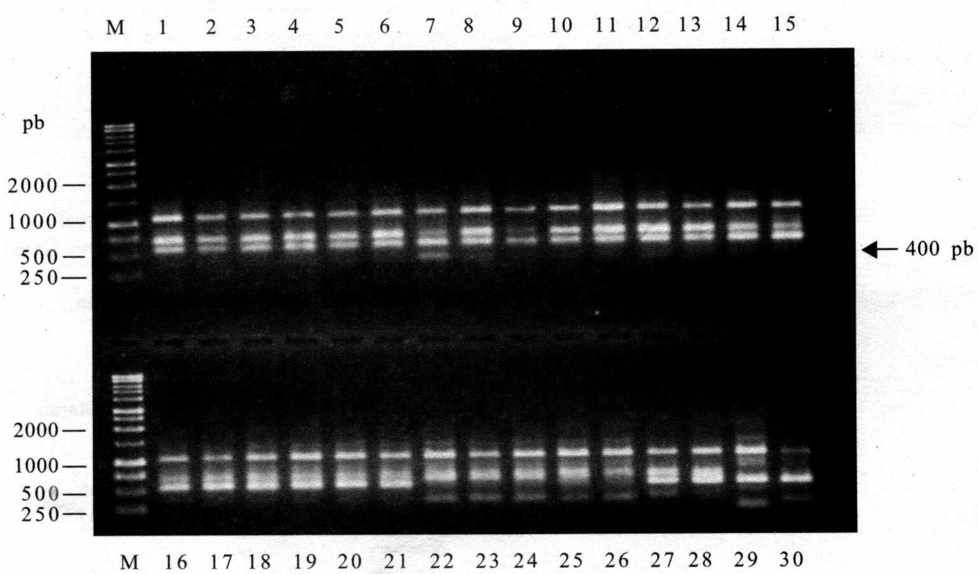
tinggi (90-100%), perlu dilakukan penelusuran primer-primer yang mampu mengelompok dengan tingkat kepercayaan lebih tinggi.

Batang bawah Flying Dragon dan Citrumelo 4475 berada dalam satu kelompok dengan tingkat kepercayaan 96,0%. Hal ini terjadi karena Flying Dragon merupakan salah satu kultivar dari *P. trifoliata*, sedangkan Citrumelo 4475 adalah hibrida dari *C. paradisi x P. trifoliata*. Flying Dragon yang termasuk genus *Poncirus* seharusnya tidak menjadi satu kelompok dengan *Citrus*, karena *Poncirus* dan *Citrus* berkerabat antargenus. Masuknya Flying Dragon ke dalam kelompok *Citrus* bisa disebabkan oleh sedikitnya penanda RAPD yang digunakan untuk analisis, yaitu hanya 37 pita. Jumlah penanda ini sangat sedikit dibandingkan dengan ukuran genom jeruk yang mencapai $\pm$ 360-400 Mb (Ollitrault, 1992 *dalam* Luro *et al.*, 1996). Pita DNA merupakan hasil berpasangannya nukleotida primer dengan nukleotida genom tanaman. Oleh karena itu, semakin banyak primer yang digunakan akan semakin terwakili bagian-bagian genom tanaman. Pada kelompok jeruk keprok-jeruk manis, di antara 14 jeruk keprok yang diteliti, jeruk keprok Temple menjadi satu kelompok dengan jeruk manis Pacitan dengan tingkat kesamaan 0,83. Dalam klasifikasi, keprok Temple merupakan spesies *C. temple* Hort. Ex Y. Tanaka. Menurut Swingle dan Reece (1967), *C. temple* adalah 'tangor', yaitu hibrida antara *C. reticulata* x *C. sinensis*.

Profil pita DNA dari 30 nomor koleksi jeruk yang diamplifikasi dengan menggunakan primer OPN-16 dan OPW-19 menunjukkan adanya pita spesifik, yaitu OPN16-400 spesifik pada jeruk keprok Cina Konde dan OPW19-1900 spesifik pada jeruk besar Krikilan Merah (Gambar 3 dan 4). Pita-pita spesifik ini dapat memberi harapan sebagai identifikasi kultivar. Namun demikian, masih diperlukan pengujian lebih lanjut dengan menggunakan kultivar-kultivar jeruk keprok dan jeruk besar yang lain. Didapatnya pita spesifik sebagai penanda suatu kultivar atau sebagai pembeda dengan kultivar lainnya sangat penting dalam identifikasi bibit yang benar secara dini, karena identifikasi kultivar secara konvensional didasarkan pada karakter-karakter morfologi yang memerlukan observasi intensif dari tanaman dewasa.

## KESIMPULAN

Dari dua puluh 10-mer primer (Operon) yang digunakan untuk mengamplifikasi dua contoh DNA campuran, terdapat 10 primer yang mampu menghasilkan produk amplifikasi pada kedua DNA campuran, yaitu: OPA-02, OPA-13, OPE-14, OPK-04, OPN-06, OPN-14,

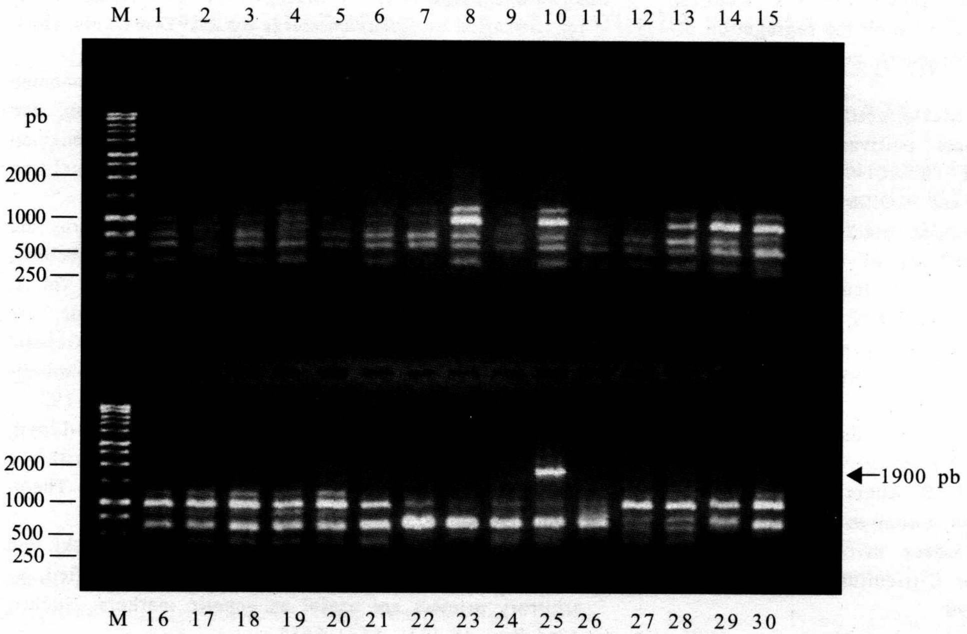



Keterangan lajur/*Notes of column:*

1. K. Kacang
2. K. Batu 55
3. K.M. Singkarak
4. K. Tawangmangu
5. K. Tejakula
6. K. Selayar Ponkan
7. K. Mandarin Cimahi
8. K. Siem Tlekung
9. K. Jepun Madura
10. K. Keling
11. K. Jepun Betawi
12. K. Cina Konde
13. K. Pulung
14. K. Temple
15. M. Pacitan
16. M. Waturejo
17. M. Punten
18. M. Grovery
19. M. Cartel Navel
20. M. Washington Navel
21. M. Hamlin
22. B. Nambangan
23. B. Bali
24. B. Pasaman
25. B. Cikoneng
26. B. Krikilan Merah
27. JC
28. RL
29. Flying Dragon
30. Citrumelo 4475

**Gambar 3.** Profil pita DNA 30 nomor koleksi jeruk hasil amplifikasi dengan menggunakan primer OPN-16. Pita spesifik OPN16-400 adalah pembeda jeruk keprok Cina Konde (lajur 7) dengan jeruk keprok lainnya. M = 1 Kb DNA Ladder.

***Fig. 3.*** *DNA profiles among 30 accessions of citrus collection after amplification with the primer OPN-16. OPN16-400 is the band specific for mandarin cv. Cina Konde (column 7). M = 1 Kb DNA Ladder.*




Keterangan lajur/*Notes of column:*

1. K. Kacang
2. K. Batu 55
3. K.M. Singkarak
4. K. Tawangmangu
5. K. Tejakula
6. K. Selayar Ponkan
7. K. Mandarin Cimahi
8. K. Siem Tlekung
9. K. Jepun Madura
10. K. Keling
11. K. Jepun Betawi
12. K. Cina Konde
13. K. Pulung
14. K. Temple
15. M. Pacitan
16. M. Waturejo
17. M. Punten
18. M. Grovery
19. M. Cartel Navel
20. M. Washington Navel
21. M. Hamlin
22. B. Nambangan
23. B. Bali
24. B. Pasaman
25. B. Cikoneng
26. B. Krikilan Merah
27. JC
28. RL
29. Flying Dragon
30. Citrumelo 4475

**Gambar 4.** Profil pita DNA 30 nomor koleksi jeruk hasil amplifikasi dengan menggunakan primer OPW-19. Pita spesifik OPW19-1900 adalah pembeda jeruk besar Krikilan Merah (lajur 25) dengan jeruk besar lainnya.
***Fig. 4.*** *DNA profiles among 30 accessions of citrus collection after amplification with the primer OPW-19. OPW19-1900 is the band specific for pummelo cv. Krikilan Merah (column 25). M = 1 Kb DNA Ladder.*

OPN-15, OPN-16, OPN-18, dan OPW-19. Dari 30 nomor koleksi plasma nutfah jeruk yang dianalisis berdasarkan penanda RAPD dengan menggunakan 10 primer, pada tingkat kesamaan 0,75 diperoleh empat kelompok, yaitu (1) jeruk keprok-jeruk manis, (2) jeruk besar, (3) batang bawah JC-RL, dan (4) batang bawah Flying Dragon-Citrumelo 4475. Berdasarkan analisis *bootstrap*, diketahui bahwa pengelompokan jeruk keprok-jeruk manis dan batang bawah JC-RL mempunyai tingkat kepercayaan rendah (< 90%). Terdapat dua pita spesifik yaitu OPN16-400 sebagai identifikasi jeruk keprok Cina Konde dan OPW19-1900 sebagai identifikasi jeruk besar Krikilan Merah.

## DAFTAR PUSTAKA

Anderson, C.M., W.S. Castle, and G.A. Moore. 1991. Isozyme identification of zygotic seedlings in Swingle Citrumelo *Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata* nursery and field population. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116 (2): 322-326.

Ashbumer, G.R., W.K. Thompson, and G.M. Halloran. 1997. RAPD analysis of South Pacific coconut palm population. Crop Sci. 37: 992-997.

Asins, M.J., R. Herrero, and L. Navarro. 1995. Factors affecting *Citrus* tree isozyme-gene expression. Theor. Appl. Genet. 90: 892-898.

Bustamam, M. dan S. Moeljopawiro. 1998. Pemanfaatan teknologi sidikjari DNA di bidang pertanian. Zuriat 9 (2): 77-90.

Cai, Q., C.L. Guy, and G.A. Moore. 1994. Extension of the linkage map in citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. Theor. Appl. Genet. 89: 606-614.

Cottin, R. 1997. Citrus of the world, A citrus directory. SRA INRA-CIRAD, San Giuliano. 63 p.

Demeke, T. and R.P. Adams. 1994. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. p. 179-191. *In* H.G. Griffin and A.M. Griffin (Ed.). PCR Technology Current Innovations. CRC Press, Inc. London.

Deng, Z.N., A. Gentile, E. Nicolosi, E. Domina, A. Vardi, and E. Tribulato. 1995. Identification on *in vivo* and *in vitro* lemon mutans by RAPD markers. J. Hort. Sci. 70 (1): 117-125.

Durham, R.E., P.C. Liou, F.G. Gmitter, and G.A. Moore. 1992. Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus. Theor. Appl. Genet. 84: 39-48.

Filho, C.H.D., M.A. Machado, M.L.P.N. Targon, M.C. P.Q.D.G. Moreira, and J. Pompeu Jr. 1998. Analysis of the genetic diversity among Mandarin (*Citrus* spp.) using RAPD markers. Euphytica 102: 133-139.

Herrero, R., M.J. Asins, J.A. Pina, E.A. Carbonell, and L. Navarro. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. Theor. Appl. Genet. 93: 1327-1334.

Jarrell, D.C., M.L. Roose, S.N. Traugh, and R.S. Kupper. 1992. A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. Theor. Appl. Genet. 56: 8

Koller, B., A. Lehmann, J.M. McDermott, and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85: 901-904.

Luro, F., F. Laigret, M. Lorieax, and P. Ollitrault. 1996. Citrus genom mapping with molecular markers: Two maps, obtained by segregation analysis of progeny of one intergeneric cross. Proc. Int. Soc. Citriculture 2: 862-866.

Machado, M.A., H.D.C. Filho, M.L.P.N. Targon, and J. Pompeu Jr. 1996. Genetic relationship of Mediterannean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. Euphytica 92: 321-326.

Ollitrault, P. 1990. Isozyme and DNA restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) as genetic markers in citrus selection. p. 57-68. *In* B. Aubert, S. Tontyaporn, and D. Buangsuwon (Eds.). Rehabilitation of Citrus Industry in The Asia Pacific Region. Proc. of The Asia Pacific International Conference on Citriculture. Chiang Mai, Thailand, 4-10 February 1990.

Ronning, C.M., R.J. Schnell, and D.N. Kuhn. 1995. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Theobroma cacao* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120 (4): 681-686.

Sambrook, J., E.F. Fritsh, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. p. 568-500.

Sugawara, K., A. Oowada, T. Moriguchi, and M. Omura. 1995. Identification of *Citrus* chimeras by RAPD markers. Hort. Sci. 30 (6): 1276-1278.

Sugiyarto, M. dan A. Supriyanto. 1992. Pemuliaan tanaman jeruk. hlm. 92-106. *Dalam* A. Kasno, M. Dahlan, dan Hasnam (Ed.) Prosiding Simposium Pemuliaan Tanaman IPPTI Komisariat Daerah Jawa Timur. Balai Penelitian Tanaman Pangan Malang.

Swingle, W.T. and P.C. Reece. 1967. The botany of citrus and its wild relatives. p. 190-422. *In* W. Reuther, H.J. Webber, and L.D. Batchelor (Eds.). The Citrus Industry Vol. I. Revised Edition. University of California, Riverside.

Tatineni, V., R.G. Cantrell, and D.D. Davis. 1996. Genetic diversity in cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. Crop Sci. 36: 186-192.

Virk, P.S., H.J. Newbury, M.T. Jackson, and B.V. Ford-Lloyd. 1995. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 90: 1049-1055.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18 (22): 6531-6535.

Yap, I. and R.J. Nelson. 1996. WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRI Discussion Paper Series No. 14, IRRI, Manila, Philippines.