Forum Pascasarjana (1989) 12: 1-15.

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 Jusuf[2]

PAU *Bioteknologi IPB, dan Lab Genetika*

ABSTRACT

Coefficient of recombination between two loci can be estimated from it's 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 ± 2.92% and between hypocotyl color and EST-2 loci is 10.21 ± 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[c] 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 Dihibrid

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 garnet-garnet 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 Iokus. 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 melambangkan 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)	0.5 r	0.5 r	0.5 (1-r)
Garnet	AB	Ab	aB	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 (I-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. Fenotype frequency dihybrid crossed in the case of dominance in two loci.

No.	Fenotipe Fenotype	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. Fenotype frequency dihybrid cross in the case of dominance in one locus.

No.	Fenotipe Fenotype	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 (I-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 pemaksimuman suatu persamaan kemungkinan.

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

$$L = \begin{bmatrix} n \\ n_1, n_2, \ldots, n_k \end{bmatrix} p_1^{n_1} \, p_2^{n_2} \cdots p_k^{n_k} \qquad [1]$$

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:

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

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:

$$L = \begin{bmatrix} n \\ a, b, c, d \end{bmatrix} \left[\frac{2 - r^2}{4}\right]^a \left[\frac{1 - r^2}{4}\right] \left[\frac{r^2}{4}\right]^d \qquad [2b]$$

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

$$\log L = \log \begin{bmatrix} n \\ n_1, n_2, \ldots n_k \end{bmatrix} + n_1 \log p_1 + n_2 \log p_2 + \ldots n_k \log p_k.$$

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

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

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

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

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

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

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:

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

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

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

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)=O. Nilai A r pada persamaan [6] merupakan persamaan yang kovergen; dan pada f(r) = 0, A r akan mempunyai nilai sama dengan nol (0). Jadi proses iterasi dilakukan sampai diperoleh A r = 0, yang berarti nilai r yang diperoleh akan memenuhi syarat f(r) = 0.

Dalam melakukan iterasi persamaan [5] dan [6] digunakan $f^1(r)$ 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 (Ir) yaitu:

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

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

$$ir = -\sum Pi \frac{d^2 \log pi}{dr^2} \quad \text{atau} \quad \sum \frac{1}{Pi}\left[\frac{dpi}{dr}\right]^2 \qquad [7]$$

Nilai ir 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 nir.

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

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

Sedangkan untuk jenis tolakan:

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

Persamaan ir 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 dpi/dr yang diambil dari persamaan [4b].

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

$$Sr = \sqrt{1/Ir} \quad \text{atau} \quad \sqrt{1/nir}.$$

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

Koefisien rekombinasi $= r \pm \sqrt{1/nir}$.

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 Ir. Jadi dalam perhitungan kedua persamaan tersebut diubah menjadi:

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

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

Sedangkan Ir = n.Ir.

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 $\Delta r_t = 0$.

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 Δ rt 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:

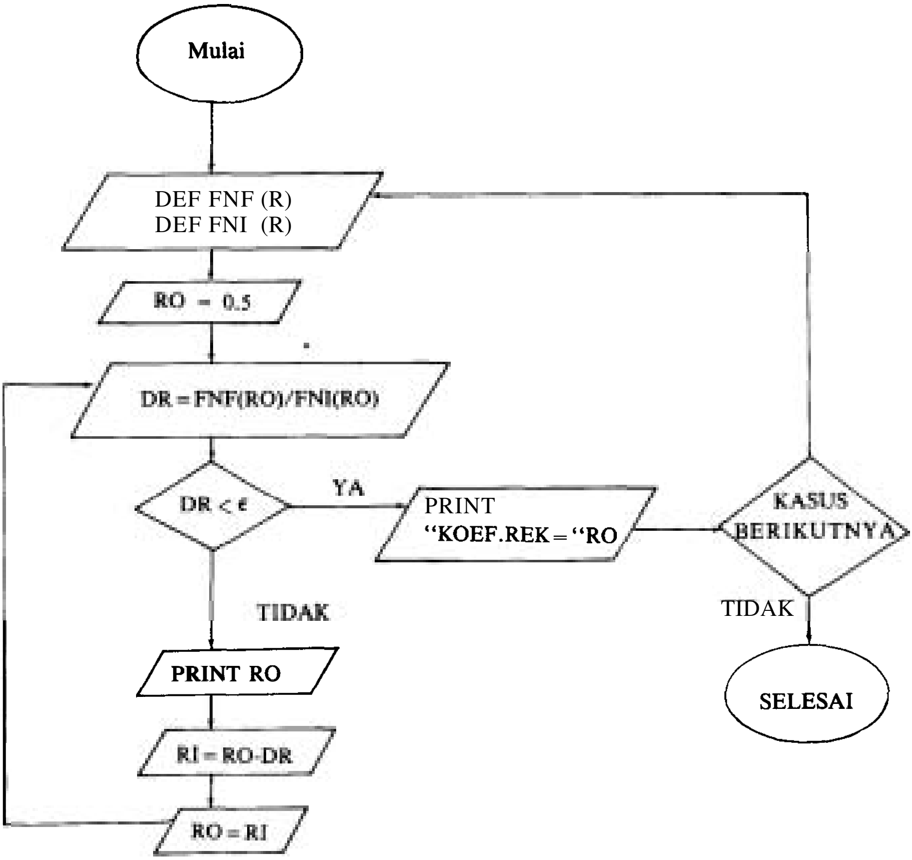
$$|\Delta r| < \epsilon$$

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 ϵ = 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 ir. Pembuatan fungsi dalam bahasa BASIC ditentukan dengan perintah DEF FN. Misalkan untuk mendefinisikan fungsi f(r) pada persamaan 4b dan informasi pada persamaan 8a, dapat ditulis perintah sebagai berikut:

```
DEF FNF (R)=A*2*(R-1)/(3-2*R + R^2) + (b + c)*2*(1-R)/(2*R-R^2) +
                  d*(-2*(1-R)/(1-R) 2
DEF FNI (R)= 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	$Est\text{-}2^{aa}$	$Est\text{-}2^{cc}$
Lokus Est-2	$Est\text{-}3^{bb}$	$Est\text{-}3^{aa}$
Lokus MDH-I	$MDH\text{-}1^{bb}$	$MDH\text{-}1^{aa}$

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 $Est2^{a}$, $Est2^{b}$, 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 $Est\text{-}2^{c}$ 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.