

KERAGAMAN GENETIK HASIL APLIKASI KOLKHISIN PADA TANAMAN JERUK SIAM *cv. PONTIANAK (Citrus nobilis)* SECARA MORFOLOGI DAN MOLEKULER

GENETIC DIVERSITY OF COLCHICINE APPLICATION IN SIAM ORANGE *cv.* PONTIANAK (*Citrus nobilis*) BY MORPHOLOGY AND MOLECULAR

Muh. Yasin^{*)}, Darmawan Saptadi, Niken Kendarini dan Dita Agisimanto¹⁾

Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya
 Jl. Veteran, Malang 65145 Jawa Timur, Indonesia
^{*)}E-mail: muhyasin616@gmail.com

¹⁾Peneliti Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika
 Jl. Raya Tlekung Junrejo, no 1, Batu, Jawa Timur Indonesia

ABSTRAK

Jeruk ialah salah satu buah yang memiliki kandungan vitamin C yang tinggi dan memiliki adaptasi yang luas, sehingga jeruk banyak dibudidayakan dan digemari oleh masyarakat. Meskipun produksi tanaman jeruk meningkat dari 267.061 t (2010), 315.133 t (2011), 362.680 t (2012) dan 514.855 t (2013), dirasa masih belum mencukupi kebutuhan dalam negeri karena impor jeruk di Indonesia jumlahnya masih besar yaitu 160.254 t (2010), 182.345 t (2011) dan 76.227 t (2013). Salah satu usaha untuk meningkatkan produksi buah jeruk yaitu dengan peningkatan keragaman genetik melalui aplikasi zat kolkhisin agar tanaman menjadi poliploid. Hasil mutasi tanaman oleh zat kolkhisin dapat diketahui dengan penanda morfologi dan molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik tanaman hasil aplikasi kolkhisin berdasarkan marka morfologi dan marka molekuler pada tanaman jeruk Siam *cv. Pontianak*. Diduga terdapat keragaman genetik tanaman hasil aplikasi kolkhisin morfologi dan molekuler. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April - Juni 2015 di kebun dan di Laboratorium Pemuliaan Terpadu Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika Tlekung, Batu, Jawa Timur. Tanaman yang diuji yaitu 18 tanaman jeruk Siam Pontianak yang berumur 8 tahun hasil perlakuan kolkhisin. Hasil dari penelitian ini menunjukkan terdapat

perbedaan antara jeruk Siam *cv. Pontianak* dengan jeruk hasil aplikasi kolkhisin pada karakter bentuk daun. Nilai keragaman pada karakter kuantitatif dikategorikan rendah. Pada analisa molekuler terdapat keragaman dengan jarak genetik 71%. Secara molekuler diperoleh 18, 5, 13 dan 8 pita polimorfism yang dihasilkan oleh 4 primer ISSR yang digunakan. Primer ISSR yang digunakan sangat informatif karena nilai dari PIC > 50%.

Kata kunci: Jeruk, Mutasi, Keragaman, Penanda Morfologi dan Molekuler, Sayap Daun.

ABSTRACT

Orange have a high of vitamin C and can adapt in any agro climate make the orange cultivated and popular. Production of oranges increase from 267.061 t (2010), 315.133 t (2011), 362.680 t (2012) and 514.855 t (2013), its production is still not enough, because the import in Indonesia are still large in 160.254 t (2010), 182.345 t (2011), and 76.227 t (2013). Increase of orange's production can be seen by genetic diversity with application colchisines to make poliploid. Mutation can be seen by morphology and molecular marker. The purpose in research is to know genetic diversity of plants which was the results of application colchicines by morphology and molecular marker. Assumption there are

genetic diversity by morphological and molecular marker. This research was conducted in the garden and laboratory of Indonesian Citrus and Subtropical Fruits Research Intitute in Tlekung, Batu, Malang, East Java from April to June 2015. Materials in this research were young leaves of Siam cv. Pontianak orange, 8 years old of 18 orange as the results of colchicines application. The result indicated there are differences between Siam cv. Pontianak orange with the result of application colchicines orange to shape of leaf characters. The genetic variability on quantitative characters is narrow. The dendogram showed that an analysis morphological two groups at the genetic lenght about 68.3% and molecular analysis at genetic lenght 71%. Molecular analysis have 18, 5, 13 and 8 polymorphism band produced by 4 ISSR Primer. ISSR Primer was very informative because the PIC >50%.

Keywords: Orange, Mutation, Diversity, Morphology and Molecular Marker, Petiole.

PENDAHULUAN

Jeruk termasuk buah yang memiliki kandungan vitamin C yang tinggi dan memiliki adaptasi yang luas, sehingga banyak disukai serta dibudidayakan oleh masyarakat di Indonesia. Peningkatan produksi buah jeruk dari 267.061 t (2010), 315.133 t (2011), 362.680 t (2012) dan 514.855 t (2013) (Anonim, 2014) menjadi bukti bahwa buah jeruk banyak diminati oleh masyarakat. Meskipun produksi buah jeruk meningkat dari tahun ke tahun kebutuhan dalam negeri masih belum tercukupi. Besarnya nilai impor buah jeruk dari tahun 160.254 t (2010), 182.345 t (2011) dan 76.227 t (2013) menjadi bukti bahwa produksi jeruk domestik masih belum mencukupi (Anonim, 2014).

Peningkatan produksi dapat dilakukan dengan meningkatkan kualitas buah jeruk seperti ukuran, rasa, dan jumlah buah perpohon. Peningkatan kualitas tanaman dapat dillakukan secara konvensional dengan persilangan serta inkonvensional yaitu dengan mutasi.

Perbaikan kualitas tanaman menjadikan hasil tanman perlakuan akan lebih beragam. Keragaman tanaman mempunyai arti penting bagi pemulia sebagai pengembangan sumber genetik dalam proses pemuliaan (Karsinah *et al.*, 2002).

Perbaikan varietas dan peningkatan varian tanaman dapat dilakukan dengan pengaplikasian kolkhisin sehingga tanaman menjadi poliploidi karena kromosomnya mengganda (Martasari, 2006). Poliploidisasi dapat memperbaiki sifat tanaman yang kurang baik (Sulistianingsih, 2004). Pengaruh pemberian kolkhisin pada tanaman jeruk Siam Pontianak diharapkan dapat memperbaiki sifat tanaman seperti ukuran buah dan jumlah produksi buah. Pengaruh ini dapat diketahui dengan melakukan analisis secara morfologi atau molekuler (Kurniasih *et al.*, 2011). Penggunaan karakterisasi secara morfologi akan menjadi sulit sekali apabila adanya perbedaan secara fenotip, poliembrioni, hibridisasi, mutasi, dan konsep spesies yang berbeda dalam kelompok Mandarin (Agisimanto, Martasari dan Supriyanto, 2006).

Penanda molekuler dapat mendukung hasil dari pengamatan secara morfologi. Keuntungan penanda molekuler karena tidak dipengaruhi oleh lingkungan (Handayani *et al.*, 2006). Marka ISSR menghasilkan tingkat polimorfism dan memperlihatkan keragaman genetik yang lebih tinggi (Agisimanto, Martasari dan Supriyanto, 2006). Marka ISSR ini merupakan metode yang sederhana dan cepat, yang mengkombinasikan keuntungan SSR dan AFLP serta keuniversalan RAPD (Suryatini, 2011).

Tujuan dari penelitian ini ialah untuk mengetahui keragaman genetik tanaman hasil aplikasi kolkhisin berdasarkan marka morfologi dan marka molekuler pada tanaman jeruk Siam cv. Pontianak. Hipotesis dari penelitian ini ialah Terdapat keragaman genetik tanaman hasil aplikasi kolkhisin pada tanaman jeruk Siam cv. Pontianak secara morfologi dan molekuler.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan April - Juni 2015 di kebun dan di Laboratorium Pemuliaan Terpadu Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika Tlekung, Batu, Jawa Timur. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *microwave*, stirer, *autoclave*, pipet, *vortex*, mikropipet, spektrofotometer, gunting, gelas ukur, mikrotube steril, tabung ukur, mesin elektroforesis, timer, sarung tangan, kertas label, masker, mesin PCR, mesin elektroforesis dan mesin pendingin. Bahan dalam penelitian ini adalah tanaman jeruk Siam cv. Pontianak berumur 8 tahun hasil perlakuan kolkhisin dengan dosis 0,15% selama 5 hari (S1M5 24 V1, S1M5 75 V2A2BIC1, S1M5 83 V1A1B1, S1M5 X15 V1A2B1, S1M5 5 V1A1B2), 7 hari (S1M7 46 V1, S1M7 43 V2, S1M7 77.1 V2C1D1, S1M7 70 V2, S1M7 4 V3) dan 10 hari (S1M10 V1 V1, S1M10 44 V1, S1M10 53 V2, S1M10 18 V1, S1M10 V3 A2, S1M10 38 V2, S1M10 61 V2, S1M10 19 V2), serta Cetyl Trimetil Amin Bromide (CTAB), Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA), Tris-HCl, Polyvinil Pyrolidone (PVP), akuades steril, β mercaptoethanol, NaCl, Alkohol 70%, PCR core kit II (Promega), IAA dan primer ISSR (Tabel 1). Penelitian ini termasuk jenis penelitian observasi karena didalamnya melakukan serangkaian kegiatan meliputi pengamatan karakter morfologi dan molekuler.

Analisis Morfologi

Pengamatan yang dilakukan meliputi pengamatan karakter kualitatif dan kuantitatif berdasarkan IPGRI (1989) untuk tanaman jeruk. Karakter kualitatif tanaman meliputi bentuk tajuk, kerapatan cabang, permukaan batang, arah tumbuh tanaman, duri, bentuk duri, warna tunas pucuk, tipe daun, warna daun, daun varigata, bentuk daun, bentuk ujung daun, tepi daun, sayap daun, bentuk sayap daun, dan hubungan antara daun dan sayap daun. Pengamatan karakter kuantitatif tanaman meliputi diameter batang, tinggi tanaman, panjang daun, lebar daun dan tebal daun.

Analisis Molekuler

Material DNA berasal dari daun yang masih muda dari 18 tanaman hasil aplikasi kolkhisin dan tanaman induk jeruk Siam Pontianak. DNA tanaman diisolasi dengan metode CTAB Doyle dan Doyle (1990). Uji kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer (Tenriulo *et al.*, 2001). Kuantitas DNA dapat dilihat dari hasil pita DNA yang dilakukan dengan gel agarose 1% pita DNA didokumentasikan dengan alat BioDoC Analyze (Biometra) (Widiastuti *et al.*, 2013). Amplifikasi ISSR campuran yang digunakan ialah 7.5 μ l buffer Dream Taq Polymerase, 3 μ l primer ISSR, 0.1 μ l dNTPs, 0.5 μ l MgCl, 1.9 μ l Air steril, dan 2 μ l DNA sampel, dicampur sampai homogen. Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR dengan metode (Scarano *et al.*, 2002), amplifikasi mesin PCR berlangsung selama 3 menit untuk 1 siklus denaturasi 94°C, kemudian 45 detik 28 siklus denaturasi, 2 menit 1 siklus Annealing 53°C, 2 menit 1 siklus ekstensi 72°C, dan terakhir 1 siklus ekstensi pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi kemudian dielektroforesis dengan gel agarose 1% dan didokumentasikan.

Hasil pengamatan karakter kualitatif dan analisis molekuler akan diubah menjadi data biner 0 untuk tidak adanya karakter dan tidak adanya pita DNA dan 1 untuk adanya karakter dan adanya pita DNA. Kemudian hasil transformasi dan skoring data dianalisis dengan SAHN *clustering* dengan metode *Unweighted Pair Group Method Arithmetic* (UPGMA) melalui program *Numerical Taxonomy and Multivariate System* (NTSsys) versi 2.02. Nilai keragaman didapatkan dengan menganalisis data hasil pengamatan karakter kuantitatif dengan analisis koefisien keragaman genetik dengan rumus (Sokal dan Rohlf, 1992):

$$KK = \frac{s}{x} \times 100\%$$

Keterangan:

S = Simpangan baku

X = Jumlah tanaman yang diamati

Tabel 1 Primer ISSR yang Digunakan

No.	Nama Primer	Sekuen Primer
1.	ISSR 1 (CA) 8RT	3' CA CACACACACA CA CA RT 5'
2.	ISSR 2 (CA) 8AC	3' CA CA CA CA CA CA CA CA AC 5'
3.	ISSR 3 (AG) 8C	3' AG AG AG AG AG AG AG AG C 5'
4.	ISSR 4 (GA) 8YG	3' GA GA GA GA GA GA GA GA YG 5'

Keragaman gen dapat dilihat dengan nilai *Polymorphic Information Content* (PIC) dengan rumus (Botstein *et al.*, 1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 \quad i=1, 2, 3, \dots, n$$

Keterangan:

f_i^2 = frekuensi lokus ke-i.

l = nomor lokus.

n = jumlah lokus

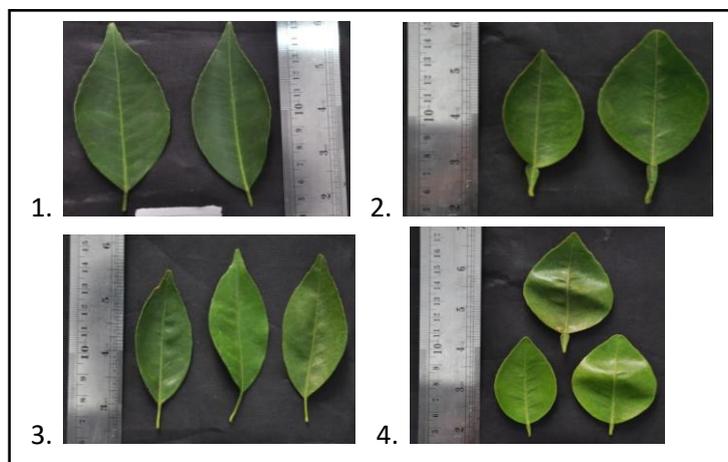
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Morfologi

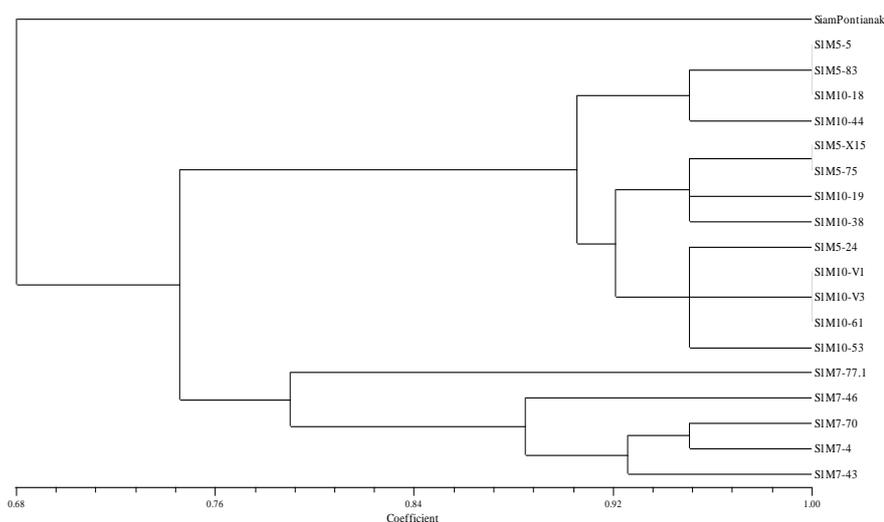
Hasil pengamatan dari karakter kualitatif didapatkan bahwa tidak ada perbedaan pada karakter warna tunas, tipe daun dan daun variegata. Perbedaan antara tanaman jeruk Siam Pontianak dengan tanaman hasil aplikasi kolkhisin terletak pada karakter warna daun, bentuk ujung daun dan tepi daun. Perbedaan yang paling terlihat untuk membedakan antara jeruk Siam Pontianak dengan jeruk hasil aplikasi kolkhisin terletak pada karakter bentuk daun. Pada tanaman jeruk Siam Pontianak mempunyai karakter bentuk daun tidak berpetiol sama dengan pada tanaman hasil perlakuan aplikasi kolkhisin pada perlakuan S1M7, sedangkan bentuk daun pada perlakuan S1M5 dan S1M10 mempunyai bentuk daun yang berpetiol (Gambar 1). Pada umumnya bentuk daun dari jeruk Siam Pontianak berbentuk tidak bersayap atau berpetiol (Dedi *et al.*, 2013). Perbedaan karakter adanya sayap daun diduga akibat terjadinya mutasi karena pengaruh pengaplikasian kolkhisin sehingga menimbulkan individu baru yang berbeda dari induknya dan menimbulkan keragaman tanaman. Seperti yang dijelaskan oleh Sleper *et al.* (2006), penggandaan kromosom yang terjadi akibat dari pengaruh kolkhisin menghasilkan individu baru. Perbedaan ini juga ditunjukkan pada analisis NTSys yang telah dilakukan

berdasarkan karakter kualitatif. Pada dendrogram ini terlihat bahwa tanaman sampel terbagi menjadi 2 kelompok besar dengan jarak genetik 68.3% - 100% (Gambar 2). Pengelompokan terjadi pada tanaman perlakuan S1M5 dan S1M10, sedangkan pada perlakuan S1M7 menjadi kelompok sendiri. Tingkat kemiripan berdasarkan karakter morfologi yang menunjukkan perbedaan kemiripan antar tanaman, belum bisa dijadikan sebagai acuan. Hal ini disebabkan oleh faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi karakter morfologi yang tercipta (Sudarmi, 2013). Akan tetapi faktor kualitatif umumnya tidak dipengaruhi oleh lingkungan seperti karakter bentuk daun, warna biji bentuk buah dan bentuk pohon (Soenarsih *et al.*, 2012).

Pendugaan keragaman genetik melalui karakter kuantitatif digunakan analisis koefisien keragaman (Tabel 2). Nilai koefisien keragaman tertinggi pada karakter panjang daun sebesar 41.22% yang termasuk dalam golongan nilai koefisien sedang (25.1 – 50%) (Suratman *et al.*, 2000). Pada karakter diameter batang (22.75%), tinggi tanaman (14.26%), luas daun (19.49%), dan tebal daun (0.2%) termasuk rendah. Sesuai dengan pernyataan Suratman *et al.* (2000), bahwa nilai koefisien keragaman berkisar 0,1 – 25 % tergolong rendah. Nilai koefisien keragaman dapat digunakan untuk menduga tingkat perbedaan antar tanaman pada karakter yang terpilih, semakin tinggi nilai keragaman semakin jauh hubungan kekerabatan dan sebaliknya (Suratman *et al.*, 2000). Dilihat dari data pengamatan yang didapatkan nilai antara tanaman dengan perlakuan dengan tanaman kontrol nilainya relatif lebih kecil tanaman yang diberi perlakuan daripada tanaman kontrol. nilainya relatif lebih kecil tanaman yang diberi perlakuan daripada tanaman kontrol. Karakter diameter batang satu-satunya



Gambar 1 Bentuk daun jeruk Siam cv. Pontianak (1), S1M5 (2), S1M7 (3), dan S1M10 (4)



Gambar 2 Dendrogram keragaman 19 tanaman jeruk hasil aplikasi kolkhisin, berdasarkan karakter kualitatif

yang mempunyai nilai relatif lebih besar daripada tanaman kontrol. Pada karakter tebal daun terdapat 1 tanaman yang memiliki nilai hampir dua kali dari tanaman kontrol yaitu tanaman S1M7 77.1 V2C1D1. Peningkatan ketebalan daun ini diduga akibat dari menggandanya kromosom yang terjadi akibat dari pemberian kolkhisin pada tanaman. Seperti yang dijelaskan oleh Sulistyarningsih *et al.*, (2004).

Pada umumnya sifat tanaman poliploid mempunyai bagian tanaman lebih besar (akar, batang daun, dan

buah). Penyebab dari hasil pengamatan nilai lebih kecil daripada tanaman kontrol dikarenakan tanaman sampel yang diamati berlokasi di tempat yang berbeda. Akibatnya terjadinya perbedaan perawatan tanaman. Pohon induk dipelihara pada kondisi terkontrol, sedangkan tanaman hasil aplikasi kolkhisin berada di lokasi yang tidak terkontrol. Menurut Sudarmi (2013) menjelaskan bahwa morfologi tanaman dapat berubah-ubah karena adanya pengaruh terhadap lingkungan. Selain itu tanaman dapat tumbuh dengan maksimal

Tabel 2 Data Karakter Diameter Batang, Tinggi Tanaman, Lebar Daun, dan Tebal Daun

	Diameter Batang (cm)	Tinggi Tanaman (m)	Panjang Daun (cm)	Lebar Daun (cm)	Tebal Daun (cm)
Siam cv. Pontianak	3,734	3,958	10,131	4,639	0,040
S1M5 83 V1A1B1	4,846	3,540	8,987	3,886	0,056
S1M5 5 V1A1B2	5,220	3,050	8,340	3,640	0,041
S1M5 X15 V1A2B1	4,894	3,100	10,147	4,886	0,043
S1M5 75 V2A2BIC1	5,003	2,760	7,176	2,957	0,039
S1M5 24 V1	3,648	2,330	9,363	4,890	0,037
S1M7 70 V2	5,340	2,760	6,944	3,537	0,029
S1M7 77.1 V2C1D1	4,080	2,125	8,539	3,748	0,072
S1M7 43 V2	3,962	1,760	7,852	3,684	0,034
S1M7 4 V3	3,300	2,675	6,934	3,299	0,030
S1M7 46 V1	4,096	2,900	5,554	2,624	0,037
S1M10 38 V1	4,264	2,100	6,670	3,727	0,036
S1M10 V1 V1	3,744	2,450	7,945	3,479	0,038
S1M10 61 V2	5,500	3,950	7,982	4,194	0,041
S1M10 44 V1	5,384	2,820	7,314	3,474	0,033
S1M10 53 V2	3,376	2,300	6,841	3,206	0,038
S1M10 19 V2	3,846	2,250	7,377	3,660	0,035
S1M10 18 V1	3,962	2,270	7,651	3,578	0,036
S1M10 V3 A2	3,958	2,400	7,068	3,267	0,037
KK%	22,758	14,265	41,222	19,495	0,209

apabila terdapat perawatan yang baik serta unsurhara yang dibutuhkan oleh tanaman tersedia dalam tanah (Dedi *et al.*, 2013).

Pengaruh pengaplikasian kolchisin pada tanaman seharusnya menjadikan tanaman lebih vigor dan umumnya bersifat poliploid serta memiliki ukuran lebih besar dari padatanaman diploid (Suminah *et al.*, 2002). Hal ini tidak sesuai dengan pengamatan yang telah dilakukan, dimana tanaman yang telah diberi perlakuan mempunyai karakter kuantitatif yang relatif lebih kecil daripada tanaman kontrol.

Hasil isolasi DNA mempunyai kualitas dan kuantitas pola pita yang berbeda-beda. Pada hasil elektroforesis menunjukkan bahwa pita DNA terlihat *smear* (terkontaminasi). Adanya *smear* menurut Mulyani *et al.* (2011), bisa terjadi akibat dari sisa-sisa larutan yang masih terbawa selama isolasi DNA atau juga berupa DNA yang terdegradasi pada proses isolasi. Kemurnian DNA dapat dilihat dengan menggunakan alat spektrofotometer Perbandingan nilai absorbansi dari DNA dengan panjang gelombang 260 dan 280 akan menunjukkan tingkat kemurnian DNA yang didapat. Hasil spektrofotometer mempunyai nilai rasio yang berbeda-beda berkisar antara 0.73 – 1.91. Molekul DNA

dapat dikatakan murni apabila nilai rasio berkisar antara 1.8 – 2.0. Nilai rasio yang didapat dari hasil isolasi DNA menunjukkan bahwa DNA yang dihasilkan masih terkontaminasi. Hanya DNA sampel pada tanaman S1M10 53 dengan nilai rasio 1.91 dapat dikatakan sudah memenuhi syarat untuk analisis molekuler, sedangkan DNA sampel lainnya masih terkontaminasi oleh protein atau bahan organik karena nilai rasio yang dihasilkan lebih rendah. Rendahnya nilai rasio $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ (< 1.8) menunjukkan adanya kontaminasi protein dan bahan organik lainnya, sebaliknya tingginya nilai rasio yang didapat (> 2.0) menunjukkan adanya kontaminasi oleh fenol (Tenriulo, 2001).

Hasil amplifikasi dari 4 primer yang digunakan mempunyai hasil yang berbeda-beda (Tabel 3). Lokus dengan jumlah terbanyak pada hasil amplifikasi ISSR 1 dengan jumlah lokus DNA 22, sedangkan paling sedikit pada primer ISSR 2 dengan jumlah total lokus DNA 10. Perbedaan jumlah pita DNA yang muncul dari masing-masing primer karena perbedaan dari urutan basa dari primer dan nada atau tidaknya variasi dalam genotip tertentu (Widiastuti *et al.*, 2013). Jumlah lokus DNA dipengaruhi oleh sebaran situs yang

Tabel 3 Jumlah Pita, Ukuran Pita, Total Pita Polimorfism dan Monomorfism Serta Nilai PIC dari 4 Primer ISSR pada Diversitas 19 Tanaman Jeruk

	Ukuran Lokus (bp)	Total Polimorfism	Total Monomorfism	Total Lokus	Nilai PIC (%)
ISSR 1 (CA) 8RT	250 - 2000	18	4	22	94,7
ISSR 2 (CA) 8AC	483 - 1500	5	5	10	87,6
ISSR 3 (AG) 8C	285 - 2000	13	8	21	94,8
ISSR 4 (GA) 8YG	250 - 2000	8	6	14	93
Total		44	23	67	

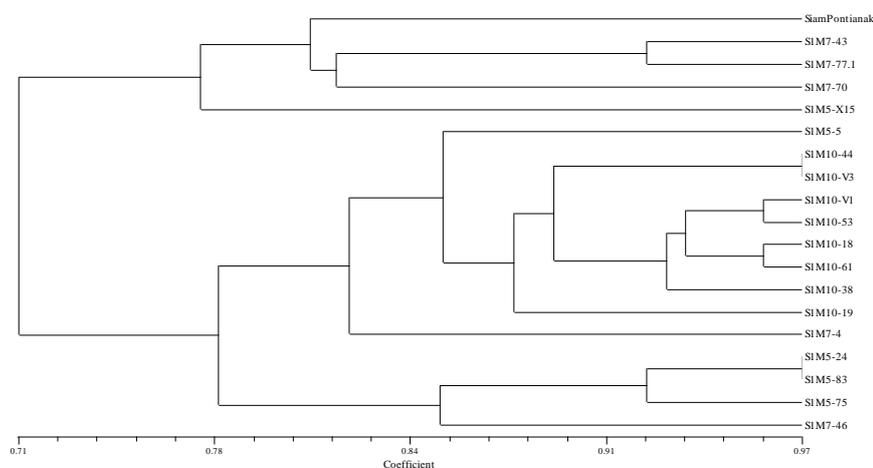
homolog dengan sekuen primer. Nilai PIC digunakan untuk mengetahui marka yang dapat membedakan antar tanaman (Mulsanti, 2013). Nilai ini ditentukan oleh frekuensi kemunculan alel pada setiap marka. Hasil nilai PIC tertinggi dari ke 4 primer ISSR yang digunakan pada primer ISSR 3 (94.8%) terendah pada primer ISSR 2 (87.6%). Semakin tinggi hasil pita DNA yang berhasil diamplifikasi oleh marka semakin tinggi pula nilai PIC yang didapat. Sesuai dengan pernyataan Mulsanti (2013), semakin banyak alel yang dihasilkan semakin tinggi nilai PIC yang didapat. Nilai PIC yang didapat dapat dikategorikan sangat informatif karena nilainya >50% (Botstein *et al.*, 1980). Polimorfis yang tinggi menunjukkan bahwa variasi genotip yang dianalisis cukup tinggi, sehingga 4 primer yang digunakan dapat dikatakan sangat informatif untuk analisa molekuler.

Amplifikasi DNA dari 4 primer ISSR yang digunakan, terdapat keragaman DNA dari 19 tanaman yang dianalisis. Hal ini ditunjukkan pada nilai keragaman antar tanaman. Keragaman tanaman dapat dilihat dari jumlah pita, ketebalan pita maupun mobilitasnya (Cahyarini *et al.*, 2004). Pita DNA yang dihasilkan oleh ke 4 primer mempunyai ketebalan dan jumlah pita yang berbeda-beda.

Pada primer ISSR 1 menghasilkan jumlah lokus terbanyak 22 lokus berkisar pada 250 – 2000bp, sedangkan jumlah lokus terendah pada primer ISSR 2 dengan jumlah 10 lokus pada ukuran 483 – 1500bp. Primer yang menghasilkan tingkat polimorfism tinggi yaitu pada primer ISSR dengan jumlah pita polimorfis 18, terendah pada primer ISSR 2 yaitu 5 pita polimorfism. Adanya polimorfis yang

teramplifikasi menunjukkan adanya keragaman antar tanaman.

Hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR 1 didapatkan 22 lokus dengan 18 pita polimorfis. 18 pita polimorfism ini menunjukkan keragaman yang ditunjukkan oleh primer ISSR 1. Pada lokus 13 dengan besar pita berkisar 752 bp, hanya dimiliki oleh tanaman dengan kode tanaman S1M5 dan S1M10 serta dua tanaman S1M7 43 dan S1M74, sedangkan pada tanaman kontrol jeruk Siam Pontianak, S1M7 46, S1M777.1, dan S1M7 70 tidak terdapat pita DNA yang sama. Amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR 2 menghasilkan lokus sebanyak 9 dengan pita polimorfism 4. Pada lokus 3 pita DNA dengan ukuran berkisar 916 bp dan lokus 5 pita DNA berukuran 700 bp hanya terdapat pada tanaman semua tanaman S1M5 dan S1M10 serta tanaman S1M7 43, sedangkan pada tanaman kontrol jeruk Siam Pontianak dan tanaman S1M7 46, S1M777.1, S1M7 70 dan S1M7 4. Lokus 4 dengan ukuran pita DNA berkisar 750 bp hanya terdapat pada tanaman kontrol jeruk Siam Pontianak, S1M7 46, S1M7 77.1, dan S1M7 70, sedangkan tidak terdapat pita DNA pada semua tanaman S1M5 dan S1M10, serta tanaman S1M7 43 dan S1M7 4. Primer ISSR 3 menghasilkan 22 lokus dengan 14 pita polimorfism. Pada lokus 16 hasil amplifikasi primer ISSR 3 dengan kisaran pita DNA berukuran 500 bp hanya terdapat pada semua tanaman S1M5 dan S1M10 serta tanaman S1M7 46. Amplifikasi yang dihasilkan oleh primer ISSR 4 terdapat 14 lokus dengan 8 pita polimorfism. Terdapat 2 lokus yang tidak terdapat pada beberapa tanaman tertentu. Lokus itu ialah lokus 8 (750 bp) dan lokus 11 (500 bp). Pada lokus 8 hanya tidak



Gambar 3 Dendrogram keragaman 19 tanaman jeruk hasil aplikasi kolkhisin, berdasarkan 4 Primer ISSR.

terdapat pada kontrol jeruk Siam cv. Pontianak, S1M5 5, S1M5 X15, S1M7 43, S1M77.1, S1M7 70, dan S1M10 19, sedangkan pada lokus 11 hanya tidak terdapat pada tanaman kontrol jeruk Siam Pontianak, S1M5 X15, S1M7 43, S1M77.1, dan S1M7 70.

DNA spesifik yang ditimbulkan dari masing-masing primer menunjukkan karakter penciri dari perlakuan tanaman yang diberikan. Salah satu dari DNA spesifik hasil amplifikasi 4 primer ISSR diduga sebagai DNA yang menunjukkan karakter morfologi sayap daun. Karena karakter sayap daun menjadi salah satu karakter penciri yang membedakan antara tanaman jeruk Siam Pontianak dengan tanaman jeruk hasil aplikasi kolkhisin. Seperti polimorfism tinggi yaitu pada primer ISSR dengan jumlah pita polimorfis 18, terendah pada primer ISSR 2 yaitu 5 pita polimorfism. Adanya polimorfis yang teramplifikasi menunjukkan adanya keragaman antar tanaman.

Hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR 1 didapatkan 22 lokus dengan 18 pita polimorfis. 18 pita polimorfism ini menunjukkan keragaman yang ditunjukkan oleh primer ISSR 1. Pada lokus 13 dengan besar pita berkisar 752 bp, hanya dimiliki oleh tanaman dengan kode tanaman S1M5 dan S1M10 serta dua tanaman S1M7 43 dan S1M74, sedangkan pada tanaman kontrol jeruk Siam

Pontianak, S1M7 46, S1M777.1, dan S1M7 70 tidak terdapat pita DNA pada semua tanaman S1M5 dan S1M10, serta tanaman S1M7 43 dan S1M7 4. Primer ISSR 3 menghasilkan 22 lokus dengan 14 pita polimorfism. Pada lokus 16 hasil amplifikasi primer ISSR 3 dengan kisaran pita DNA berukuran 500 bp hanya terdapat pada semua tanaman S1M5 dan S1M10 serta tanaman S1M7 46. Amplifikasi yang dihasilkan oleh primer ISSR 4 terdapat 14 lokus dengan 8 pita polimorfism. Terdapat 2 lokus yang tidak terdapat pada beberapa tanaman tertentu. Lokus itu ialah lokus 8 (750 bp) dan lokus 11 (500 bp). Pada lokus 8 hanya tidak terdapat pada kontrol jeruk Siam cv. Pontianak, S1M5 5, S1M5 X15, S1M7 43, S1M77.1, S1M7 70, dan S1M10 19, sedangkan pada lokus 11 hanya tidak terdapat pada tanaman kontrol jeruk Siam Pontianak, S1M5 X15, S1M7 43, S1M77.1, dan S1M7 70.

DNA yang sama. Amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR 2 menghasilkan lokus sebanyak 9 dengan pita polimorfism 4. Pada lokus 3 pita DNA dengan ukuran berkisar 916 bp dan lokus 5 pita DNA berukuran 700 bp hanya terdapat pada tanaman semua tanaman S1M5 dan S1M10 serta tanaman S1M7 43, sedangkan pada tanaman kontrol jeruk Siam Pontianak dan tanaman S1M7 46, S1M77.1, S1M7 70 dan S1M7 4. Lokus 4 dengan ukuran pita DNA berkisar 750 bp hanya terdapat pada

tanaman kontrol jeruk Siam Pontianak, S1M7 46, S1M7 77.1, dan S1M7 70, sedangkan tidak terdapat pita yang dijelaskan oleh Karsinah *et al.*, (2002) pita-pita DNA spesifik yang dihasilkan dapat memberikan harapan sebagai identifikasi tanaman. Pita-pita spesifik yang membedakan antara tanaman induk jeruk Siam Pontianak dengan tanaman jeruk hasil aplikasi kolkhisin diduga karena adanya mutasi akibat dari pemberian kolkhisin. Seperti yang dijelaskan oleh Sulistyarningsih *et al.*, (2004), bahwa kolkhisin ialah salah satu reagen penyebab terjadinya mutasi pada tanaman.

Dendogram dari hasil amplifikasi 4 primer ISSR terdapat 2 kelompok besar dengan jarak genetik sebesar 71% (Gambar 3). Pada dendogram terlihat terdapat beberapa tanaman yang mengelompokkan dengan perlakuan yang sama. Pengelompokan ini dimungkinkan bahwa pita DNA yang dihasilkan oleh amplifikasi primer ISSR sama pada perlakuan tanaman yang sama, sehingga terjadi suatu pengelompokan. Menurut Karsinah *et al.*, (2002), menjelaskan bahwa pita DNA yang dihasilkan adalah nukleotida primer dengan nukleotida genom tanaman. Pengelompokan beberapa tanaman yang terlihat pada dendogram menunjukkan adanya perbedaan tanaman satu dengan yang lain, sehingga menimbulkan keragaman. Keragaman ini ditimbulkan karena adanya mutasi, sebab mutasi tanaman akan menambah keragaman tanaman. Seperti yang dijelaskan oleh Martasari (2008), bahwa penambahan kolkhisin dapat memperbaiki varietas dan menambah keragaman tanaman.

KESIMPULAN

Secara morfologi keragaman tanaman ditunjukkan pada dendogram dengan jarak genetik 68.3% secara molekuler 71%. Perbedaan karakteristik tanaman hasil aplikasi kolkhisin pada tanaman jeruk Siam cv. Pontianak ditunjukkan pada karakter bentuk daun. Secara molekuler diperoleh 18, 5, 13 dan 8 pita polimorfis yang dihasilkan oleh 4 primer ISSR yang digunakan. Primer ISSR yang

digunakan sangat informatif karena nilai dari PIC>50%.

DAFTAR PUSTAKA

- Agisimanto, D., C. Martasari dan A. Supriyanto. 2006.** Perbedaan Primer RAPD dan ISSR dalam Identifikasi Hubungan Kekerabatan Genetik Jeruk Siam (*Citrus suhuniensis* L. Tan) Indonesia. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika. *J. Horticultura*. 17(2):101 – 110.
- Anonim. 2014.** Indikator Pertanian Tahun 2014 Provinsi Jawa Timur. Badan Pusat Statistika Jawa Timur: Surabaya.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, dan R. David. 1980.** Construction of Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphism. *Am. J. Human Gene*. 32(3): 314 – 331.
- Cahyarini, R. D., A. Yusuf dan E. Purwantoro. 2004.** Identifikasi Keragaman Genetik Beberapa Varietas Lokal Kedelai di Jawa Berdasarkan Analisis Isoenzim. *J. Agrosains* 6(2): 79 – 83.
- Dedi, M. A. L. T., Eva S.B dan Luthfi A.M.S. 2013.** Identifikasi Karakter Morfologi Dalam Penyusunan Deskripsi Jeruk Siam (*Citrus nobilis*) Di Beberapa Daerah Kabupten Karo. USU: Medan. *J. Online Agroekoteknologi*. 1(2): 72 – 85.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *J. Focus*. 12(1):13–15.
- Handayani, T., S. Sastrosumarjo, D. Sopandie, Suharsono dan A. Setiawan. 2006.** Analisis Marka Morfologi dan Molekuler Sifat Ketahanan Kedelai Terhadap Intensitas Cahaya Rendah. *J. Sains dan Teknologi Indonesia*. 1(8):43 – 50.
- Karsinah, S. , L. Styobudi, dan H. Aswidinoor. 2002.** Keragaman Genetik Plasma Nutfah Jeruk Berdasarkan Analisis Penanda

- RAPD, *J. Bioteknologi Pertanian* 7(1): 8 – 16.
- Kurniasih, S., Rubiyo, A. Setiawan, A. Purwantara dan Sudarsono. 2011.** Analisis Keragaman Genetik Plsma Nutfah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Berdasarkan Marka SSR. *J. Littri* 17(4): 156 – 162.
- Martasari, C. 2008.** Variasi Jumlah Kloroplas dan Kromosom Tanaman Jeruk Siam Ponianak Hasil Perlakuan Colchisin. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika Batu Jawa Timur.
- Mulyani, Y., A. Purwanto, dan I. Nurruhwati. 2011.** Perbandingan Beberapa Metode Isolasi DNA untuk Deteksi Dini Koi Herpes Virus (KHV) Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). *J. Akuatika*. 2(1): 1 – 16.
- Nasir, M. 2001.** Bioteknologi Molekuler Teknik Rekayasa Genetik Tanaman. Bandung. Citra Aditya Bakti.
- Scarano, M. T., L. Abbate, S. Ferrante, S. Lucretti, and N. Tusa. 2002.** ISSR-PCR Technique: A Useful Method for Characterizing New Allotetraploid Somatic Hybrids of Mandarin. *J. Plant Cell Reports*. 20(12):1162 – 1166.
- Sleper, D., Allen and J. M. Poehlman. 2006.** Breeding Field Crops. Blackwell Publisher. Iowa: 424.
- Soenarsih, S. D. A. S., Sudarsono, H. M. H. B. Djoefrie, dan Y. A. Wahyu. E. K. 2012.** Keragaman Spesies Pala (*Myristica* spp.) Maluku Utara Berdasarkan Penanda Morfologi dan Agronomi. Universitas Khairun Ternate. *J. Littri*. 18(1): 1 – 9.
- Sokal, R.R. dan J.F. Rohlf. 1992.** Pengantar Biostatistika. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Sudarmi. 2013.** Penanda Biologi Molekuler Pada Pemuliaan Tanaman. Fakultas Pertanian Universitas Veteran Bangun Nusantara Sukoharjo. *J. Magistra*. 84(25): 75 – 80.
- Sulistyaningsih, R., ZA Suryanto, dan A. E. Noer. 2004.** Peningkatan Kualitas Anggrek *Dendrobium* Hibrida dengan Pemberian Kolkisin. *J. Ilmu Pertanian* 11(1):13 – 21.
- Suminah., Sutarno, dan A. D. Setyawan. 2002.** Induksi Poliploidi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) dengan Pemberian Kolkisin. Surakarta. *J. Biodiversitas*. 3(1): 174 – 180.
- Suratman., D. Priyanto, dan A. D Setyawan. 2000.** Analisis Keragaman Genus *Ipomea* Berdasarkan Karakter Morfologi. Surakarta. *J. Biodiversitas*. 1(2): 72 – 79.
- Suryatini , K. Y. 2011.** Analisis Keragaman Genetik Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Dengan Metode *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). Thesis Program Megister Studi Bioteknologi Pertanian. Universitas Udayana Denpasar.
- Tenriulo, A., E. Suryati, A. Parenrengi, dan Rosmiat. 2001.** Ekstraksi DNA Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* Dengan Metode Fenol Kloroform. *J Mar. Chim Acta*. 2(2): 6 – 10.
- Widiastuti, A., Sobir dan Muh. R. Suhartanto. 2013.** Analisis Keragaman Genetik Manggis (*Garcinia mangostana*) Diiradiasi dengan Sinar Gamma Berdasarkan Penanda ISSR. *J. Bioteknologi*. 10(1): 15 – 22.