

OPTIMASI ENZIM RETRIKSI (ECORI, HINDIII, TASI) DALAM METODE CAPS (CLEAVED AMPLIFIED POLYMORPHICS SEQUENCE) DENGAN MENGGUNAKAN MARKA MTSSR UNTUK IDENTIFIKASI GENETIK POPULASI JERUK F1 HASIL FUSI PROTOPLASMA

OPTIMIZATION OF RESTRICTION ENZYMES (ECORI, HINDIII, TASI) IN CAPS METHODS (CLEAVED AMPLIFIED POLYMORPHICS SEQUENCE) BY USING MTSSR MARKER TO IDENTIFY POPULATION GENETICS OF ORANGE AS F1 GENERATION FROM PROTOPLASM FUSION

Erlangga Setyawan^{*1)}, Chaerani Martasari²⁾, Ainurrasjid¹⁾, Nur Basuki¹⁾

¹⁾Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya
Jln. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia

²⁾Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Sub Tropik

Jln. Raya Tlekung, Kec. Junrejo, Batu 65327, Jawa Timur, Indonesia

^{*)}E-mail : setyawan.erlangga@gmail.com

ABSTRAK

Marka molekuler merupakan alat efektif untuk mendeteksi keberhasilan hasil fusi protoplasma antara jeruk siam madu dan satsuma mandarin berdasarkan variasi genetik, yang tidak dipengaruhi lingkungan. Sehingga metode ini digunakan untuk mendeteksi adanya variasi mitokondria pada tanaman hasil fusi protoplasma menggunakan metode CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphism Sequences*) dengan dibantu enzim restriksi (*ecoRI*, *hindIII*, dan *tasI*). Analisis efektifitas waktu inkubasi mempengaruhi hasil informasi genetik yang didapatkan, oleh karena itu diperlukan percobaan untuk analisis efektifitas dari waktu inkubasi. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi kombinasi dari primer dan enzim restriksi yang paling tepat berdasarkan waktu inkubasi tertentu yang memunculkan frekuensi pola fragmen yang polimorfis pada tanaman sampel baik parentalnya maupun F1 hasil fusi protoplasmanya berdasarkan penanda molekuler mitokondria (mtSSR) dengan metode CAPS. Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Juni 2013 di laboratorium pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO) Tlekung, Kecamatan Junrejo, Kota Batu. Penelitian menggunakan metode kualitatif dengan menganalisis hasil visualisasi DNA tanaman yang diberi perlakuan. Parameter

yang diamati meliputi waktu inkubasi, jumlah dari frekuensi band yang polimorfis berdasarkan tipe enzim restriksi dan tipe primer, informasi, identifikasi penurunan sifat berdasarkan visualisasi DNA parental dan F1 hasil fusi protoplasma. Hasil terbaik adalah kombinasi antara enzim restriksi *tasI* dengan primer *18S_rRNA_F/R* dan primer *nad 1 exon C/B*, hal ini dikarenakan konsistensinya memunculkan pola fragmen DNA sampel dengan baik pada kedua pasangan primer pada perlakuan T1(3 jam) dan T2(6 jam), hasil analisis visualisasi antara tanaman parental dan F1 jeruk menunjukkan bahwa pola fragmen DNA mitokondria tanaman parental identik dengan fragmen DNA mitokondria tanaman F1 jeruk hasil fusi protoplasma.

Kata kunci : enzim restriksi, marka molekuler, metode CAPS, jeruk

ABSTRACT

Molecular markers is an effective tool for detecting genetic variation of plants based on results of protoplasm fusion between siam madu and satsuma mandarin, which is'nt influenced by environment. Hence this method used to detect presence of mitochondrial variation in plant protoplasm fusion results using CAPS assisted by restriction enzymes (*ecoRI*, *hindIII*, and *tasI*). Analysis effectiveness of incubation

time affect results of genetic information obtained, therefore we need a trial to analyze effectiveness of incubation time. This study aimed to obtain information from combination of primers and most appropriate restriction enzymes based on certain incubation period influence to frequency of polymorphic fragment patterns on plant sample both parental and F1 protoplasm fusion based on molecular markers of mitochondria (mtSSR) by CAPS methods. The experiment was conducted at April-June 2013 on Plant Breeding laboratory breeding Balai Penelitian Jeruk and buah Sub tropika (BALITJESTRO) Tlekung, District Junrejo, Batu. The study uses qualitative methods to analyze results of visualization of plants DNA. Parameters is incubation time, number of bands frequencies based on type of polymorphic restriction enzyme and primer type, information, identification of inheritance based on DNA visualization and F1 parental protoplasm fusion results. The best combination is combination of restriction enzymes *tasI* with primer *18S_rRNA_F / R* and *nad 1 exon C/B*, because consistency led to presence of DNA fragment patterns of samples with good primers on both partners in treatment T1(3 hours) and T2 (6 hours), pattern of mitochondrial DNA fragments identic to parental plant mitochondrial DNA fragment F1 plants citrus fusion results protoplasm.

Keywords : retrictions enzymes, moleculer marker, CAPS methods, orange

PENDAHULUAN

Jeruk ialah tanaman buah komersial terpenting di dunia, dan dapat tumbuh pada wilayah subtropik maupun tropis. Buah jeruk menjadi peringkat pertama dalam pasar buah internasional (Food and Agriculture Organization of the United Nations Annual Statistics, 2003 dalam Chen *et al.*, 2007). Indonesia termasuk Negara pengimpor jeruk terbesar kedua di ASEAN setelah Malaysia, dengan volume impor khususnya jeruk manis sebesar 127.041 ton selama kurun waktu 2005 – 2009 dengan rata-rata per tahun mencapai 25.408 ton. Sedangkan

untuk jenis keprok atau mandarin, selama kurun waktu 2005 – 2009 mencapai 504.063 ton atau sekitar 100.813 ton per tahun (BPS, 2010).

Peningkatan impor buah jeruk merupakan suatu indikator belum mampunya jeruk lokal bersaing dengan jeruk impor baik dalam kualitas maupun kuantitas. Salah satu jenis jeruk lokal komersial yang memiliki potensi tinggi adalah jeruk Siam Madu. jeruk siam ini memiliki karakter kulit buah tipis, berwarna kuning, rasa manis, kandungan jus tinggi dan mampu beradaptasi pada dataran rendah dan tinggi. Namun untuk menjadikan jeruk Siam Madu sebagai jeruk yang mampu bersaing dengan jeruk impor diperlukan perbaikan terhadap kualitasnya terutama pada karakter jumlah biji. Jeruk Siam Madu memiliki jumlah biji yang cukup tinggi yaitu antara 10-15 biji per buah.

Perbaikan kualitas biji jeruk Siam Madu dapat dilakukan dengan memindahkan sifat tanpa biji (*seedless*) dari jeruk lain. Salah satu jenis jeruk yang memiliki sifat *seedless* adalah Mandarin Satsuma. Jeruk Mandarin Satsuma memiliki karakter kuat yaitu tanpa biji yang disebabkan polennya yang steril (*Male Steril – MS*) dan diketahui dikendalikan oleh gen yang berada pada sitoplasmanya (*Cytoplasmic Male Sterility – CMS*). Berdasarkan fakta tersebut, pemindahan sifat *seedless* dari Mandarin Satsuma tidak dapat dilakukan melalui persilangan biasa, tetapi dapat dilakukan melalui teknologi fusi protoplasma (hibridisasi somatik).

Identifikasi dan karakterisasi merupakan bagian dari seleksi dan sangat penting dilakukan setelah tanaman hasil pemuliaan diperoleh. Pada tanaman hasil fusi protoplasma (fusan), seleksi awal sangat diperlukan untuk mengetahui keberhasilan fusi protoplasma yang dilakukan. Secara genetik, tanaman fusan memiliki perbedaan dengan tanaman hasil persilangan seksual karena memiliki berbagai kemungkinan diantaranya ialah adanya perpindahan/transfer, pencampuran/mixing, dan penggabungan ulang/recombination genom dan sitoplasma (Olivares-Fuster *et al.*, 2007).

Interaksi genom inti DNA inti–itoplasma (DNA mitokondria dan kloroplas) dua tetua dan senyawa yang dihasilkan dari interaksi tersebut dapat memberikan efek yang nyata pada pertumbuhan, perkembangan dan performa tanaman fusan. Telah diketahui bahwa genom sitoplasma mengontrol beberapa ciri agronomis tanaman seperti tinggi tanaman, diameter batang, besar daun dan jumlah biji.

Banyak studi tentang interaksi genom inti-sitoplasma tergantung kepada informasi rinci komposisi persilangan somatik (fusi protoplasma) melalui marka pengamatan morfologi, sitologi, dan genetik. Namun untuk mengerti interaksi antara inti-inti, inti-sitoplasma, dan sitoplasma-sitoplasma antara kedua fusi parental, penggunaan marka genetik atau molekuler lebih tepat.

Marka molekuler ialah alat yang efektif karena deteksinya berdasarkan variasi genetic, yang tidak dipengaruhi lingkungan (Pabendon *et al.*, 2005).

Penanda molekuler merupakan teknik yang efektif dalam analisis genetik dan telah diaplikasikan secara luas dalam program pemuliaan tanaman. Penanda biokimia seperti isozim dan storage protein merupakan produk ekspresi gen yang telah diaplikasikan untuk identifikasi bibit hasil perkecambahan biji dan studi hubungan kekerabatan antar gene dan antar spesies pada tanaman jeruk. Walaupun demikian, penggunaan penanda biokimia mempunyai keterbatasan, yaitu umur tanaman berpengaruh terhadap pola pita yang dihasilkan. Disamping itu, penanda biokimia menghasilkan polimorfisme yang terbatas, sehingga sulit untuk membedakan kultivar yang berkerabat dekat (Karsinah *et al.*, 2002; Pabendon, 2004).

Analisis molekuler dapat juga menjadi kondusif untuk korelasi fenotipik atau ciri spesifik dengan komposisi nuklear dan sitoplasmik dari hibrid yang baru (Guo *et al.*, 2008). Untuk analisis molekuler tersebut, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) dan RFLP (*Restriction Fragment length Polymorphism*) telah digunakan secara luas (Moreira *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2002), tetapi sejak perkembangan penanda molekuler yang lebih efisien dan sederhana

seperti SSR (*Simple Sequence Repeat*), CAPS dan kloroplas SSR (cpSSR), identifikasi hasil fusi dapat dilakukan dengan lebih mudah dan cepat. Marka CAPS telah banyak dimanfaatkan dalam proses verifikasi dan identifikasi tanaman fusan jeruk (Guo *et al.*, 2008).

Marka CAPS merupakan marka dalam metode gabungan antara RFLP dengan PCR. Metode ini dilaporkan telah berhasil digunakan untuk analisa DNA mitokondria (mtDNA) tanaman fusan jeruk oleh beberapa peneliti (Guo *et al.*, 2008). Cai *et al.* (2009) lebih jauh melaporkan metode CAPS dengan primer universal untuk identifikasi mtDNA berhasil menunjukkan adanya perbedaan band antara tetua dan tanaman fusan.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi kombinasi dari primer dan enzim restriksi yang paling tepat berdasarkan waktu inkubasi tertentu yang memunculkan frekuensi pola fragmen yang polimorfis pada tanaman sampel baik parentalnya maupun F1 hasil fusi protoplasmanya berdasarkan penanda molekuler mitokondria (mtSSR) dengan metode CAPS.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai dengan Juni 2013 di laboratorium pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO) Tlekung, Kecamatan Junrejo, Kota Batu.

DNA yang telah diekstraksi berasal dari tanaman siam madu (*Citrus nobillis* L.) dan satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) sebagai tanaman parental dan 61 tanaman jeruk F1 hasil fusi protoplasma.

Pasangan primer universal yang digunakan untuk genom mitokondria yaitu *nad1exonB/nad1exonC* dengan basa nitrogen (forward: 5'n-GCA TTA CGA TCT GCA GCT CA-3', reverse: 5'-GGA GCT CGA TTA GTT TCT GC-3') dan *18S_rRNA_F/18S_rRNA_R* dengan basa nitrogen (forward: 5'n-GTG TTG CTG AGA CAT GCG CC-3', reverse: 5'-ATA TGG CGC AAG ACG ATT CC-3') sesuai dengan

yang dideskripsikan oleh Cheng *et al.*, (2003).

Bahan yang digunakan untuk melakukan amplifikasi PCR (40 μ l) terdiri dari 16 μ l Dream taq Green PCR master mix (Thermo Scientific), 5 μ l untuk masing-masing primer, 100 ng DNA sampel, dan 6 μ l larutan ddH₂O. Reaksi PCR dilakukan di dalam DNA thermocycler(model PTC-100; MJ Research), yang telah diprogram untuk denaturasi awal 4 min pada 94°C, kemudian 30 siklus terdiri dari denaturasi 30 s pada 94°C, annealing 45 s pada 50°C sampai 65°C, elongasi 90 s pada 72°C, dan untuk langkah terakhir elongasi 3 min pada 72°C kemudian pendinginan 10 min pada 4°C.

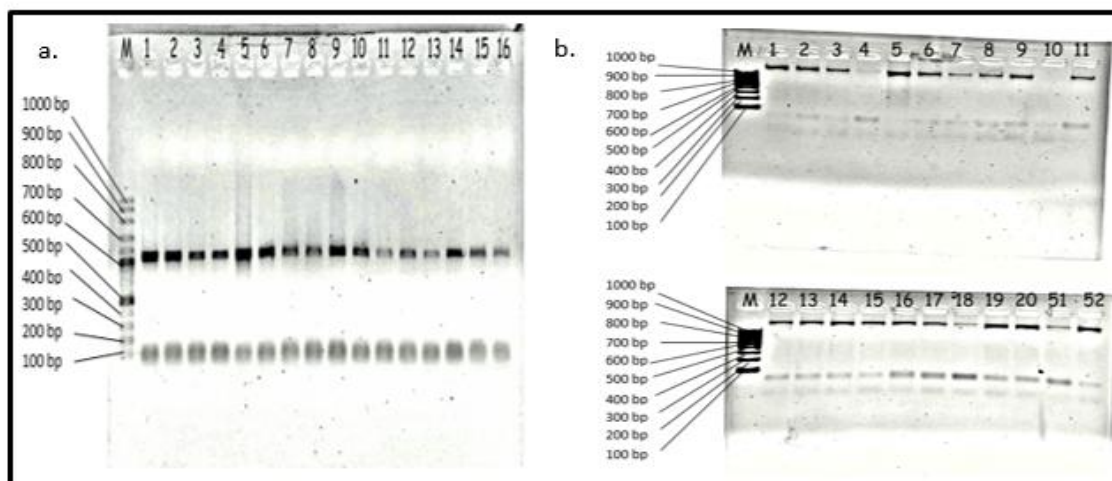
Fragmen DNA yang sudah diamplifikasi, dipotong (*digest*) dengan menggunakan enzim restriksi (*ecoRI*, *hindIII*, dan *tasI*)(Thermo scientific), larutan terakhir berjumlah total 5 μ l terdiri dari 10 x buffer spesifik (Thermo scientific) untuk setiap enzim restriksi, 1 μ l enzim restriksi, 3 μ l produk amplifikasi kemudian direaksikan pada 4 waktu perlakuan perendaman, T1(3 jam), T2(6 jam), T3(9 jam), dan T4(12 jam) pada suhu 37°C.

Analisis DNA fragmen menggunakan elektroforesis dalam 1%

agarose gel pada TBE 1x selama 60 min, kemudian divisualisasikan pada Biodoc Analyze setelah ditetaskan dengan ethidium bromide (3 μ g.ml⁻¹). Ukuran dari fragmen DNA diestimasi dengan perbandingan menggunakan DNA ladder 1kb (Vivantis atau Promega).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total DNA genom diekstraksi dari 63 sampel tanaman hasil fusi F1 dan tanaman parentalnya. DNA diekstraksi dari daun yang paling muda dengan menggunakan metode CTAB (Doyle dan Doyle, 1990). Total DNA hasil isolasi DNA selanjutnya digunakan untuk uji kualitas. Uji kualitas DNA sampel digunakan untuk mengamati ketersediaan DNA pada DNA bank dan menghitung jumlah DNA yang terbentuk. DNA yang dibutuhkan selama penelitian ini tergantung pada jumlah DNA bank setelah uji kualitas, secara umum digunakan 100 ng DNA sampel per 100 μ l ddH₂O. Ukuran dari DNA diestimasi dengan perbandingan menggunakan lambda (λ) 5 uL yang berisikan DNA sebesar 2286 ng, sedangkan lambda (λ) 10 uL yang berisikan DNA sebesar 4572 ng (Promega).



Gambar 1 Elektroforegram hasil optimasi kombinasi DNA tanaman sampel jeruk hasil fusi
Keterangan : a = Pasangan primer 18S_rRNA_F/R nomor sampel 1-20, b = pasangan primer nad 1 exon C/B nomor sampel 1-20.

Primer mitokondria digunakan pada proses amplifikasi dengan cara membandingkan dengan basa nitrogen dari primer. Pasangan primer universal yang digunakan untuk genom mitokondria yaitu *nad1exonB/nad1exonC* dan *18S_rRNA_F/18S_rRNA_R* sesuai dengan yang dideskripsikan oleh Cheng *et al.*, (2003).

Pada Gambar 1, primer *18S_rRNA_5S_rRNA F/R* mengamplifikasi DNA tanaman fusan sampel nomor 1(FS 31) teramplifikasi dengan ukuran basa 600 bp; 2(FS 74) teramplifikasi dengan ukuran basa 600 bp; 3(FS 12) teramplifikasi dengan ukuran basa 600 bp; 4(FS 75) teramplifikasi dengan ukuran basa 600 bp; 5(FS 105) dan 13(FS 31) teramplifikasi dengan ukuran basa 600 bp; 6(FS 70) dan 14(FS 96) teramplifikasi dengan ukuran basa 650 bp; 7(FS 100) teramplifikasi dengan ukuran basa 670 bp; 8(FS 15) teramplifikasi dengan ukuran basa 640 bp; 9(FS 90) teramplifikasi dengan ukuran basa 680 bp; 10(FS 101) teramplifikasi dengan ukuran basa 700 bp; 11(FS 3) teramplifikasi dengan ukuran basa 640 bp; 12(FS 13) teramplifikasi dengan ukuran basa 640 bp; 15(FS 49) teramplifikasi dengan ukuran basa 700 bp; 16(FS 71) teramplifikasi dengan ukuran basa 700 bp.

Pada Gambar 1, primer *nad 1 exon C/B* mengamplifikasi DNA tanaman fusan sampel nomor 1(FS 31), 2(FS 74), 3(FS 12), 12(FS 13), 13(FS 31), 14(FS 96), 15(FS 49), 16(FS 71) dan 17(FS 57) teramplifikasi pada ukuran basa 1000 bp, sedangkan 4(FS 75) teramplifikasi dengan ukuran basa 970 bp; 5(FS 105) teramplifikasi dengan ukuran basa 980 bp; 6(FS 70) dan 21(FS 79) teramplifikasi dengan ukuran basa 970 bp; 7(FS 100) teramplifikasi dengan ukuran basa 960 bp; 8(FS 15) teramplifikasi dengan ukuran basa

960 bp; 9(FS 90) dan 22(FS 56) teramplifikasi dengan ukuran basa 950 bp; 10(FS 101) gagal memperlihatkan basa nitrogen; 11(FS 3) teramplifikasi dengan ukuran basa 900 bp; 18(FS 69) teramplifikasi dengan ukuran basa 989 bp; 19(FS 77) teramplifikasi dengan ukuran basa 980 bp; 20(FS 86) teramplifikasi dengan ukuran basa 950 bp. Analisis CAPS pada proses PCR menggunakan primer *18 S_rRNA_5SrRNA F/R* dan primer *nad 1 exon C&B* tidak menunjukkan adanya perbedaan pita DNA (monofomis). Seluruh tanaman teramplifikasi oleh primer *18 S_rRNA_5SrRNA F/R* pada posisi ukuran basa 600-700 bp. Primer *nad 1 exon C&B* mengamplifikasi seluruh tanaman pada ukuran basa 900-1000 bp.

Optimasi dilakukan untuk mengetahui waktu paling efektif untuk inkubasi kombinasi antara primer universal, DNA sampel dan enzim restriksi. Optimasi tahap pertama ditujukan pada DNA sampel tanaman parental yaitu nomor 51(siam madu) dan 52(satsuma mandarin) sesuai dengan (Tabel 1).

Hasil analisis elektroforegram optimasi enzim restriksi pada metode CAPS tanaman indukan Siam Madu dan Satsuma mandarin pada (Tabel 2), menunjukkan bahwa waktu inkubasi terbaik ditunjukkan pada perlakuan T1(3jam), dikarenakan fragmen DNA antara kombinasi DNA dengan enzim restriksi *TasI* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan (polimorfis). Seluruh fragmen pada indukan Siam Madu dan Satsuma Mandarin dengan kombinasi antara primer *18 S_rRNA_5SrRNA F/R* dengan enzim restriksi *TasI*, terpotong (*digest*) pada ukuran basa 450 dan 550 bp. Kombinasi primer *nad 1 exon C&B* dengan enzim restriksi, terpotong (*digest*) pada ukuran basa 300 dan 700 bp.

Tabel 1 Waktu optimasi dan perlakuan

Kode Perlakuan	Jam Perlakuan	Waktu Optimasi
T0	0 Jam	07.30-09.47
T1	3 Jam	09.47-12.47
T2	6 Jam	09.47-15.47
T3	9 Jam	09.47-18.47
T4	12 Jam	09.47-09.47 (8 April 2013)

Keterangan : Optimasi dilakukan selama 2 hari berturut-turut.

Optimasi untuk mendapatkan waktu yang paling efektif untuk enzim restriksi memotong kombinasi primer universal dan DNA parental dilakukan, maka selanjutnya adalah mengaplikasikan hasil optimasi untuk digunakan pada kombinasi DNA tanaman jeruk fusi F1 dan primer universal. Kombinasi pasangan enzim dengan primer universal yang digunakan adalah *18S_rRNA_F&R/TasI* dan *nad1exonB&C/TasI* yang teruji sangat efektif pada perlakuan T1(3jam).

Hasil analisis elektroforegram optimasi tanaman fusan dibandingkan dengan tanaman indukan Siam Madu dan Satsuma mandarin berdasarkan Gambar 2 dari foto UV light dari kombinasi pasangan primer universal dan enzim restriksi. Hasil dari analisis menunjukkan bahwa perbedaan antara DNA tetua dan DNA tanaman jeruk hasil fusi secara garis besar tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, namun pada beberapa lokasi pada DNA sampel tanaman hasil fusi terdapat perbedaan yang sangat signifikan jika dibandingkan berdasarkan jumlah fragmen yang terbentuk.

Kombinasi antara DNA F1 dengan primer *nad 1 exon C&B* dan enzim restriksi *tasI*. Berdasarkan dari segi ukuran fragmen pada sebagian besar perbandingan antara DNA tanaman parental dengan DNA tanaman jeruk hasil fusi tidak menunjukkan perbedaan yang terlalu jauh sekitar 300-700 bp. Untuk jumlah fragmen per kode individu sampel sebagian besar memiliki 2 fragmen, namun terdapat kode individu sampel yang tidak memiliki fragmen yaitu kode sampel nomor 4(FS 75), 10(FS 101), 18(FS 69), 32(FS 14), 40(FS 41), 41(FS 27), 43(FS 21), 44(FS 54), 49(FS 25) dan 50(FS 23), sedangkan untuk kombinasi antara DNA F1 dengan primer *18 S_rRNA_5SrRNA F/R* dan enzim restriksi *TasI*. Berdasarkan dari segi ukuran fragmen pada sebagian besar perbandingan antara DNA tanaman parental dengan DNA tanaman jeruk hasil fusi tidak menunjukkan perbedaan yang terlalu jauh sekitar 450-550 bp, namun pada beberapa DNA sampel terdapat suatu perbedaan yang cukup signifikan yaitu dengan ukuran fragmen 500 bp dan 1000 bp pada DNA fragmen nomor 18(FS 69), 19(FS 77) dan 25(FS 89).

Tabel 2 Kehadiran fragmen serta ukuran fragmen DNA parental Siam Madu dan Satsuma Mandarin setelah dilakukan optimasi perendaman enzim restriksi, dikombinasikan dengan 2 pasangan primer universal mitokondria

Perlakuan Primer	T1		T2		T3		T4	
	SM	ST	SM	ST	SM	ST	SM	ST
18S_rRNA_F/R+ <i>ecoRI</i>	√(800)	0	√(850)	0	√(800)	0	0	0
	0	√(950)	0	√(850)	0	√(850)	0	0
nad 1 exon C/B+ <i>ecoRI</i>	√(900)	0	√(900)	0	√(900)	0	√(550)	√(450)
	0	√(1000)	0	√(900)	0	√(950)	√(550)	0
18S_rRNA_F/R+ <i>hindIII</i>	√(950)	0	√(900)	0	√(800)	0	√(800)	0
	0	√(950)	0	√(950)	0	0	0	√(800)
nad 1 exon C/B+ <i>hindIII</i>	√(700)	√(700)	√(700)	√(700)	√(700)	√(700)	0	0
	√(300)	√(300)	√(300)	√(300)	√(300)	√(300)	0	0
18S_rRNA_F/R+ <i>tasI</i>	√(550)	√(550)	√(550)	√(550)	0	0	0	0
	√(450)	√(450)	√(450)	√(450)	0	0	0	0
nad 1 exon C/B+ <i>tasI</i>	√(650)	√(650)	√(650)	√(650)	0	0	0	0
	√(350)	√(350)	√(350)	√(350)	√(350)	0	0	0

Keterangan : √ = Teridentifikasi adanya fragmen DNA, 0 = Tidak teridentifikasi adanya fragmen DNA

SM = Parental Siam Madu, ST = Parental Satsuma Mandarin, T1 = Perlakuan 3 jam perendaman, T2 = Perlakuan 6 jam perendaman, T3 = Perlakuan 9 jam perendaman, T4 = Perlakuan 12 jam perendaman (dalam satuan bp = basepair).

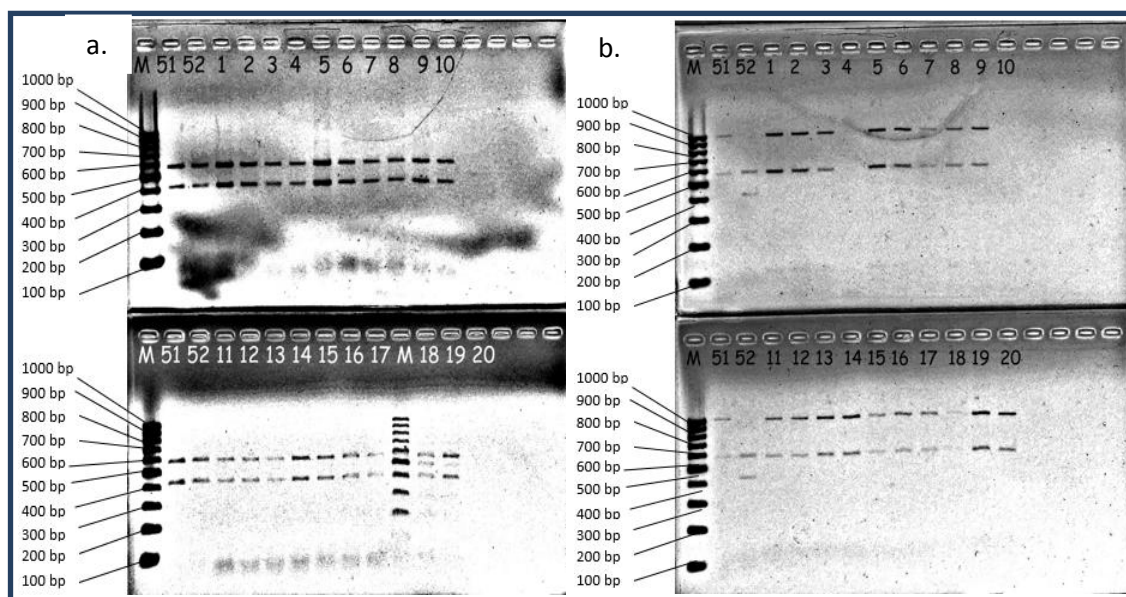
Untuk jumlah fragmen per kode individu sampel sebagian besar memiliki 2 fragmen namun pada kode individu 18(FS 69), 19(FS 77) dan 25(FS 89) memiliki 3 fragmen, namun terdapat kode individu sampel yang tidak memiliki fragmen yaitu kode sampel nomor 41(FS 27), 43(FS 21), 49(FS 11) dan 50(FS 50). Hasil analisis gambar 2 menunjukkan perbandingan antara DNA F1 dengan DNA parental yang telah dikombinasikan dengan primer *18 S_rRNA_5SrRNA F/R*, *nad 1 exon C/B* dan enzim restriksi *TasI*. Berdasarkan pola fragmen pada sebagian besar perbandingan antara DNA tanaman parental dengan DNA tanaman jeruk hasil fusi untuk kombinasi primer *18 S_rRNA_5SrRNA F/R* tidak menunjukkan perbedaan, namun pada beberapa DNA sampel dari fusan menunjukkan perbedaan yang cukup signifikan yaitu pada DNA fragmen nomor 18(FS 69), 19(FS 77) dan 25(FS 89). Untuk pola fragmen per kode individu sampel antara DNA F1 dengan DNA parental sebagian besar memiliki 2 fragmen namun pada kode individu DNA F1 nomor 18(FS 69), 19(FS 77) dan 25(FS 89) memiliki 3 fragmen atau lebih, di samping itu terdapat kode individu sampel yang tidak memiliki fragmen yaitu kode sampel nomor 41(FS 27), 43(FS 21), 49(FS 11) dan 50(FS 50). Berdasarkan pola fragmen pada sebagian besar perbandingan antara DNA tanaman parental dengan DNA tanaman jeruk hasil fusi untuk kombinasi primer *nad 1 exon C/B* tidak menunjukkan perbedaan. Untuk jumlah fragmen per kode individu sampel sebagian besar memiliki 2 fragmen, namun terdapat kode individu sampel yang tidak memiliki fragmen yaitu kode sampel nomor 4(FS 75), 10(FS 101), 18(FS 69), 32(FS 14), 40(FS 41), 41(FS 27), 43(FS 21), 44(FS 54), 49(FS 25) dan 50(FS 23).

Beberapa catatan mendasar bahwa setelah proses PCR, primer universal hanya mengamplifikasi basa nitrogen pada DNA sampel sesuai dengan basa nitrogen yang

dimiliki oleh pasangan primer universal untuk mtDNA yaitu *nad1exonB/nad1exonC* dengan basa nitrogen (forward: 5'n-GCA TTA CGA TCT GCA GCT CA-3', reverse: 5'-GGA GCT CGA TTA GTT TCT GC-3') dan *18S_rRNA_F/18S_rRNA_R* dengan basa nitrogen (forward: 5'n-GTG TTG CTG AGA CAT GCG CC-3', reverse: 5'-ATA TGG CGC AAG CC ATT CC-3') sesuai dengan yang dideskripsikan oleh Cheng *et al.*, (2003). Kemudian ketika dalam proses pemotongan (*digest*) dengan enzim restriksi, basa nitrogen hasil amplifikasi dari primer universal dilakukan pembacaan dan pemotongan kembali sesuai dengan sequens basa nitrogen dari masing-masing enzim restriksi. Untuk enzim restriksi *ecoRI* memiliki basa nitrogen G AATTC yang memotong pada awalan dari akhiran yang sesuai dengan basa nitrogen yang dimiliki oleh setiap enzim restriksi yang digunakan. Untuk enzim restriksi *hindIII* memiliki basa nitrogen A AGCTT, sedangkan untuk enzim restriksi *tasI* memiliki basa nitrogen T CGA (Anonymous., 2013).

Metode analisis CAPS merupakan metode yang dilakukan untuk mengidentifikasi pewarisan sitoplasmik pada hibrid somatik pada tanaman tingkat tinggi dan telah terbukti sangat efisien (Cheng *et al.*, 2003). Sifat tanpa biji adalah salah satu dari fokus penting dalam pemuliaan tanaman jeruk. Hingga saat ini, banyak tanaman jeruk yang memiliki sifat tanpa biji telah diproduksi dengan berbagai teknik pemuliaan konvensional.

Pewarisan gen mtDNA bukan merupakan fokus utama dari penelitian ini, walaupun pada penelitian sebelumnya bahwa terdapat pewarisan genetik mtDNA pada setiap tanaman hibrid somatik (Motomura *et al.*, 1995), penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa hampir sebagian besar tanaman tetraploid yang dikembangkan, hanya memiliki satu mtDNA dari salah satu pasangan tetua (Cai *et al.*, 2007).



Gambar 2 Elektrofogram hasil optimasi kombinasi DNA tanaman sampel jeruk hasil fusi
Keterangan : a = Pasangan primer 18S_rRNA_F/R nomor sampel 1-20, b = pasangan primer nad 1 exon C/B nomor sampel 1-20

Di Indonesia, metode CAPS merupakan metode yang sangat baru untuk digunakan dalam analisis molekuler. Penelitian ini setidaknya dapat menjadi pondasi pertama untuk penelitian analisis molekuler selanjutnya. Metode CAPS sangat efektif dan efisien untuk digunakan pada penelitian pewarisan gen mtDNA. Melalui kombinasi waktu dan primer universal/enzim restriksi, dapat menjadi suatu acuan dasar untuk perkembangan analisis molekuler metode CAPS.

KESIMPULAN

Hasil analisis penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi antara enzim restriksi *ecoRI* dengan primer *18S_rRNA_F/R* maupun dikombinasikan dengan primer *nad 1 exon C/B* terbukti tidak dapat memunculkan adanya kehadiran pola fragmen pada DNA sampel pada semua tingkat waktu perlakuan. Kombinasi antara enzim restriksi *hindIII* dengan primer *18S_rRNA_F/R* terbukti tidak dapat memunculkan adanya kehadiran pola fragmen pada DNA sampel pada semua tingkat waktu perlakuan, sedangkan ketika dikombinasikan dengan primer *nad 1 exon*

C/B terdapat kehadiran pola fragmen pada DNA sampel pada tingkat waktu perlakuan T1(3jam), T2(6jam) dan T3(9jam), sedangkan kombinasi paling baik ialah kombinasi antara enzim restriksi *tasI* dengan primer *18S_rRNA_F/R* dan primer *nad 1 exon C/B*, hal ini dikarenakan konsistensinya memunculkan kehadiran pola fragmen DNA sampel dengan baik pada kedua pasangan primers, kemudian hasil analisis dari gambar 1 dan 2 menunjukkan bahwa pola fragmen DNA mitokondria tanaman parental identik dengan fragmen DNA mitokondria tanaman F1 jeruk hasil fusi protoplasma.

UCAPAN TERIMAKASIH

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO) Tlekung, Kecamatan Junrejo, Kota Batu.

DAFTAR PUSTAKA

Badan Pusat Statistik. 2010. Produksi, dan Produktivitas Tanaman Jeruk, 2008. www.bps.go.id. Diakses tanggal 20 November 2013.

- Cai, X. D., Fu, J., X. Deng and W, Guo. 2007.** Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile satsuma mandarin and two seedy Citrus cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 90:275-283.
- Cai, X., Fu, J., C, Chen and W, Guo. 2009.** Cybrid/hybrid plants regenerated from somatic fusions between male sterile Satsuma mandarin and seedy tangelos. *Sci. Hort.* 122:323-327.
- Chen, C., K. D. Bowman, Y. A. Choi, P. M. Dang, M, N. Rao, S. Huang, J. R. Soneji, T. G. McCollum and F. G. Gmitter Jr. 2007.** EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes.* 1-10.
- Cheng, Y. J., W. W. Guo and X. X. Deng. 2003.** Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) + Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. *Plant Cell Rep.* 21:445-451.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Guo, W. W., R. C. Wu, G. E. Fan and Y. J. Cheng. 2008.** Analysis of mitochondrial genomes in Citrus interspecific somatic hybrids produced by protoplast fusion. *Bot. Studies.* 49:295-300.
- Karsinah, Sudarsono, L. Setyobudi, dan H. Aswidinnoor. 2002.** Keragaman genetic plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. *J. Bioteknologi Pertanian.* 7(1)8-16.
- Motomura, T., Hidaka, T., Moriguchi, T., Akihama, T dan Omura, M. 1995.** Intergeneric somatic hybrids between Citrus and Atalantia or Serverinia by electrofusion and recombination of mitochondrial genomes. *Breed. Sci.* 45: 309-314.
- Olivares-Fuster O., M. Hernandez-Garrido, J. Guerr and L. Navarro. 2007.** Plant somatic hybrid cytoplasmic DNA characterization by single-strand conformation polymorphism. *Tree Physiology.* 27:785-792.
- Pabendon M. B. 2004.** Pemanfaatan marka molekuler untuk identifikasi varietas tanaman dalam bidang pemuliaan tanaman. *Makalah pribadi falsafah sains.* IPB. 1-11.
- Pabendon, M. B., M. J. Mejaya dan M. Dahlan. 2005.** Sidik jar empat varietas jagung hibrida beserta tetuanya berdasarkan marka mikrosatelit. *Zuriat.* 16(2):192-201.
- Vivantis. 2013.** Katalog Pengenalan Produk. Vivantis Inc.