

IDENTIFIKASI WARNA KULIT BUAH 14 AKSESI F₁ JERUK (*Citrus sp*) TERSELEKSI DENGAN MARKA MOLEKULER

IDENTIFICATION OF FRUIT SKIN COLOR OF 14 SELECTED F₁ CITRUS (*Citrus sp*) ACCESIONS BASED ON MOLECULER MARKER

Devita Aprilia Wati^{1*)}, Chaireni Martasari²⁾, Niken Kendarini¹⁾ dan Darmawan Saptadi¹⁾

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

²⁾Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika
 Jl. Raya Tlekung No. 1 Junrejo, Batu 65301 Jawa Timur, Indonesia

^{*)}E-mail: devita.apriliaw@gmail.com

ABSTRAK

Jeruk siam banyak diminati oleh konsumen domestik karena rasanya yang manis, namun belum dapat diperuntukkan sebagai komoditas ekspor karena penampilan kulit buah kurang menarik. Balitjestro telah berhasil melakukan persilangan tanaman jeruk secara konvensional dan terseleksi secara morfologi sebanyak 6 aksesori warna kulit buah kuning. Warna kulit buah jeruk dipengaruhi enzim karotenoid. Seleksi berdasarkan morfologi masih dipengaruhi oleh faktor lingkungan sehingga diperlukan identifikasi karakter secara genetik. Salah satu teknologi pemuliaan yang dapat diterapkan adalah dengan seleksi marka molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi warna kulit buah orange pada 6 aksesori tanaman F₁ jeruk berdasarkan marka molekuler. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika. Bahan yang digunakan adalah 6 aksesori Jeruk Siam hasil persilangan (B1, B2, B3, D1, D2, E1) dan tetua yaitu Siam Madu, Keprok Satsuma, Siam Mamuju, Siam Pontianak dan Soe serta menggunakan 6 primer yaitu PSY2, PDS, LCYB Cit, LCYE Cit, CHYB Cit dan ZEP. Hasil identifikasi menunjukkan hanya aksesori E1 yang memiliki seluruh gen penyandi enzim karotenoid sedangkan 5 aksesori F₁ (B1, B2, B3, D1, dan D2) hanya sebagian.

Kata kunci: Jeruk Siam, Seleksi, Aksesori, Marka Molekuler, Karotenoid

ABSTRACT

Tangerine demand by domestic consumers because it tastes sweet, but cant be designated as commodity exports due to less attractive appearance of the fruit skin. Balitjestro has been successfully performed in the conventional plant breeding orange and morphologically selected as 6 accession yellow fruit skin color. Skin color orange carotenoid enzyme is affected. Selection is based on morphology was influenced by environmental factors necessitating identification of genetic character. One breeding technologies that can be applied is the molecular marker selection. This study aims to identify the color of orange rind on 6 accession orange F₁ plants based on molecular markers. Research conducted at the Laboratory of Plant Breeding Research Institute for Citrus and Subtropical Fruit. Materials used are 6 accessions Orange Siam from crosses (B1, B2, B3, D1, D2, E1) and elders Siam Honey, Keprok Satsuma, Siam Mamuju, Siam Pontianak and Soe and using 6 primer is PSY2, PDS, LCYB Cit, LCYE Cit, CHYB Cit and ZEP. Results showed that only accession E1 identification which has all the genes encoding enzymes of carotenoid and 5 accession F₁ (B1, B2, B3, D1, and D2) only partially.

Keywords: Tangerine, Selection, Accesion, Molecular markers, Carotenoids

PENDAHULUAN

Jeruk Siam (*Citrus nobilis*) merupakan jeruk yang diminati oleh konsumen domestik karena rasanya yang manis, namun belum dapat diperuntukkan sebagai komoditas ekspor karena penampilan kulit buah kurang menarik. Perbaikan kualitas jeruk siam diperlukan untuk mendorong potensi jeruk Siam sebagai komoditas ekspor. Warna kulit buah jeruk dibentuk oleh enzim karotenoid pada tanaman. Karotenoid berperan dalam pembentukan kualitas dan warna kulit buah pada jeruk (Matsumoto *et al.*, 2009). Pada tahapan biosintesis DNA diperlukan gen tertentu untuk mengetahui jenis karotenoid yang ditemukan dalam buah jeruk (Matsumoto *et al.*, 2009).

Gen yang digunakan untuk menyandi enzim dalam metabolisme karotenoid adalah PSY2, PDS, LCYB Cit, LCYE Cit, CHYB Cit, dan ZEP (Gambar 1). Proses biosintesis karotenoid ini penting diketahui karena terkait dengan jalur pembentukan pigmen warna pada kulit buah jeruk (Bramley2007,). Pigmen yang paling kuat

akan memberikan warna dominan pada tanaman.

Sejak tahun 2006 Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) telah melakukan persilangan secara konvensional terhadap jeruk Siam. Hasil persilangan telah terseleksi secara morfologi sebanyak 6 aksesori dengan warna kulit buah kuning dan rasa manis. Seleksi berdasarkan morfologi masih dipengaruhi oleh faktor lingkungan sehingga diperlukan identifikasi karakter pada 6 aksesori secara genetik.

Salah satu teknologi pemuliaan yang dapat diterapkan untuk mengetahui karakter tanaman jeruk yang memiliki penampilan kulit menarik adalah dengan menggunakan seleksi marka molekuler. Marka molekuler mampu melakukan pelacakan sifat-sifat tanaman berdasarkan DNA yang dimiliki tanaman. Seleksi dengan bantuan marka molekuler didasarkan pada sifat genetik tanaman sehingga tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Smith dan Smith 1992).

Identifikasi terhadap aksesori 6 aksesori F₁ jeruk melalui seleksi molekuler dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan gen-gen penyandi enzim karotenoid.



Gambar 1 Jalur biosintesis karotenoid pada jeruk (Xu Wei *et al.*, 2014)

Masing-masing gen penyandi enzim karotenoid berperan dalam mengatur ekspresi warna kulit buah. Tujuan penelitian terhadap 6 aksesori F₁ hasil persilangan agar dapat teridentifikasi berdasarkan genotip yang menyandi pembentukan enzim karotenoid.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juni 2015 di Laboratorium Pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No.1 Junrejo, Batu, Jawa Timur. Tanaman yang digunakan ialah 6 aksesori Jeruk Siam hasil persilangan Siam Madu X Satsuma (B1, B2, B3); Siam Mamuju X Satsuma (D1, D2); dan Siam Pontianak X Soe (E1) yang telah terseleksi berdasarkan karakter warna kulit buah kuning. Selain itu digunakan 5 tetua sebagai pembanding yaitu Siam Madu, Keprok Satsuma, Siam Mamuju, Siam Pontianak dan Soe. Tanaman jeruk F₁ yang digunakan telah berumur 7 tahun.

Analisa molekuler terdiri dari beberapa tahapan yaitu ekstraksi DNA menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990), pengukuran kualitas DNA, amplifikasi DNA dengan PCR, dan evaluasi DNA hasil amplifikasi. Pengambilan data morfologi secara sekunder juga dilakukan pada warna kulit buah jeruk (Tabel 1).

Teknik amplifikasi DNA menggunakan primer SNP dengan modifikasi kondisi PCR sesuai dengan temperatur primer masing-masing. Primer yang digunakan merupakan primer spesifik penyandi enzim karotenoid yaitu PSY2, PDS, LCYB Cit, LCYE Cit, CHYB Cit dan ZEP. Hasil visualisasi PCR dianalisis secara deskriptif dengan membaca ukuran pita DNA. Ukuran DNA yang teramplifikasi dibaca dengan menggunakan standar DNA ladder 1 kb.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel DNA yang digunakan untuk ekstraksi adalah daun jeruk yang masih muda dengan menggunakan

metode Doyle dan Doyle (1990). Berdasarkan hasil uji kuantitatif dengan menggunakan elektroforesis dan dibaca menggunakan Biodoc Analyzer diperoleh konsentrasi DNA antara 228,6 µg/ml hingga 914,4. Menurut Sambrook (1989), kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan dalam analisis molekuler.

Pengambilan data morfologi tanaman untuk warna kulit buah jeruk dilakukan untuk perbandingan secara genotip hasil amplifikasi DNA aksesori F₁ dengan fenotip dari aksesori F₁ jeruk (Tabel 1). Pengamatan data morfologi tersebut mengacu pada *International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR)* (1989) pada tanaman jeruk.

Tabel 1 Deskripsi Morfologi 6 Aksesori

Kode Aksesori	Warna Kulit / RHS
B1	Kuning / 9B
B2	Kuning Orange / 14A
B3	Kuning / 12 C
D1	Kuning Kehijauan / 1C
D2	Kuning Kehijauan / 4B
E1	Kuning Orange / 17A

Keterangan: RHS (*Royal Horticultural Society*) Colour Chart.

Hasil amplifikasi DNA dari lima sampel jeruk tetua dan aksesori F₁ Siam Madu X Satsuma menggunakan enam primer. Analisis biosintesis karotenoid pada jeruk Siam Madu dan Satsuma teramplifikasi oleh gen karotenoid pembentuk enzim fitoen (PSY 2), enzim fitofluen (PDS), likopen (LCYB Cit), β-karoten (CHYB Cit) Zeaxanthin (ZEP). Primer LCYE Cit yang diujikan hanya mampu teramplifikasi pada tetua Satsuma (Tabel 2). Aksesori B1 mampu teramplifikasi oleh primer PSY 2, LCYB Cit, LCYE Cit, dan ZEP. Aksesori B2 teramplifikasi oleh primer PSY 2, LCYB Cit, CHYB Cit, dan ZEP. Aksesori B3 teramplifikasi oleh primer PSY 2, LCYB Cit, CHYB Cit (Gambar 2).

Hasil skoring pita amplifikasi pada persilangan Siam Mamuju X Satsuma menggunakan enam primer untuk mengamplifikasi sebanyak empat sampel jeruk tetua dan aksesori F₁ (D1 dan D2) menunjukkan bahwa tidak semua primer

mampu mengamplifikasi DNA. Berdasarkan hasil amplifikasi terhadap kedua tetua diketahui bahwa primer PSY 2, LCYB Cit, CHYB Cit, dan ZEP yang mampu mengamplifikasi DNA. Aksesori D1 teramplifikasi oleh primer LCYB Cit, LCYE Cit, CHYB Cit dan ZEP (Tabel 3). Aksesori D2 hanya teramplifikasi oleh primer PSY2, LCYB Cit, LCYE Cit dan ZEP (Gambar 3).

Analisis data hasil skoring pita amplifikasi pada tiga sampel yaitu Siam Pontianak, Soe, dan aksesori E1 menggunakan enam primer yaitu PSY 2, PDS, LCYB Cit, LCYE Cit, CHYB Cit, dan ZEP (Gambar 4). Siam Pontianak teramplifikasi oleh primer PSY 2, PDS, LCYB Cit, CHYB Cit dan ZEP. Jeruk Soe mampu diamplifikasi oleh primer PSY 2,

LCYB Cit, CHYB Cit dan ZEP. Aksesori E1 teramplifikasi oleh primer PSY 2, PDS, LCYB Cit, LCYE Cit), CHYB Cit dan ZEP (Tabel 4).

Masing-masing primer memiliki kemampuan yang berbeda dalam mengamplifikasi tetua dan aksesori F₁. Kemampuan primer yang beragam menunjukkan bahwa adanya gen penyandi enzim karotenoid yang bervariasi pada masing-masing aksesori F₁. Primer yang tidak mampu mengamplifikasi DNA dapat disebabkan karena tidak terdapat sekuen komplementer pada DNA genom atau hanya ada satu untai yang mengandung sekuen komplementer.

Tabel 2 Hasil Skoring Pita DNA Siam Madu X Satsuma

Primer	Siam Madu	Satsuma	B1	B2	B3
PSY 2	425 bp	425 bp	425 bp	425 bp	425 bp
PDS	500 bp	625 bp 375 bp 250 bp	1000 bp	0	0
LCYB Cit	350 bp	350 bp	350 bp	350 bp	350 bp
LCYE Cit	0	1500 bp	350 bp	0	0
CHYB Cit	400 bp	400 bp	0	400 bp	400 bp
ZEP	1000 bp	1000 bp 750 bp	1000 bp	1000 bp	0

Keterangan: bp (*base pair*).

Tabel 3 Hasil Skoring Pita DNA Mamuju X Satsuma

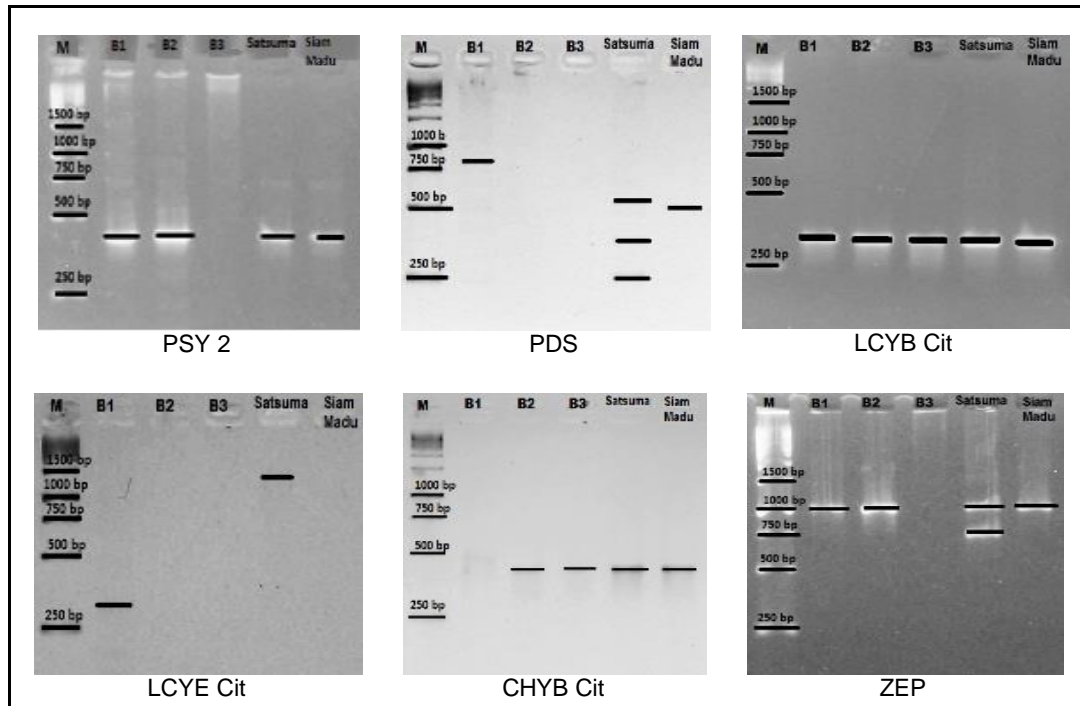
Primer	Mamuju	Satsuma	D1	D2
PSY 2	425 bp	425 bp	0	425 bp
PDS	0	0	0	0
LCYB Cit	350 bp	350 bp	350 bp	350 bp
LCYE Cit	0	0	325 bp	325 bp
CHYB Cit	425 bp	425 bp	425 bp	0
ZEP	1000 bp	1000 bp 750 bp	1000 bp	1000 bp

Keterangan: bp (*base pair*).

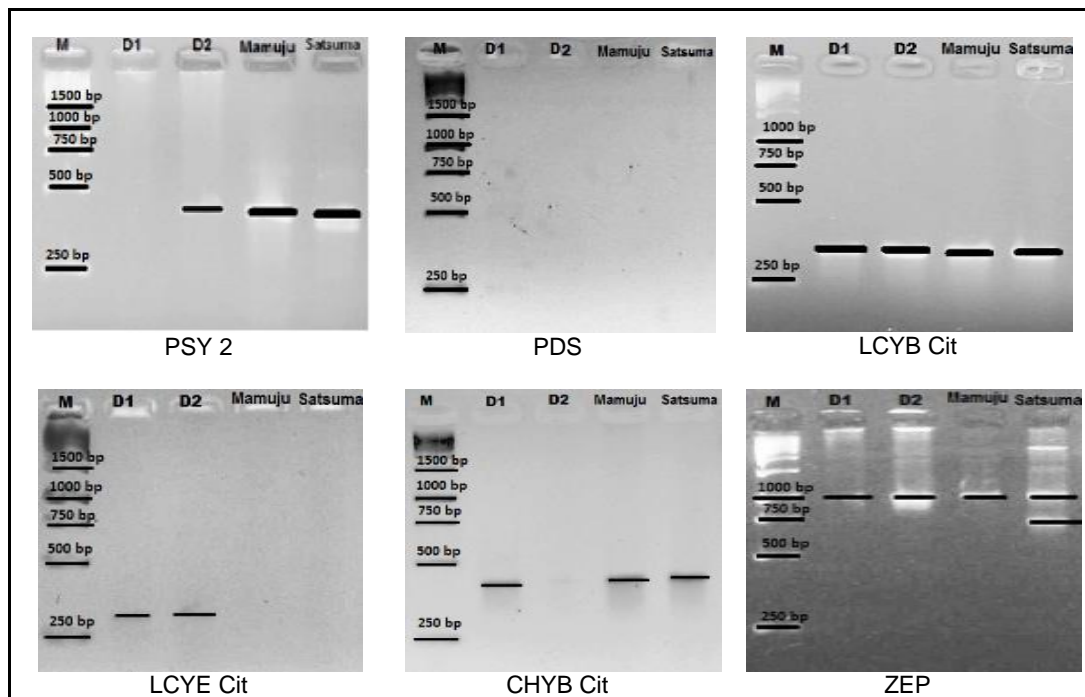
Tabel 4 Hasil Skoring Pita DNA Pontianak X Soe

Primer	Pontianak	Soe	E1
PSY 2	425 bp	425 bp	425 bp
PDS	675 bp	0	675 bp
LCYB Cit	350 bp	350 bp	350 bp
LCYE Cit	0	0	325 bp
CHYB Cit	425 bp	425 bp	425 bp
ZEP	1000 bp	1000 bp	1000 bp

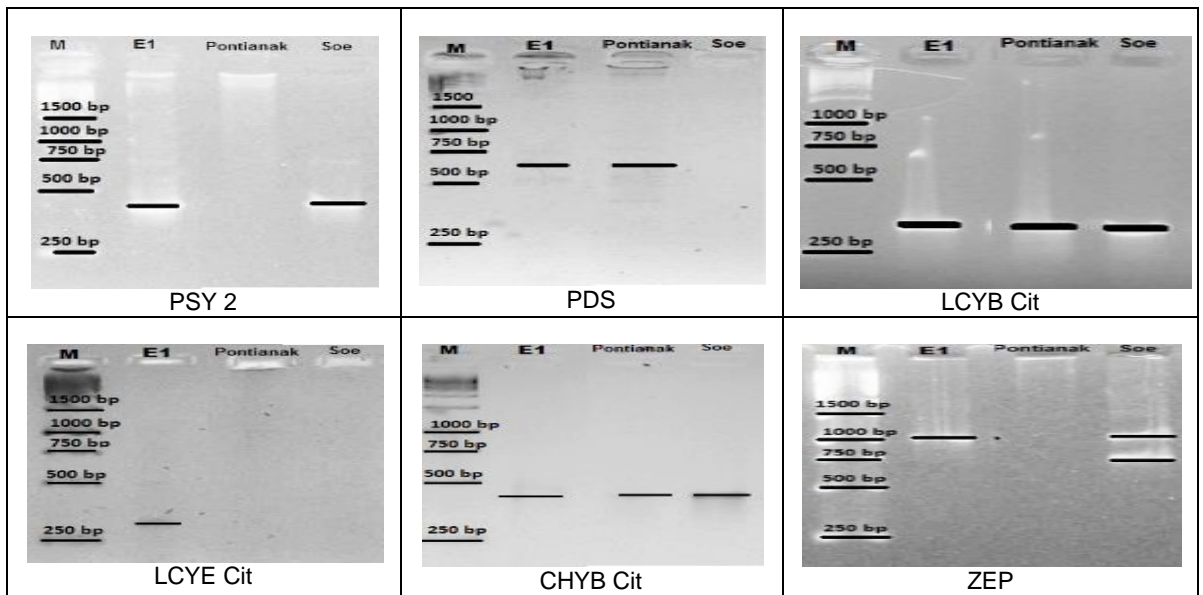
Keterangan: bp (*base pair*).



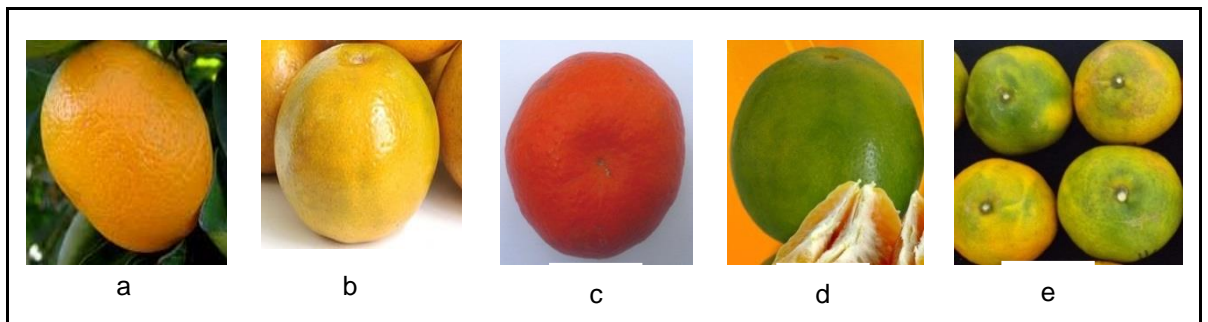
Gambar 2 Elektroforegram Siam Madu X Satsuma



Gambar 3 Elektroforegram Mamuju X Satsuma

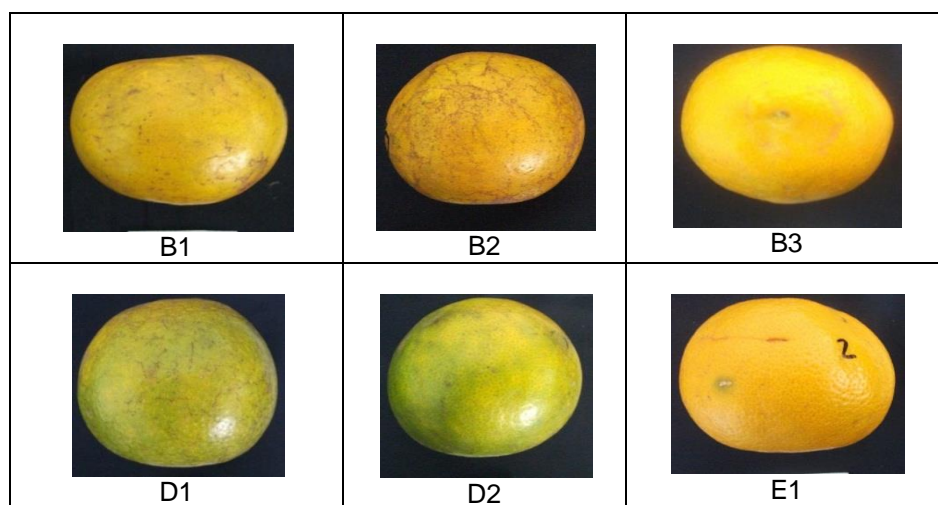


Gambar 4 Elektroforegram Jeruk Pontianak X Soe



Gambar 5 Warna kulit buah tetua tanaman jeruk (Martasari *et al.*, 2014)

Keterangan : a. Keпок Satsuma, b. Siam Madu, c. Soe, d. Siam Mamuju, d. Siam Pontianak



Gambar 6 Warna Kulit Buah Jeruk Aksesii F₁ hasil (Martasari *et al.*, 2015)

Menurut William (1990), salah satu syarat utama terjadinya amplifikasi DNA adalah jika primer tersebut mempunyai urutan basa nukleotida yang komplementer dengan kedua untai DNA.

Jalur biosintesis karotenoid pada buah jeruk perlu dimiliki oleh aksesori - aksesori F₁ hasil persilangan untuk membuktikan jika aksesori F₁ secara genetik mampu terekspresi sesuai dengan warna orange (Cunningham dan Gantt, 1998). Gen PSY 2 dan PDS merupakan gen awal yang mempengaruhi warna kulit buah yang akan terekspresi menjadi orange sehingga masih belum memiliki pigmen warna tertentu. Pada siklus biosintesis pembentukan likopen berkaitan dengan dua gen yang mempengaruhi yaitu LCYB Cit dan LCYE Cit sehingga kedua gen tersebut memiliki warna yang kuning hingga kemerahan. Gen CHYB Cit dan ZEP berperan untuk mengendalikan warna orange pada kulit buah jeruk (Zhang *et al.*, 2011). Hasil amplifikasi tetua dan aksesori dibandingkan dengan fenotipnya untuk mengetahui relevansi secara genotip.

Fenotip Siam Madu mengekspresikan warna kulit buah kuning sedangkan Satsuma terekspresi pada warna kulit buah kuning-orange (Gambar 5). Perbandingan antara morfologi dan genetik pada Siam Madu dan Satsuma menunjukkan bahwa secara genetik telah relevan dengan warna kulit buah jeruk yang terekspresi.

Aksesori B1 memiliki gen pembentuk enzim fitoen (PSY 2), likopen (LCYB Cit), δ -karoten (LCYE Cit), dan zeaxanthin (ZEP). Hasil amplifikasi relevan terhadap warna kulit aksesori B1 yang terekspresi pada warna kulit kuning (Gambar 6). Aksesori B2 menunjukkan proses biosintesis karotenoid pembentuk enzim fitoen (PSY 2), likopen (LCYB Cit), β -karoten (CHYB Cit), dan zeaxanthin (ZEP). Ditinjau secara morfologi aksesori B2 telah relevan memiliki warna kulit buah kuning-orange. Aksesori B3 memiliki warna kulit kuning (Gambar 6) dan relevan dengan adanya gen pembentuk enzim fitoen (PSY 2), likopen (LCYB Cit), β -karoten (CHYB Cit). Urutan jalur biosintesis karotenoid yang sesuai dengan tahapan akan terekspresi dengan warna orange (Cunningham dan Gantt, 1998).

Aksesori D1 memiliki gen pembentuk enzim likopen (LCYB Cit), δ -karoten (LCYE Cit), β -karoten (CHYB Cit) dan zeaxanthin (ZEP). Hasil genotip aksesori D1 telah relevan dengan fenotip warna kulit buah jeruk pada aksesori D1 memiliki warna kuning-kehijauan. Aksesori D2 terlihat hanya teramplifikasi oleh primer PSY 2, LCYB Cit, LCYE Cit dan ZEP. Fenotip pada aksesori D2 terekspresi pada warna kulit kuning-kehijauan (Gambar 6). Ekspresi warna tersebut telah relevan dengan genotip yang dimiliki oleh aksesori D2.

Aksesori E1 menunjukkan adanya gen pembentuk enzim fitoen (PSY 2), fitofluen (PDS), likopen (LCYB Cit), δ -karoten (LCYE Cit), β -karoten (CHYB Cit) dan zeaxanthin (ZEP) (Tabel 4). Fenotip warna kulit buah yang diekspresikan oleh aksesori E1 berwarna kuning-orange. Fenotip yang ditunjukkan oleh aksesori E1 telah relevan dengan genotip yang dimiliki aksesori E1. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Kato (2004) yang menunjukkan adanya peningkatan simultan dalam ekspresi gen PSY, PDS, LCYB Cit, CHYB Cit, dan ZEP menyebabkan adanya akumulasi pada flavedo (bagian kulit) buah jeruk Valencia Orange.

Metode dengan teknik marka molekular dilakukan dengan cara mengidentifikasi tanaman atas dasar keberadaan sekuen DNA spesifik atau perbedaan kombinasi sekuen antar individu tanaman. Primer yang digunakan merupakan primer SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Keberhasilan amplifikasi DNA ditentukan oleh urutan basa primer yang digunakan. Primer SNP dapat digunakan secara efektif sebagai penanda karena perbedaan terjadi pada basa tunggal. Primer SNP yang digunakan dalam penelitian identifikasi karotenoid telah memberikan hasil amplifikasi yang baik. Hal ini ditandai oleh fragmen DNA yang terbentuk cukup jelas.

Penelitian yang telah dilakukan didapat DNA yang terlihat baik, tetapi ada beberapa yang mengalami kontaminasi glukosa dan protein. Peneliti perlu melakukan latihan beberapa kali ketika melakukan ekstraksi DNA agar mendapatkan hasil pengamatan yang baik

dan sesuai harapan. Teknik ekstraksi dan pelaksanaan prosedur PCR yang tepat serta kemampuan peneliti merupakan faktor yang mempengaruhi keberhasilan pengamatan.

KESIMPULAN

Hasil identifikasi molekuler untuk mengetahui jalur biosintesis terhadap 6 aksesori F₁ jeruk hasil persilangan Siam Madu X Satsuma; Siam Mamuju X Soe; dan Siam Pontianak X Soe menunjukkan adanya gen yang menyandi pembentukan enzim karotenoid. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa tidak munculnya seluruh gen penyandi karotenoid pada 5 aksesori F₁ (B1, B2, B3, D1, dan D2) telah relevan secara fenotip pada warna kulit buah jeruknya yang terespresi pada warna kuning kehijauan dan kuning. Terdapat satu aksesori F₁ yaitu E1 yang memiliki seluruh gen penyandi enzim karotenoid dan secara fenotip telah relevan memiliki warna kulit jeruk kuning orange.

DAFTAR PUSTAKA

- Bramley, P.M. 2007.** Regulation of Carotenoid Formation During Tomato Fruit Ripening and Development. *J Experimental Botany*. 53(377): 2107–2113.
- Cunningham, F.X., Jr., Pogson, B., Sun, Z.R., McDonald, K.A., DellaPenna D., Gantt, E. 1996.** Functional Analysis of the and Lycopene Cyclase Enzymes of Arabidopsis Reveals a Mechanism for Control of Cyclic Carotenoid Formation. *Plant Cell*. 9(8):1613–1626.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987.** A rapid DNA Isolation from Small Amount of Fresh Leaf Tissue. *Phytochem Bull*. 5(19):11-14.
- International Board of Plant Genetic Resources (IBPGR).1989.** Descriptors for Citrus. International Board for Plant Genetic Resources. Rome.
- Kato, M., Y. Ikoma, H. S. Matsumoto, H. Hyodoo and M. Yano. 2004.** Accumulation of carotenoids dan expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol*. 134(2): 824–837.
- Martasari C., H. Arisah dan H.M Yusuf. 2014.** Pemanfaatan Marka SSR dalam identifikasi tanaman zigotik F1 Jeruk. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika.
- Matsumoto H., Ikoma Y., Kato M., Nakajima N., and Hasegawa Y. 2009.** Effect of postharvest temperature dan ethylene on carotenoid accumulation in the flavedo dan juice sacs of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(11):4724-4732.
- Sambrook, J., E.F Fritchs and T. Maniatis. 1989.** Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Smith, J.S.C. and O.S. Smith. 1992.** Fingerprinting crop varieties. *Journal Advances in Agronomy*. 11(47):85-129.
- Sugiyama, Aiko., I. Yoshinori., F. Hiroshii, S. Takehiko, E. Tomoko, S. Tokurou, and Mitsuo Omura. 2010.** Structure and expression levels of alleles of *Citrus* zeaxanthin epoxidase genes. *Journal Japanese Society for Horticultural Science*. 79(3): 263-274.
- Williams, J.G.K., A.R.K. Kubelik, J.L. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990.** DNA polymorphisms amplified by random primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 7(18): 6531-6535
- Xu Wei, C., Chunxian, Y. Qibin, G. Antoine, Y., Yuan, L. Guolu., G. Frederick and Jr. Gmitter. 2014.** Novel expression patterns of carotenoid pathway-related genes in citrus leaves dan maturing fruits. *Tree Genetics Genomes*. 5(10):439-448.
- Zhang, B., L. Zhang, Q. Zhuge, M-X Wang, and M-R Huang. 2005.** Identification dan validation of single nucleotide polymorphism in poplar using publicly expressed sequence tags. *Journal of Integrative Plant Biology*. 47(12):1483-1496.