

**OPTIMASI ENZIM RETRIKSI (*EcoRI*, *HindIII*, *TasI*) DALAM
METODE CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphics Sequence*) DENGAN
MENGUNAKAN MARKA mtSSR UNTUK IDENTIFIKASI
GENETIK POPULASI JERUK F1
HASIL FUSI PROTOPLASMA**

SKRIPSI

Oleh :

ERLANGGA SETYAWAN

NIM. 0910483011

MINAT BUDIDAYA PERTANIAN



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERTANIAN

JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN

PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI

MALANG

2014

**OPTIMASI ENZIM RETRIKSI (*EcoRI*, *HindIII*, *TasI*) DALAM
METODE CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphics Sequence*) DENGAN
MENGUNAKAN MARKA mtSSR UNTUK IDENTIFIKASI
GENETIK POPULASI JERUK F1
HASIL FUSI PROTOPLASMA**

Oleh :

ERLANGGA SETYAWAN

NIM. 0910483011

MINAT BUDIDAYA PERTANIAN

SKRIPSI

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana

Pertanian Strata Satu (S-1)

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERTANIAN

JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN

PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI

MALANG

2014

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Skripsi : Optimasi Enzim Retriksi (*EcoRI*, *HindIII*, *TasI*) dalam Metode CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) dengan menggunakan Marka mtSSR untuk Identifikasi Genetik Populasi Jeruk F1 Hasil Fusi Protoplasma

Nama Mahasiswa : ERLANGGA SETYAWAN

NIM : 0910483011

Jurusan : BUDIDAYA PERTANIAN

Program Studi : AGROEKOTEKNOLOGI

Minat : LABORATORIUM PEMULIAAN TANAMAN

Menyetujui : Dosen Pembimbing

Pembimbing utama,

Pembimbing pendamping,

Ir. H. RB Ainurrasjid., MS
NIP. 195506181981031002

Prof. Dr. Ir. NurBasuki
NIP. 130 531 836

Mengetahui,

Ketua Jurusan Budidaya Pertanian

Dr. Ir. NurulAini, MS
NIP. 196010121986012001

Tanggal Persetujuan :

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan,

MAJELIS PENGUJI

Penguji I

Penguji II

Ir. Arifin Noor Sugiharto, M.Sc., PhD.

Prof. Dr. Ir. NurBasuki

NIP. 19620417 198701 1 002

NIP. 130 531 836

Penguji III

Penguji IV

Ir. H. RB Ainurrasyid., MS

Dr. Ir. YuliaNuraini, MS

NIP. 195506181981031002

NIP. 196111091985032001

Tanggal Lulus:

LEMBAR ORISINALITAS

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Erlangga Setyawan

NIM : 0910483011

Judul Skripsi : 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

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa penelitian ini berdasarkan hasil penelitian, pemikiran dan pemaparan asli dari penulis sendiri, baik untuk naskah laporan maupun kegiatan laboratorium yang tercantum sebagai bagian dari laporan penelitian ini dan di fasilitasi baik secara pembiayaan dan pembimbingan oleh Chaerani Martasari, SP., M.Si. Jika terdapat karya orang lain, penulis akan mencantumkan sumber secara jelas.

Dengan demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan hak milik penelitian yang telah diperoleh karena karya tulis ini dan sanksi lain sesuai norma yang berlaku di perguruan tinggi.

Malang, 15 Juli 2014

Mengetahui,

Penulis

Pembimbing Lapangan

Erlangga Setyawan

Chaerani Martasari, SP.,M.Si.

NIM. 0910483011

Once more into the fray...

Into the last good fight I'll ever know.

Live and die on this day...

Live and die on this day...

"YAKIN - USAHA - SAMPAI"

"There is a man in time...

There is a time in man..."



Kupersembahkan Karya Ilmiah Ini

Sebagai Wujud Baktiku Kepada

Bapak (Drs. Eko Widjanarko) dan Ibu (Ir. Erny Faridha)

Atas Do'a dan Bimbingannya Yang Menyertaiku

Dalam Setiap Langkah. Adik dan Sahabat

Serta Keluarga Besarku Tersayang.



Erlangga Setyawan. 0910483011. 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. Dibawah bimbingan Ir. H. RB. Ainurrasjid., MS sebagai dosen pembimbing utama skripsi dan bapak Prof. Dr. Ir. Nur Basuki sebagai dosen pembimbing pendamping

RINGKASAN

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 imporkhususnya 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 local bersaing dengan jeruk impor baik dalam kualitas maupun kuantitas. Salah satu jenis jeruk local 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 (*Citoplasmic 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, 2007).

Interaksi genom inti DNA inti - sitoplasma (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 genetika atau molekuler lebih tepat.

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

Penanda molekuler merupakan teknik yang efektif dalam analisis genetic 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 nuclear 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 (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) 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 fusannya.

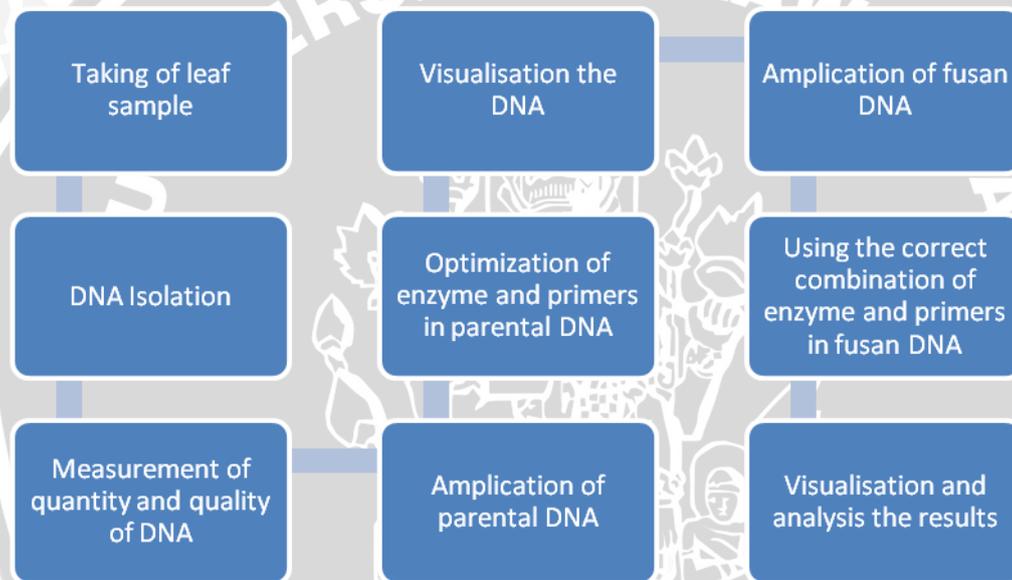
Tujuan kegiatan penelitian ini ialah untuk memperoleh informasi kombinasi dari primer dan enzim restriksi yang paling tepat dan memunculkan frekuensi polimorfisme yang tinggi pada tanaman sampel baik parentalnya maupun hasil fusi protplasma berdasarkan penanda molekuler mitokondria (mtSSR) dengan metode CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*).

Penelitian ini akan dilaksanakan dari bulan April-Juni 2013 di Laboratorium pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO) Tlekung, Kecamatan Junrejo, Kota Batu..

Alat yang digunakan ialah mortar, pestel, gelas ukur, erlenmeyer, *timer*, *beaker glass*, *stirrer*, mikropipet, timbangan analitik, vortex, tabung eppendorf,

mesin spektrofotometer, *autoclave*, *waterbath*, mesin *centrifuge*, mesin elektroforesis, mesin PCR dan alat biodoc analyze. Bahan yang digunakan ialah daun muda dari 50 tanaman jeruk fusan dan kedua parentalnya (Siam Madu dan Mandarin Satsuma), aquadest, alcohol 70%, mercaptoethanol, pvp (polyvinyl pyrrolidone 10), buffer ekstrasi, ammonium asetat, CTAB (CetylTrimethyl Ammonium Bromide), Chloroform:Isoamylalcohol (24:1) (CHISAM), ethanol dingin, isopropanol dingin, buffer TE, buffer pencuci, RNase (Roche), ethanol 96 % dingin, Agarose SPI (Duchefa Biochemie), Agarose Molecular Screening (Roche), buffer TBE, PCR mix (Fast Start PCR Master, Roche), Aqua bidestilata steril (Ikapharmindo), DNA ladder 100 bp (Promega), Ethidium Bromide (EtBr), loading dye (Fermentasi; Promega) dan menggunakan 2 pasang primer mtSSR (*forward* dan *reverse*) yaitu primer 18S rRNA-5S rRNA dan *nad1* exon B-*nad 1* exon C (Latharet *et al.*, 2010).

Metode Kerja



Hasil penelitian menunjukkan 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 pada perlakuan T1(3jam) dan T2(6jam), kemudian hasil analisis dari gambar 7 dan 8

menunjukkan bahwa pola fragmen DNA mitokondria tanaman parental identik dengan fragmen DNA mitokondria tanaman F1 jeruk hasil fusi protoplasma.



Erlangga Setyawan. 0910483011. Optimization restriction enzymes (EcoRI, HindIII, TasI) in CAPS methods (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) by using mtSSR marker to identify population genetics of orange as F1 generation from protoplasm fusion. Under Guidance by Sir Ir. H. RB. Ainurrasjid., MSas a main research supervisor and Sir Prof. Dr. Ir. NurBasukias a second supervisor.

SUMMARY

Orange represent one of the horticulture commodity that functioning as source of nutrients, source of earnings, and State resource of stock-exchange. Indonesia is one of the biggest Importing country in orange in ASEAN after Malaysia, with volume of import especially sweet orange equal to 127.041 ton during range of time 2005 - 2009 with mean per year is 25.408 ton. While for the varieties of mandarin or keprok, during range of time 2005 - 2009 reaching 504.063 ton or about 100.813 ton per year.

One of the commercial local orange type which have high potentials is Siam Madu varieties of orange. This siam have flimsy fruit husk character, rust colored, fine taste, obstetrical of high juice and can adapt at lowland and is high. One of the orange varieties that have nature of seedless is Mandarin Satsuma. Mandarin Satsuma have strong character that is seedless its caused a sterile pollen (*Sterile Male - MS*) and known to be controlled by gene residing in sitoplasmic (*Citoplasmic Male Sterility - CMS*). Consider to the fact, removing the nature of seedless from Mandarin Satsuma to Siam Madu can't be done by conventional crossing, but it can be done by protoplasm fusion technology.

Molekuler Marker is effective appliance because it is detecting by genetics variation, what do not influence by environment (Pabendon *et al.*, 2005). Molekuler marker technique is effective techiques in analysis of genetics and applicated widely in plant breeding program. Biochemical marker example isozim and protein storage represent application gene expression product which have to identify seed result of germination of consanguinity relation study and seed between gene and between species at orange plant. Even though, usage of biochemical marker have limitation, that is plant age have an effect to yielded ribbon pattern. Beside, biochemical markers resulting limited polimorfisme, so that difficult to differentiate which varieties have a near consanguinity (Karsinah *et al.*, 2002; Pabendon, 2004).

To analyze the molekuler marker, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) and RFLP (*Restriction Fragment length Polymorphism*) used widely (Moreira *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2002), but after the advancing molekuler marker that more effisien and simple like SSR (*Simple Sequence Repeat*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) and chloroplast SSR (cpSSR), Identification of fusi can be done easier and quickly. CAPS marker used in verification process and identification of orange fusan (Guo *et al.*, 2008).

CAPS marker is a molekuler marker that combined between RFLP method and PCR. This methods reported success to use as mitochondria DNA analysis (mtDNA) of orange fusan by some reseacher (Guo *et al.*, 2008). Cai *et al.* (2009) reported CAPS methods with universal primers to identification of mtDNA

showed the different bands between parental and its fusan.

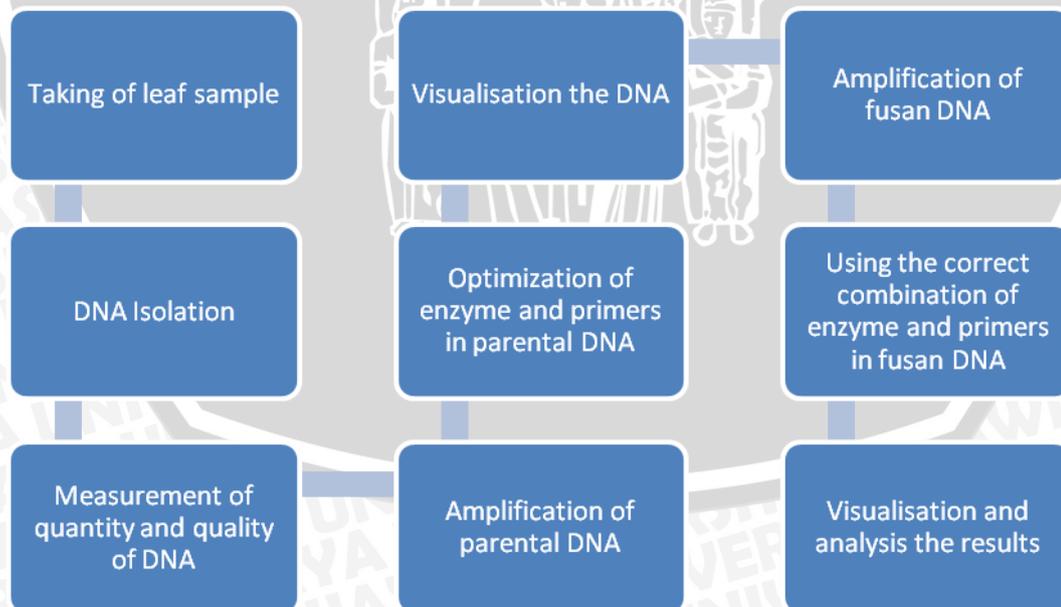
Target of research is to get an information of the correct combinations between primers and restrictions enzyme that showed the highest polimorfism level in plant sample as good as its parental or its fusan based on mitochondria moleculer marker (mtSSR) by CAPS metode.

The hypothesis are The combination between primers and restriction enzyme works significantly in certain time, that it can showed more bands in DNA sample or not.

Work Place in Plant Breeding Laboratorium in BALITJESTRO, Junrejo District, Batu City, East Java. The research will be conducted at April – June 2013. The tools that used in this research are mortar, pestel, measure glass, erlenmeyer, timer, beaker-glass, stirrer, micropipet, analytic weighing-machine, vortex, eppendorf tube, machine of spectrofotometr, autoclave, waterbath, centrifuge-machine, elektroforesis-machine, PCR-machine and biodoc analyze.

The materials that used in this research are Leaf sample of F1 and both of its parental (Siam Madu and Mandarin Satsuma), aquadest, alcohol 70%, mercaptoethanol, pvp (*pyrrolidone polyvinyl*), buffer-extraction, ammonium acetate, CTAB (*CetylTrimethyl Ammonium Bromide*), Chloroform:Isoamylalcohol (24:1) (CHISAM), cold-ethanol, cold-isopropanol, TE buffer, buffer-detergent, RNase (Roche), cold-ethanol 96 % , Agarose SPI (*DuchefaBiochemie*), Agarose Molecular Screening (*Roche*), TBE buffer, PCR Mix (*Fast Start PCR Master; Roche*), Aqua of Bidestilata sterile, DNA Ladder 100 bp (*Promega*), Ethidium Bromide (Etbr), dye loading and use 2 primary tide of mtSSR that is 18S rRNA rRNA-5S and of nad1 exon B-nad 1 exon C.

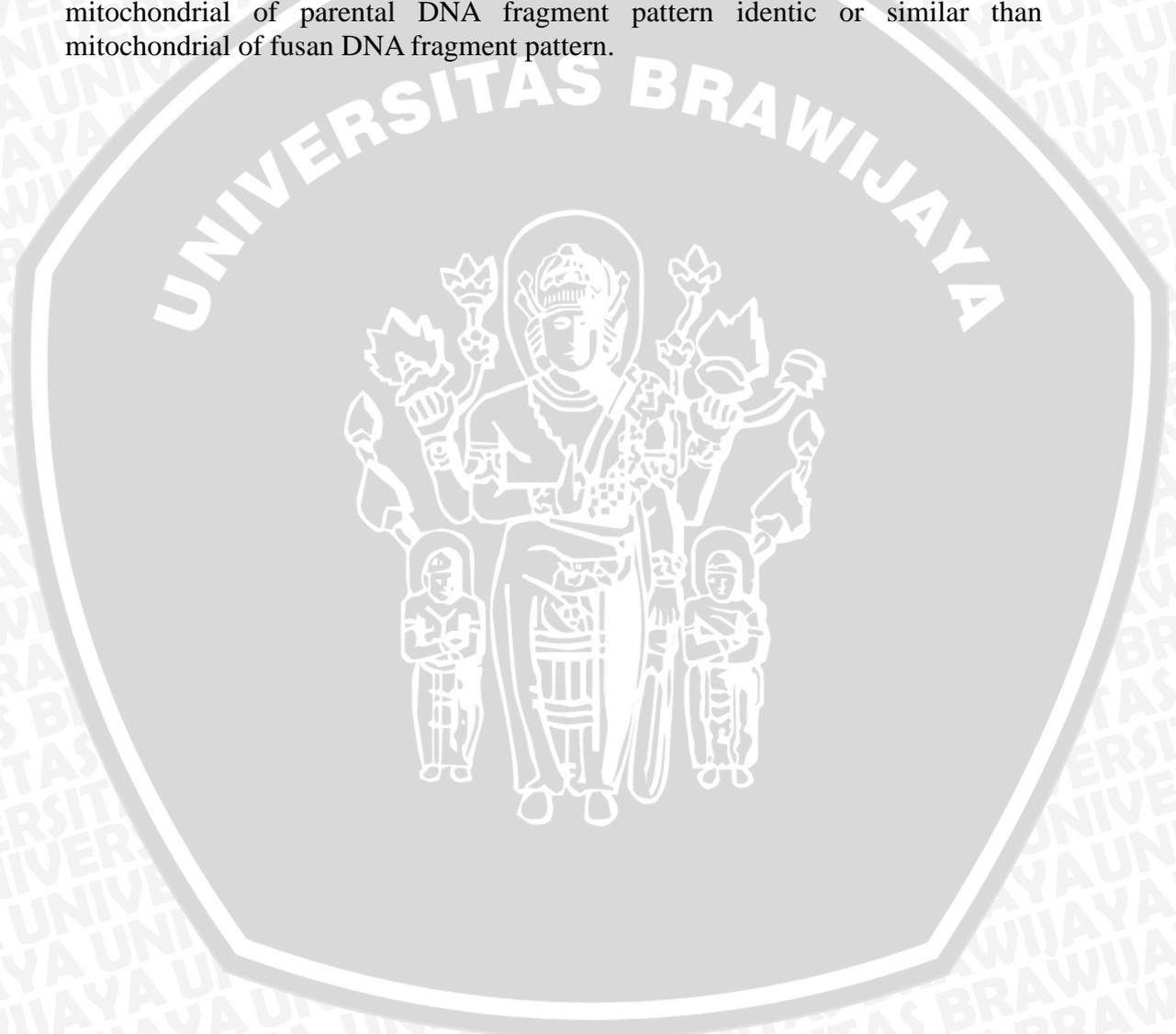
Workflow



The result of this reserach are the combination of restriction enzymes



ecoRI with primers *18S_rRNA_F/R* and combined with the primer *nad 1 exon C/B* proved unable to bring the presence of the fragment patterns of DNA samples at all levels of treatment time. The combination of restriction enzymes *hindIII* with primer *18S_rRNA_F/R* proved unable to bring the presence of the fragment patterns of DNA samples at all levels of treatment time, whereas when combined with the primary *nad 1 exon C/B* there is the presence of the fragment patterns of DNA samples at the level of treatment time T1(3 hours), T2(6 hours) and T3(9 Hours). The best combination is a combination of restriction enzymes *tasI* with primer *18S_rRNA_F/R* and primer *nad 1 exon C/B*, this is because the consistency led to the presence of the DNA fragment patterns of the sample well on the second pair primers, then the analysis result of figure 7 and 8 showed mitochondrial of parental DNA fragment pattern identic or similar than mitochondrial of fusan DNA fragment pattern.



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur ke hadirat Allah Yang Maha Esa yang selalu melimpahkan karunia-Nya kepada kita semua, sehingga penulis mampu untuk menyusun dan menyelesaikan penelitian yang berjudul “**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**”.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Sehingga penulis tidak lupa menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Dr. Ir. Nurul Aini, MS selaku Ketua Jurusan Budidaya Pertanian yang telah memberikan izin dan bimbingan untuk melaksanakan penelitian ini.
2. Ir. Ainurrasjid., MS selaku dosen pembimbing utama atas pengarahan dan bimbingan yang diberikan.
3. Prof. Dr. Ir. Nur Basuki selaku dosen pembimbing pendamping yang senantiasa memberikan pengarahan dan bimbingan yang diberikan.
4. Chaerani Martasari, SP, M.Si. selaku pembimbing pendamping yang senantiasa memberikan pengarahan dan bimbingan yang diberikan di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO) Tlekung, Kecamatan Junrejo, Kota Batu.
5. Ir. Arifin Noor Sugiharto, M.Sc., PhD selaku dosen pembahas yang senantiasa memberikan pengarahan dan bimbingan yang diberikan.
6. Bapak (Drs. Eko Widjanarko), ibu (Ir. Erny Faridha), dan adik (Ryan Magistra) tersayang atas dukungan, bimbingan, dan motivasi yang diberikan.
7. Teman - teman semua angkatan fakultas pertanian Universitas Brawijaya atas dukungan, bimbingan, dan motivasi yang diberikan.
8. Teman-teman Jurusan Budidaya Pertanian 2009–2010 FP UB atas dukungan, bimbingan, dan motivasi yang diberikan.
9. Teman-teman Fakultas Statistika IPB angkatan 2009 atas dukungan, bimbingan, dan motivasi yang diberikan.

10. Teman-teman Fakultas Pertanian UNPAD angkatan 2009 atas dukungan, bimbingan, dan motivasi yang diberikan.
11. Sahabat-sahabat saya yang saya banggakan Magistra Dheni Setiadi, Rizki Arisanti, Ossy Fitriana, David Estu.
12. Kawan-kawan seperjuangan saya di HMI Cabang Malang, Komisariat Pertanian, Universitas Brawijaya. Baik adinda-adinda maupun kakanda atas dukungan, bimbingan, dan motivasi yang diberikan.
13. Saudara perjuangansaya di HMI Ahmad Jauhari F, Dwija Saputra, Ajik Siswantoro, Retno Wulandari, Lailil Fitra Annisa, Ahmad Herlyasa, Adiyat Augusty, Favian Arsyi Suhandoyo, Ahmad Nashir sururi, Arbiandi Saputra, Nasr Al-farisy, Ubaydillah, Erlangga Eko F, dan tidak lupa adinda Firda Alfiani.
14. Sahabat-sahabat terdekat saya Birtha Niken Pratiwi, Cinta Estetika, Riza Fitria Karlin, Ayu Rosmayuningsih, Muhammad Nanda Putra (KAMMI), Muhammad Tohir, Armanto Dwi Cahyo (KAMMI), Yaris Roya Adhifa, Tritama Aria, Gatra Winanda, dan saudara saya Bimo Adi Subagio.
15. Kawan-kawan IAAS (*International Association Agriculture Student and Related Sciences*) atas kenangan dan pengalaman selama di kampus UB.
16. Kawan-kawan HIMADATA (Himpunan Mahasiswa Budidaya Pertanian) atas kenangan dan pengalaman selama di kampus UB.
17. Untuk yang terkasih yang saya selalu banggakan adinda Agizta Inez Nindiaziza.

Penulis menyadari bahwa dalam menyusun penelitian ini masih terdapat banyak kekurangan sehingga segala kritik dan saran sangat diperlukan.

Malang, 18 Juli 2014

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR ORISINALITAS	iii
LEMBAR PERSEMBAHAN	iv
RINGKASAN	v
SUMMARY	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.3.1 Tujuan Umum Penelitian	7
1.3.2 Tujuan Khusus Penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Manfaat Keilmuan.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis	7
1.5 Hipotesis Penelitian	7
BAB II KAJIAN PUSTAKA	
2.1 Botani Jeruk Siam Madu dan Satsuma Mandarin	8
2.2 Pemuliaan Tanaman Jeruk	8
2.3 Fusi Protoplasma	10
2.4 Genom Inti dan Sitoplasma	13
2.5 Penanda Molekuler Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS).....	19

	17
2.5.1 Analisis CAPS dengan DNA Mitokondria.....	20
2.5.2 Pilihan Beberapa Primer untuk Teknik Penanda CAPS	20
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian	24
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	24
3.3 Pelaksanaan Penelitian	24
3.3.1 Pengambilan sampel.....	24
3.3.2 Pengukuran kualitas DNA.....	27
3.3.3 Standar Prosedur Penggunaan Penanda Molekuler CAPS..	28
3.3.3.1 Amplikasi DNA dengan PCR	28
3.3.3.2 Inkubasi dengan enzim restriksi.....	30
3.3.4 Visualisasi dan Dokumentasi	36
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil	37
4.1.1 Isolasi DNA.....	37
4.1.2 Uji Kualitas DNA	37
4.1.3 Amplifikasi DNA tanaman fusan dengan primer mitokondria	38
4.1.4 Optimasi waktu perendaman enzim restriksi pada metode CAPS (<i>Cleaved Amplified Polymorphism Sequences</i>).....	43
4.1.4.1 Optimasi terhadap DNA parental	43
4.1.4.2 Optimasi terhadap DNA F1 tanaman jeruk hasil fusi..	49
4.2 Pembahasan	55
BAB V KESIMPULAN	
5.1 Kesimpulan.....	59
5.2 Saran	59

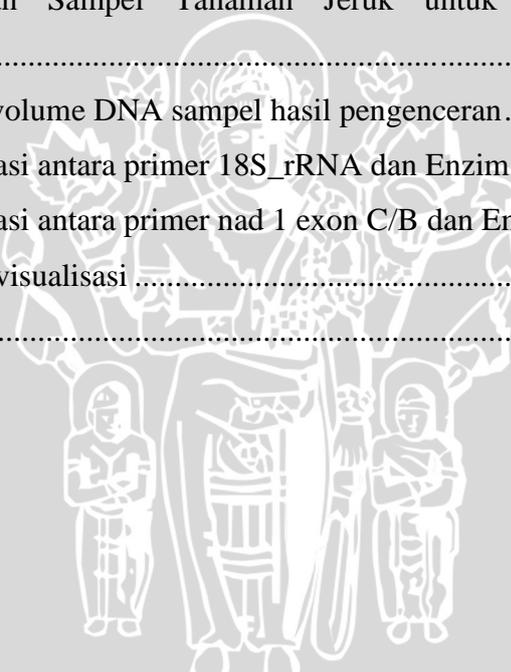
DAFTAR PUSTAKA**LAMPIRAN-LAMPIRAN**

DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Pengambilan sampel daun tanaman jeruk untuk isolasi DNA	25
2.	Waktu optimasi dan waktu perlakuan	33
3.	Jumlah lokus hasil visualisasi dari proses PCR antara kombinasi DNA sampel dan pasangan	86
4.	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	45
5.	Hasil analisis berdasarkan visualisasi di bawah sinar ultraviolet	53
6.	Pengambilan sampel daun muda tanaman jeruk fusi ke 2 tanggal 11 Maret 2013	75
7.	Pengambilan sampel daun muda tanaman jeruk fusi ke 1 tanggal 06 Maret 2013	75
8.	Pengambilan sampel daun muda tanaman jeruk fusi ke 3 tanggal 14 Maret 2013	76
9.	Pengambilan sampel daun muda tanaman jeruk fusi ke 4 tanggal 20 Maret 2013	77
10.	Tabel perhitungan volume DNA sampel hasil pengenceran tanggal 23 Maret 2013	78

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1.	Deskripsi Jeruk Siam varietas Madu.....	66
2.	Deskripsi Jeruk Satsuma Mandarin.....	68
3.	Bahan dan Cara Pembuatan Larutan.....	69
4.	Daftar Bahan untuk Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis.....	71
5.	Daftar Alat untuk Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis.....	72
6.	Daftar Sampel Daun Tanaman hasil Fusan.....	73
7.	Denah Tanaman Jeruk hasil Fusi Protoplasma.....	75
8.	Tabel Pengambilan Sampel Tanaman Jeruk untuk Isolasi DNA	76
9.	Tabel perhitungan volume DNA sampel hasil pengenceran.....	79
10.	Visualisasi kombinasi antara primer 18S_rRNA dan Enzim TasI.....	82
11.	Visualisasi kombinasi antara primer nad 1 exon C/B dan Enzim TasI.....	84
12.	Jumlah lokus hasil visualisasi.....	86
13.	Biodata Peneliti.....	89



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Kerangka operasional analisis molekuler berdasarkan penanda moleculer mitokondria (mtSSR) dengan metode CAPS (<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i>) tanaman hasil fusi protoplas antara jeruk Siam Madu dengan Mandarin Satsuma	2
2.	Elektroforegram hasil amplifikasi DNA tanaman sampel jeruk hasil fusi dengan pasangan primer 18S_rRNA_F/R nomor sampel 1-16	41
3.	Elektroforegram hasil amplifikasi DNA tanaman sampel jeruk hasil fusi dengan pasangan primer nad 1 exon C/B nomor sampel 1-22	42
4.	Elektroforegram hasil uji optimasi DNA parental, 2 pasangan primer universal mitokondria dan enzim restriksi yang direndam pada perlakuan waktu tertentu	46
5.	Elektroforegram menunjukkan kombinasi dari DNA parental, 2 pasangan primer universal mitokondria dan enzim restriksi yang direndam pada perlakuan waktu tertentu	47
6.	Elektroforegram menunjukkan kombinasi dari DNA parental, 2 pasangan primer universal mitokondria dan enzim restriksi yang direndam pada perlakuan waktu tertentu	48
7.	Elektroforegram gel agarose kombinasi antara primer 18S_rRNA_5SrRNA F/R dengan enzim restriksi <i>TasI</i> pada DNA F1 tanaman hasil fusi jeruk nomor sampel 1-20, 51 dan 52	50
8.	Elektroforegram gel agarose kombinasi antara primer nad 1 exon C/B dengan enzim restriksi <i>TasI</i> pada DNA F1 tanaman hasil fusi jeruk nomor sampel 1-20, 51 dan 52	51

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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 Chenet *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 diolah, dalam Anonymous^a, 2013). Konsumsi nasional terhadap komoditas jeruk dalam bentuk buah segar sangat besar. Indikatornya terlihat dari jumlah impor buah jeruk yang semakin meningkat. Impor jeruk telah mengalami peningkatan sebesar 25,32 persen pada Januari-Maret 2011 yaitu senilai 85.352.866 dollar AS jika dibandingkan pada periode yang sama tahun 2010 yaitu sebesar 68.103.952 dollar AS (BPS, 2010 diolah, dalam Anonymous, 2013).

Peningkatan impor buah jeruk merupakan suatu indikator belum mampunya jeruk lokal bersaing dengan jeruk impor baik dalam kualitas maupun kuantitas. Secara umum jeruk lokal Indonesia belum memiliki kualitas seperti jeruk impor yaitu warna kulit buah kuning, rasa manis dan tanpa biji. Demikian juga dengan kontinuitas produksi yang rendah sehingga menyebabkan kuantitas pasokan pasar tidak terjamin. Tomas *et al.*, (2003), menyatakan bahwa kompetisi global peningkatan penjualan jeruk dan ketahanan industri jeruk sangat bergantung pada ketersediaan kultivar yang baik secara genetik dan produktivitas yang tinggi.

Jeruk juga dapat dikonsumsi sebagai jus selain sebagai buah segar, minyak esensial dan pectin (Kunitake *et al.*, 2002). Jeruk merupakan salah satu komoditas hortikultura yang berfungsi sebagai sumber gizi, sumber pendapatan, dan sumber devisa Negara. Besarnya kontribusi agroindustri jeruk dalam

meningkatkan pendapatan akan menumbuhkan sentra pengembangan jeruk baru (Karsinah *et al.*, 2002). Kompetisi global peningkatan penjualan jeruk dan ketahanan industry jeruk ialah bergantung pada ketersediaan kultivar yang baik secara genetic (Tomas *et al.*, 2003). Penelitian pemuliaan tanaman jeruk terhambat karena karakteristik-karakteristik yang terkait dengan reproduktif biologi, seperti reproduksi apomiksis, tingkat keanekaragaman hayati yang tinggi, poliembrioni, embrio nuselar, *self sterility*, inkompabilitas, jantan madul dan betina mandul, tingkat kerontokan bunga tinggi pada persilangan, pembentukan buah (*fruit set*) rendah, masa juvenile (juvenilitas) yang lama banyak karakter morfologi dan fisiologi dikendalikan oleh QTLs dan kekurangan penanda DNA polimorfis (Novelli *et al.*, 2006; Liu dan Deng., 2007; Ashari., 2002; Guo *et al.*, 2006).

Pada pemuliaan persilangan konvensional jeruk, beberapa penghalang membatasi pemanfaatannya (Kunitake *et al.*, 2002). Keberhasilan persilangan yang dilakukan pada tanaman jeruk terkadang mengalami kegagalan yang dikarenakan tingkat kerontokan bunga pada tanaman jeruk sangat tinggi dan *fruit set* rendah (Ashari, 2002). Untuk mengantisipasi hal ini, maka dilakukan teknik *embryo rescue* untuk menyelamatkan embrio hasil persilangan seksual dan meningkatkan keberhasilan persilangan tersebut. Tetapi hasil persilangan yang melalui teknik *embryo rescue* tersebut terdapat variasi somaklonal dikarenakan perlakuan subkultur embrio yang berulang sebanyak lima kali (Aini, 2009).

Fakta bahwa kombinasi baru dari nukleus dan organel yang diperoleh setelah fusi protoplas dapat memiliki aplikasi menarik untuk membentuk tanaman baru yang memiliki nilai hortikultura yang potensial (Moreira *et al.*, 2000), maka fusi protoplas digunakan sebagai alat untuk memecahkan kesulitan dalam persilangan seksual konvensional, yang potensial dalam pemuliaan jeruk (Kunitake *et al.*, 2002). Teknik hibridisasi somatik berguna khususnya dalam pemecahan poliembrioni alami dan polen/ovul mandul dari tanaman jeruk (Guo *et al.*, 2008).

Berdasarkan fusi sel somatik, teknologi somatik hibridisasi digunakan untuk produksi kombinasi baru dari gen parental dan untuk menghasilkan produk hibrid yang unik. Hibridisasi somatik memecahkan inkompabilitas interspesifik yang terjadi dalam persilangan jauh. Segregasi independen dari genom nucleus

dan sitoplasma sebagai hasil dari hibridisasi somatik menjadi dasar untuk pembentukan perbanyakan hibrid dengan kombinasi nukleus-sitoplasma yang berbeda (Vasylenko *et al.*, 2006).

Penemuan pewarisan non-Mendelian membuka studi yang luas pada ketertarikan transmisi dan fungsi dari genom sitoplasma. Plastida dan mitokondria yang memiliki genom sendiri dan jalur metabolic yang rumit menjadi perhatian peneliti sebagai sumber manipulasi genetic (Vasylenko *et al.*, 2006). Beberapa karakter seperti *Cytoplasmic Male Sterility* (CMS), ketahanan suhu, herbisida dan resisten antibiotic, ketahanan pada beberapa penyakit, dan ciri penting agronomi lainnya ditransmisi secara maternal melalui plastida atau mitokondria (Vasylenko *et al.*, 2006).

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).

Fusi protoplasma ialah suatu fenomena fisik pada waktu penggabungan dua atau lebih protoplas yang bersentuhan dan melekat satu sama lain (Verma *et al.*, 2004) yang dapat terjadi secara spontan atau terinduksi (George, 2008). Perbaikan varietas jeruk melalui fusi protoplasma antara jeruk Siam Madu dan jeruk Mandarin Satsuma telah dimulai sejak tahun 2006 di Balai Penelitian

Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO) yang bekerjasama dengan Balai Besar BIOGEN Bogor. Jeruk Siam Madu memiliki daging buah berwarna kuning jingga, berasa manis, berbiji banyak, kulit buah tipis dan agak sulit dikupas, dengan warna buah hijau kuning, sedangkan jeruk Satsuma Mandarin memiliki sifat kulit buah mudah dikupas, daging buah berwarna jingga tanpa biji, serta rasa yang kurang manis, maka diperlukan penggabungan sifat unggul antara kedua jenis jeruk tersebut dengan teknologi fusi protoplas. Idiotipa tanaman yang diharapkan adalah jeruk siam unggul berdaya saing tinggi dengan karakter tanpa biji, rasa yang manis, kulit mudah dikupas dan memiliki warna yang menarik.

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) – sitoplasma (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. Cheng *et al.* (2003), melaporkan bahwa terjadinya pertumbuhan tunas abnormal dari fusi intergenerik antara jeruk manis (*sweet orange*) dan kumquat, bersamaan dengan hilangnya DNA mitokondria (mtDNA) yang berasal dari salah satu tetua. Sementara pada fusi kentang juga telah terdeteksi sebuah korelasi antara komposisi mtDNA dan parameter lapang luas daun. Diketahui juga bahwa DNA mitokondria (mtDNA) berkaitan langsung dengan sitoplasmik mandul jantan (*cytoplasmic male sterility*) (Cheng *et al.*, 2003).

Pemahaman rinci tentang interaksi genom inti-sitoplasma dibutuhkan dalam mempermudah tahap awal proses seleksi tanaman fusan. Untuk

mendapatkan tujuan pemuliaan, penggabungan yang diharapkan adalah penggabungan antara genom inti Siam Madu+Mandarin Satsuma yang disebut hibrid, dan/atau penggabungan genom inti Siam Madu+sitoplasma Mandarin Satsuma yang disebut sibrid.

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). Berbeda halnya dengan estimasi kemurnian karakter berdasarkan sifat morfologi dan fisiologi yang terkadang mengalami kesulitan, karena karakter-karakter ini sangat dipengaruhi lingkungan (Prasetiyono *et al.*, 2004; Pabendon *et al.*, 2005; Pabendon., 2004). Pengaruh ini dapat dihindari jika hanya menggunakan karakter morfologi kualitatif yang monogenik (seperti yang dilakukan Mendel pada awal percobaannya pada *pea*). Sifat-sifat ini langsung menunjukkan genotip tanaman, tetapi kelemahannya ialah beberapa dari karakter tersebut yang tersedia (Pabendon, 2004).

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). Berbeda dengan marka molekuler yang ditentukan secara langsung pada materi genetik yaitu DNA itu sendiri. Dengan demikian hasil yang diperoleh dari teknik marka molekuler secara total independen dari pengaruh lingkungan dimana materi tersebut ditanam (Pabendon, 2004).

Beberapa analisis molekuler yang dilakukan pada banyak hibrid somatik jeruk, menerangkan bahwa genom mitokondria biasanya diwariskan secara tidak acak (*non-randomly inheritance*) dari parental kalus embriogenik sementara genom kloroplas diwariskan secara acak (Guo *et al.*, 2004 dalam Guo *et al.*, 2008). Pada hibrid somatik interspesifik dan intergenerik dan sbrid jeruk mtDNA diwariskan dari parental embriogenik (Cheng *et al.*, 2003). Sehingga pengetahuan tentang keberadaan genom sitoplasma pada tanaman fusan dapat dijadikan indikator keberhasilan penggabungan dua tetua. Lebih jauh diduga identifikasi adanya genom mitokondria tetua Mandarin Satsuma pada tanaman fusan dapat dijadikan indikator berpindahnya sifat *seedless*.

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 (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) 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 fusannya.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini ialah apakah terdapat informasi untuk kombinasi dari primer dan enzim restriksi yang paling banyak memunculkan polimorfisme pada tanaman sampel baik parentalnya maupun hasil fusi protoplasmanya berdasarkan penanda molekuler mitokondria (mtSSR) dengan

metode CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) dengan kombinasi antara primer *nad1exonB/nad1exonC* dan *18S_rRNA_F/18S_rRNA_R* yang kemudian diretriksi oleh enzim retriksi (*EcoRI*, *HindIII*, *TasI*).

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum Penelitian

Tujuan umum penelitian ialah untuk mendapatkan efektifitas dihasilkan dari setiap individu tanaman hasil fusi yang telah dikombinasikan dengan primer *nad1exonB/nad1exonC* dan *18S_rRNA_F/18S_rRNA_R* yang kemudian diretriksi oleh enzim retriksi (*EcoRI*, *HindIII*, *TasI*).

1.3.2 Tujuan Khusus Penelitian

Tujuan Khusus penelitian ialah untuk mendapatkan informasi tingkat polimorfisme dari marka mtSSR dalam metode CAPS untuk identifikasi genetik populasi jeruk F1 hasil fusi protoplasma.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Keilmuan

Manfaat ilmiah dalam penelitian ini ialah untuk memberikan pengetahuan mengenai alternatif pemecahan permasalahan faktor identifikasi genetik pada tanaman melalui bioteknologi analisis molekuler untuk mendapatkan informasi tingkat polimorfisme dari marka mtSSR dalam metode CAPS untuk identifikasi genetik populasi jeruk F1 hasil fusi protoplasma.

1.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis dalam penelitian ini ialah untuk mendapatkan informasi tingkat polimorfisme dari marka mtSSR dalam metode CAPS untuk identifikasi genetik populasi jeruk F1 hasil fusi protoplasma.

1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini ialah diduga kombinasi antara enzim retriksi dan primers bekerja secara signifikan pada waktu tertentu (H_1), sehingga dapat memunculkan banyak pola pita pada DNA sampel atau sebaliknya kombinasi antara enzim retriksi dan primers tidak dapat bekerja secara signifikan

pada waktu tertentu (H_0), sehingga tidak dapat memunculkan atau memunculkan sedikit pola pita pada DNA sampel.



2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Botani Jeruk Siam Madu dan Satsuma Mandarin

Di antara berbagai jenis jeruk, jeruk siam mendominasi produksi jeruk di Indonesia. Jeruk siam merupakan jeruk lokal komersial Indonesia yang termasuk dalam *true species* dari genus Citrus. Namun, jenis jeruk ini mempunyai bagian yang tidak dikonsumsi paling tinggi di antara jenis lainnya (Sukarmin *et al.*, 2008). Bagian tersebut berupa seresah sisa yang dimakan, kulit buah, dan biji. Jenis jeruk ini juga peka terhadap hama dan penyakit serta cekaman lingkungan. Selain itu, jeruk ini juga mempunyai biji yang relatif banyak (15-20 biji per buah), kulit buah tipis dan agak sulit dilepas, dan warna yang tidak begitu menarik. Walaupun demikian, jeruk ini memiliki rasa yang manis. Oleh karena itu, perlu perbaikan terstruktur buah melalui hibridisasi untuk mengurangi jumlah seresah dan meningkatkan porsi buah yang dapat dimakan (Sukarmin *et al.*, 2008). Salah satu jenis jeruk siam yaitu jeruk Siam Madu yang mempunyai keunggulan kadar air banyak, vitamin C tinggi, tetapi kelemahannya seresah tinggi dan kulit tipis (Sukarmin *et al.*, 2008).

Jeruk Satsuma ialah jeruk Introduksi yang termasuk tipe mandarin yang mempunyai sifat partenokarpi yang tinggi (*seedless*) secara alami, mudah dikupas (*easy peeling*) dan memiliki warna yang menarik (*pigmented*), tetapi rasanya kurang manis (Spiegel-Roy dan Goldschmidt, 1996). Jeruk tanpa biji Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.), secara alami diidentifikasi sebagai tipe CMS (*Cytoplasmic Male Sterility*) melalui hibridisasi seksual dan pengulangan silang balik (Cai *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2004).

2.2 Pemuliaan Tanaman Jeruk

Pemuliaan tradisional sebagai strategi perbaikan genetik untuk perkembangan kultivar jeruk menghadapi banyak halangan serius. Terdapat pembatasan biologi berkaitan dengan derajat tingkat kemandulan seksual dan inkompatibilitas, juvenilitas yang panjang, ukuran individu tanaman yang besar dan biaya lahan, buruh, dan bahan yang dibutuhkan untuk memelihara dan menumbuhkan tanaman jeruk (Tomas *et al.*, 2003).

Jeruk ditumbuhkan sebagai kombinasi antara buah yang memproduksi varietas cabang batang atas yang disambung ke varietas batang bawah yang dapat menyesuaikan diri dengan tanah dan lingkungan dari wilayah produksi setempat (Tomas *et al.*, 2003)

Pemuliaan jeruk secara alami, menemui kesulitan dalam pengembangan batang bawah dan varietas batang atas karena (Tomas *et al.*, 2003):

- Biologi reproduktif jeruk ialah tidak biasa pada hamper semua tipe jeruk: *sweet orange*, grapefruit, lemon, dan beberapa mandarin, diproduksi melalui apomiksis fakultatif. Jenis apomiksis menghasilkan dari 5% hingga 100% semaian aseksual dan sangat tidak efisien sebagai parental untuk pemuliaan konvensional.
- Inkompatibilitas sendiri dan silang, seperti halnya kemandulan polen, biasa dijumpai pada jeruk.
- Juvenilitas plasma nutfah kebanyakan jeruk sekitar 5-10 tahun sebelum bunga yang pertama.
- Spesies jeruk komersial (seperti *sweet orange*, grapefruit, lemon, dan lime) ialah hybrid yang kompleks dari spesies jeruk sebenarnya (seperti mandarin, pummel, dan citron). Kebanyakan varietas dengan spesies jeruk komersial berasal dari mutasi somatik.

Kombinasi tersebut yang meliputi wilayah lahan yang luas, tahun evaluasi yang panjang, apomiksis, inkompatibilitas seksual, perpanjangan juvenilitas, dan hybrid alami yang kompleks menghambat peningkatan varietas jeruk (Tomas *et al.*, 2003). Tetapi teknologi genomik merupakan alat integral untuk perbaikan tersebut (Tomas *et al.*, 2003). Jeruk tanpa biji ialah salah satu hal terpenting dari pemuliaan jeruk (Cai *et al.*, 2009). Berbagai teknik pemuliaan konvensional telah banyak menghasilkan jeruk tanpa biji. Kini, fusi sel somatik menjadi alat untuk transfer CMS (*Cytoplasmic male sterility*) dari Satsuma Mandarin ke kultivar jeruk biji untuk pemuliaan jeruk tanpa biji (Cai *et al.*, 2009).

Di antara permasalahan pemuliaan jeruk, masalah biologi sangat penting dan mungkin dipecahkan. Berikut ialah uraian ringkas beberapa peningkatan yang diinginkan atau akan bersifat penting untuk pemuliaan jeruk (Tomas *et al.*,

2003):

1. Pengembangan vegetatif dan reproduksi

Studi pengembangan vegetatif dan reproduktif ialah penting dalam kaitan dengan pengaruh yang bersifat menentukan faktor yang berkaitan dengan ukuran dan kualitas produksi buah. Mengenai ini, pembentukan buah sebagai ciri yang harus untuk ditingkatkan dalam pemuliaan jeruk. Secara umum, permulaan pengembangan buah tergantung pada fertilisasi ovul. Pembentukan buah dapat juga tidak terikat pada fertilisasi. Ini dapat diinduksi oleh faktor oksogen (level hormon tinggi) atau oleh faktor aplikasi hormon oksogen buatan tertentu, yang menyebabkan buah partenokarpi (tanpa biji) dihasilkan. Beberapa varietas jeruk ialah autoinkompatibel, dengan partenokarpi spontan, tidak menghasilkan biji kecuali hibridisasi balik dengan kultivar lainnya. Kemudian, kendali untuk kapasitas pembentukan buah dan untuk produksi buah tanpa biji ialah sasaran pendekatan alat genomik.

2. Kualitas buah

Banyak aspek dalam kualitas buah, meliputi fisik menunjukkan ukuran buah, bentuk, warna, tekstur, jumlah biji, dan periode ketahanan. Yang sama pentingnya yaitu karakteristik kimia buah, seperti kandungan gula dan asam, warna internal, komposisi aroma dan rasa (organoleptik), kandungan enzim dan komponen gizi. Ciri ini diperoleh sepanjang pengembangan buah dan masak dipohon, dan terkait dengan proses fisiologis yang mengatur perkembangan buah, pemasakan eksternal dan absisi. Riset untuk mengidentifikasi, klon dan manipulasi gen melibatkan proses biokimia yang menentukan karakteristik buah, seperti kulit, kandungan gula dan cuka, pigmen, aroma, dan kandungan gizi (Tomas *et al.*, 2003)

2.3 Fusi Protoplas

Fusi protoplas merupakan suatu fenomena fisik pada waktu penggabungan dua atau lebih protoplas yang bersentuhan dan melekat satu sama lain (Verma *et al.*, 2004). Fusi protoplas dapat terjadi secara spontan atau terinduksi. Tidak sama dengan pewarisan maternal pada hibridisasi seksual, hibridisasi somatik tanaman memungkinkan adanya perpindahan/*transfer*, pencampuran/*mixing*, dan penggabungan ulang/*recombination* genom sitoplasma

(Olivares-Fuster, 2007).

Melalui fusi protoplas memungkinkan kita untuk dapat mentransfer beberapa gen yang bermanfaat seperti gen ketahanan terhadap penyakit, kekeringan, herbisida, panas dan dingin serta gen untuk fiksasi nitrogen, percepatan laju pertumbuhan, peningkatan laju pembentukan suatu produk dan kualitas protein dari satu organism ke organism lain bahkan menghasilkan silangan *interspecific* maupun *intergeneric*. Dengan demikian, melalui fusi protoplas kita dapat mengkombinasikan gen dari organisme yang berbeda untuk menghasilkan varietas tanaman baru dengan sifat sesuai yang diinginkan. Oleh karena itu, fusi protoplas menjadi suatu alat yang penting pada manipulasi gen karena dapat mematahkan penghalang untuk terjadinya pertukaran genetik melalui system perkawinan konvensional.

Hasil dari fusi protoplas secara umum terdiri dari tiga kemungkinan, yaitu:

- Menghasilkan hybrid atau kombinasi dua genom lengkap.

Apabila berasal dari dua genom yang sama maka dinamakan homokaryon, namun apabila berasal dari genom yang berbeda maka dinamakan heterokaryon.

- Menghasilkan *asymmetrichybrid* atau *partial hybrid*.

Apabila hanya sebagian genom yang berpindah dari sel donor ke sel respian (terjadi eliminasi kromosom). Hal ini dapat terjadi pada inti dan mitokondria.

- Menghasilkan sbrid

Apabila hanya organel yang mengalami perpindahan tanpa diikuti oleh perpindahan inti. Memungkinkan terjadinya pemindahan sifat resisten herbisida dan *cytoplasmic male sterility*.

Fusi protoplas memudahkan penggabungan dua genom secara keseluruhan dan dapat dimanfaatkan dalam penyilangan, yaitu:

- Antar protoplas dari tanaman yang sama dimana penggabungan inti (nucleus) dari kedua sel akan menimbulkan homokaryon (*synkaryon*).
- Antar protoplas dari spesies tanama yang sama (fusi *intravarietal* atau *intraspecific*).
- Antar protoplas dari spesies atau genus tanaman yang berbeda (fusi *interspecific* atau *intergeneric*).

Penggabungan dua genom ini selain membuka jalan untuk transfer gen,

dapat juga dimanfaatkan untuk suatu kajian mengenai ekspresi gen, stabilitas beberapa sifat dan perubahan-perubahan genetika sel.

Fusi protoplas memungkinkan penggabungan cirri-ciri sitoplasma pada tanaman yang telah diketahui bahwa kloroplas dan mitokondria diwariskan secara maternal pada hibridisasi seksual (Cheng *et al.*, 2003). Berbeda dengan hibridisasi seksual, fusi sel ialah proses paraseksual (Guo *et al.*, 2002).

Keberhasilan fusi protoplas terkait banyak faktor, seperti metode isolasi protoplas, kultur protoplas dan induksi fusi antar protoplas. Metode isolasi protoplas dapat dilakukan secara mekanis dan enzimatis. Pada isolasi protoplas secara enzimatis, jenis dan konsentrasi enzim yang digunakan sangat mempengaruhi perolehan protoplas. Protoplas tanaman yang telah diisolasi sangat mudah pecah dan rentan terhadap kerusakan baik secara fisik maupun kimia. Pada induksi fusi antar protoplas dengan menggunakan *polyethyleneglycol* (PEG) sebagai fusogen dan penggunaan muatan listrik atau *electrofusion*, faktor-faktor seperti konsentrasi PEG, aliran listrik dan waktu yang diberikan berpengaruh pada keberhasilan fusi antar protoplas.

Hibrid somatik asimetrik dan hibrid somatik simetrik dapat digunakan dalam program pemuliaan yang berbeda. Tanaman hibrid somatik simetrik yang muncuk untuk menghasilkan suatu cakupan luas variabilitas dalam genomik yang mengendalikan ciri, sedangkan tujuan hibrid somatik simetrik ialah untuk memperkecil kerugian-kerugian dari genom donor seperti halnya perpindahan ciri yang diinginkan, kromosom atau fragmen kromosom, dan menghasilkan lini spesifik (Xianlong, tanpa tahun).

Model fusi dari 'protoplas kalus embriogenik + protoplas mesofil' diadopsi secara luas pada fusi protoplas jeruk (Guo *et al.*, 2008). Tanaman sibirid diploid dari kombinasi G1 (*Citrus unshiu* Marc. Cv Guoqing No. 1, yang bertipe jantan mandul) + HBP (Hirado Buntan Pink Pummelo) (Guo *et al.*, 2004) memiliki bunga jantan mandul (Jude Grosser, komunikasi personal dalam Guo *et al.*, 2004), menegaskan bahwa CMS (*cytoplasmic male sterility*) dapat berfungsi di bawah nuklear asal. Bahkan, jika sibirid dan hybrid tidak mandul, mereka dapat tetap digunakan sebagai parental persilangan untuk pemuliaan tanpa biji yang lebih lanjut pada kedua tingkat diploid dan triploid (Cai *et al.*, 2009).

Produksi jeruk melalui fusi simetrik ialah tergantung pada genotip parental embriogenik dan kombinasi parental. Kemungkinan hasil tanaman hibrid yang diperoleh lebih tinggi ialah ketika resiko protoplas mesofil menjadi kalus/suspense sel yang digunakan dalam fusi juga lebih tinggi (Guo *et al.*, 2004).

Tanaman hibrid HBP yang mengandung sitoplasma Satsuma CMS, tetapi didapatkan hasil hibrid yang berbiji, dapat digunakan sebagai parental betina mono-embriogenik yang dapat digunakan dalam persilangan dengan Mandarin untuk menghasilkan Tangelo diploid tanpa biji (Guo *et al.*, 2004).

Regenerasi hibrid diploid melalui fusi simetrik pada jeruk tidaklah jarang, tetapi hanya sedikit laporan pada regenerasi tanaman tetraploid dengan genom nuklear ganda (*double nuclear genome*) dari parental mesofil diploid (Guo *et al.*, 2006). seperti hibrid diploid, hibrid tetraploid berasal dari keberhasilan fusi protoplas antara satu protoplas parental kalus embriogenik dan dua protoplas diploid dari parental mesofil (Guo *et al.*, 2006b).

2.4 Genom Inti dan Sitoplasma

Genom ialah keseluruhan bahan genetik yang membawa semua informasi pendukung kehidupan pada suatu makhluk hidup, baik yang merupakan gen atau bukan. Pada semua makhluk hidup, genom mencakup semua informasi genetik yang dibawa DNA, baik di inti sel (*nucleus*), mitokondria, maupun plastid (kloroplas) (Wikipedia, 2013; Olivares-Fuster, 2007).

Bahan genetik utama eukaryot terletak di dalam nucleus dan dikemas sedemikian rupa membentuk kromosom (*nuclear genome*). Selain kromosom, beberapa sel eukaryot juga mempunyai DNA di luar kromosom (bahan genetik ekstra) (*extra chromosomal genome*) yaitu DNA pada mitokondria dan kloroplas (pada sel tumbuhan hijau). Beberapa sel eukaryot juga memiliki DNA plasmid. DNA mitokondria dan kloroplas berupa molekul DNA lingkar dan replikasinya berlangsung secara independen, tidak tergantung pada replikasi kromosom.

Molekul DNA utama pada eukaryote berupa molekul untai-ganda dengan struktur linier. Bahan genetik utama jasad eukaryote terletak didalam inti sel (nukleus) dan dikemas sedemikian rupa membentuk struktur yang disebut kromosom. Jika diuraikan maka kromosom eukaryote sebenarnya berupa molekul

DNA linier yang sangat panjang dan dikemas dengan menggunakan protein histon. Bagian kromosom yang lebih rapat disebut heterokromatin. Heterokromatin konstitutif terdiri atas urutan nukleotida sederhana berulang, tidak mengandung gen, dan tidak pernah ditranskripsikan. Gen pada jasad eukaryote dapat dikelompokkan menjadi tiga kelas, yaitu gen kelas I (mengkode pembentukan rRNA 5,8S, rRNA 18S, dan rRNA 28S), gen kelas II (mengkode sintesis semua molekul protein), dan gen kelas III (mengkode pembentukan molekul tRNA dan rRNA 5S).

Endosymbionttheory dikemukakan oleh para ilmuwan, yang didasarkan pada observasi bahwa proses selama ekspresi gen dalam organel adalah sama atau serupa dengan proses yang terjadi di dalam bakteri. Inti dari *Endosymbionttheory* yaitu bahwa mitokondria dan kloroplas adalah reliks dari bakteri yang hidup bebas, dibentuk dari sekumpulan simbiosis dengan *precursor* dari sel eukaryote yaitu salah satu langkah yang sangat awal atau permulaan dari evolusi. Umumnya genom mitokondria dan kloroplas berbentuk molekul DNA yang sirkuler. Baik mitokondria dan kloroplas, mereka memiliki genom mereka sendiri. Struktur dari genom kloroplas sama dengan struktur genom mitokondria. Studi molekuler genom sitoplasmik menghadirkan tantangan lebih besar dibandingkan genotip nukleus karena nilai variasi yang rendah dari cpDNA dan mtDNA dibandingkan genom inti (Olivares-Fuster, 2007).

Genom organel berukuran kecil, sekitar ukuran setengah DNA virus atau RNA. Karakteristik dari DNA kloroplas (cpDNA) yaitu memiliki berat molekul 55×10^6 hingga 97×10^6 , bentuk DNA lingkar (sirkuler), panjangnya 419 μm , memiliki jumlah pasangan basa $1,3 \times 10^5$ hingga $1,5 \times 10^5$. DNA kloroplas berbeda dengan DNA nukleus dari spesies yang sama pada komposisi nukleotida. DNA plastid bereplikasi melalui *semi conservative mode* pada *Clamydomonas*. Pada spesies tanaman tingkat tinggi, replikasi DNA melalui *rolling circle method* (Miglani, 2007).

Molekul DNA kloroplas biasanya terdistribusi di dalam stroma kloroplas. Tidak diketahui bagaimana DNA kloroplas terkemas. DNA kloroplas memiliki rRNA, tidak memiliki histon. Pada sel daun tanaman tinggi, banyak fraksi DNA selular yang lebih besar dapat hadir dalam *energy converting organel*, dan fraksi

RNA yang lebih besar dan sintesis protein berlokasi disana. Disamping sejumlah kecil protein disandikan dalam genom tersebut, kloroplas membawa sendiri replikasi DNANYa, transkripsi DNA, dan sintesis protein. Proses ini bertempat dalam stroma dalam kloroplas. Meskipun protein yang menengahi proses genetik ini ialah unik ke organel, kebanyakan dari mereka disandikan dalam genom nukleus. Kloroplas juga mengandung ribosom dan DNA (Clark, 2005). Genom yang mengandung DNA untai ganda telah diteliti pada genom kloroplas Arabidopsis, yaitu memiliki gen 128 dan jumlah DNA 154.478 bp, dan jumlah kromosom 1 (*double strand DNA*).

Sekuen nukleotida lengkap telah mampu ditentukan untuk kloroplas tembakau dan *liver-wort*. Hasilnya menunjukkan bahwa dua tumbuhan ini memiliki gen kloroplas yang hampir serupa. Sebagai tambahan terhadap empat RNA ribosom, genom ini memindai sekitar 20 protein ribosom kloroplas, subunit yang terpilih RNA polymerase kloroplas, beberapa protein yang merupakan bagian dari fotosistem I dan II, subunit ATP *synthase*, bagian enzim kompleks dalam rantai transport elektron, satu dari dua subunit dari ribulose bisphosphate carbox-ylase, dan 30 tRNA. Sebagai tambahan, sekuen DNA yang hadir nampak untuk menyandi sedikitnya 40 protein yang fungsinya tak dikenal. Secara paradoks, semua protein yang disandi dalam kloroplas ialah bagian dari kompleks protein besar yang juga mengandung satu atau lebih subunit yang menyandi di dalam nukleus. Intron juga ditemukan dalam 20 gen kloroplas tanaman. Kebanyakan intron dalam gen organel mengandung sekuen nukleotida terkait yang mampu untuk menyambung diri mereka ke luar dari transkrip RNA oleh katalis *RNA-mediated*. Walaupun reaksi *self-splicing* ini biasanya dibantu oleh protein.

Kebanyakan protein di organel dikode oleh DNA nukleus, disintesis di dalam sitosol, dan kemudian di impor secara individual kedalam organel. Beberapa protein organel dan RNA dikode oleh organel DNA dan disintesis di dalam organel itu sendiri.

Genom kloroplas sekitar 10 kali lebih besar dari genom mitokondria dan mengandung sekitar 120 gen. organisasi genom kloroplas ialah sangat serupa dalam semua tumbuhan yang lebih tinggi, walaupun ukuran bervariasi dari spesies

ke spesies tergantung pada berapa banyak DNA melingkupi gen-gen yang menyandikan ribosomRNA kloroplas 16S dan 23S yang berada dalam dua kopi.

Tanaman yang lebih tinggi memiliki ukuran DNA kloroplas 120-200 ribu pasangan nuklotida. Kloroplas membuat protein mereka sendiri, mereka memiliki ribosom sendiri. Kloroplas tanaman memiliki subunit 30S dan 50S sama dengan mitokondria, yang mana subunit 30S menyandi ribosomRNA 16S yang menyandi protein 22-31 macam. Sedangkan subunit 50S menyandi ribosomRNA 23S, 5S, dan 4,5S yang menyandi protein 32-36 macam. Kloroplas tanaman yang lebih tinggi membuat sekitar 50 protein. Protein organel lainnya dikode oleh gen nukleus dan dibuat di ribosom sitoplasma. Yang kemudian diangkut ke dalam organel (Clark, 2005).

Kloroplas dan mitokondria terbagi secara independen pada sel eukariotik dimana mereka berada. Organel terbagi dengan *binary fusion* yang mengingatkan pada sel prokariotik. rRNA dari kloroplas mirip rRNA dari bakteri fotosintetik yang lebih baik daripada rRNA dari sel nukleus tanaman.

DNA organel mengkode untuk RNA ribosom (tetapi bukan untuk kebanyakan protein ribosom) dan sedikitnya sebagian dari RNA transfer yang digunakan dalam sintesis protein didalam mitokondria dan plastid. DNA yang sisanya tidak bias mengkode untuk polipeptida. Hanya sedikit yang teridentifikasi, termasuk beberapa polipeptida dari beberapa enzim yang dilibatkan dalam fotosintesis di kloroplas (Birky, 1976).

Kloroplas ialah organel yang berfungsi untuk memproduksi gula melalui fotosintesis pada tumbuhan dan alga. Genom ekstras nuklear mitokondria dan kloroplas bereplikasi secara independen dari pembelahan sel. Mereka bereplikasi atas suatu kebutuhan energi yang terus meningkat selama sel tersebut hidup.

Segregasi vegetatif diakibatkan oleh replikasi acak dan penyekatan organel sitoplasmik. Hal ini terjadi dengan kloroplas dan mitokondria selama pembelahan sel mitosis dan mengakibatkan *daughter cells* yang berisi suatu sampel acak sel organel parental. Gen kloroplas dapat juga menerima warisan reproduksi seksual uniparental. Sebagai contoh, kloroplas telah ditemukan untuk memperlihatkan model maternal, paternal dan bipaternal di dalam spesies yang sama.

Di dalam hampir semua eukariot, sedikitnya beberapa individu menerima warisan gen mitokondria dan kloroplas dari hanya satu paternal. Tidak ada mekanisme tunggal tentang pewarisan uniparental: pewarisan gen organel dihalangi oleh variasi mekanisme dan langkah-langkah reproduksi yang berbeda dalam spesies berbeda. Perubahan yang sering terjadi dalam pola pewarisan gen organel selama evolusi menyatakan bahwa hal tersebut mengarah pada bermacam-macam tekanan selektif. Gen organel sering gagal untuk berkombinasi kembali bahkan ketika menerima pewarisan biparental; sebagai konsekuensi, pewarisannya ialah aseksual. Reproduksi seksual kelihatannya lebih sedikit penting untuk gen didalam organel disbanding untuk gen nuklear, yang mungkin lebih sedikit keberadaannya. Sebagai hasilnya kelamin organel dapat hilang oleh karena pemilihan (seleksi) untuk corak reproduktif khusus seperti oogami atau sebab pewarisan uniparental mengurangi penyebaran parasit sitoplasmik dan DNA organel (Birky Jr., 1995)

Banyak tanaman menyimpang dari pola pewarisan maternal genom plastid dan mitokondria dengan beberapa spesies menunjukkan biparental atau bahkan transmisi pihak ayah satu atau kedua genom. Studi pewarisan genom tanaman mitokondria sangat rumit (Moreira *et al.*, 2002).

Biogenesis kloroplas berkoordinasi dengan perkembangan daun dan melibatkan kompleks yang saling mempengaruhi antara faktor oksogen dan endogen. Jalur sinyal transduksi yang mengatur perkembangan kloroplas seperti halnya mekanisme integrasi ekspresi organel dan gen nuclear selama proses, hanyalah sedikit dipahami (Chen *et al.*, 1999). Pewarisan kloroplas telah lebih baik dipelajari. Antar benih tanaman, kloroplas dapat diwariskan baik biparental maupun sebagian besar dari maternal atau paternal (Birky 1995 dalam Vaillancourt *et al.*, 2004).

Genom jeruk berukuran 380 Mb (Tomas *et al.*, 2003. Jeruk memiliki masa juvenile yang lama dan fenotipe tanaman CMS (*Cytoplasmic male sterility*) dikendalikan oleh interaksi nucleus-mitokondria (Cai *et al.*, 2009) Laporan sebelumnya menunjukkan bahwa genom sitoplasma Satsuma menghilang menyebabkan ekspresi genom CMS hanya ketika berkombinasi dengan nuklear asalnya (Cai *et al.*, 2009)

Analisis molekuler sebelumnya pada banyak hibrid somatic jeruk, menerangkan bahwa genom mitokondria biasanya diwariskan secara tidak acak (*non-randomly inheritance*) dari parental kalus embriogenik sementara genom kloroplas diwariskan secara acak (Guo *et al.*, 2004 dalam Guo *et al.*, 2008). Dipercaya bahwa genom sitoplasma mengontrol beberapa ciri agronomis. Seperti cpDNA berperan pada pewarisan beberapa ketahanan terhadap penyakit dan mtDNA berkaitan langsung dengan sitoplasmik mandul jantan (*cytoplasmic male sterility*) (Cheng *et al.*, 2003). Pada hibrid somatik interspesifik dan intergenerik dan sbrid jeruk, mtDNA diwariskan dari parental embriogenik, sementara cpDNA secara random diwariskan dari parental juga (Cheng *et al.*, 2003).

Cheng *et al.*, (2003) meneliti genom organel dari hibrid somatik intergenerik antara jeruk Valencia dan Meiwa kumkuat menggunakan penanda molekuler CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*), didapatkan bahwa kerugiannya yaitu jumlah kopi (*copy number*) dari wilayah yang diamplifikasi dalam CAPS tidak dapat diperoleh. Pola pita DNA organel juga berkaitan dengan pertumbuhan fenotip di lapang, semakin kompleks pola pita komposisi DNA organel, semakin baik pertumbuhan individu tanaman (Cheng *et al.*, 2003). Bukti sitologi dan molekuler menunjukkan bahwa nukleus mengontrol jumlah kopi dan transkripsi gen organel (Cheng *et al.*, 2003). Variasi pada kedua jumlah kopi mtDNA dan cpDNA ialah hasil dari interaksi baru yang kompleks antara nucleus-sitoplasma (Cheng *et al.*, 2003).

Sekuens nukleotida genom sitoplasma ialah jauh lebih lestari (*conserved*) dibanding genom nukleus (Olivares-Fuster, 2007). Konservatif alami genom kloroplas pada tanamantingkat tinggi membuatnya lebih digunakan untuk studi asal-usul dan taksonomi. Genom kloroplas berukuran kecil, gennya relatif terpelihara, *non-recombinan*, diwariskan secara uni-parental, dan secara efektif haploid, dapat memecahkan kerugian yang ditemui pada analisis penanda DNA nukleus (Cheng *et al.*, 2005)

2.5 Penanda Molekuler Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)

CAPS adalah suatu ide untuk membuat penanda molekuler dengan menggunakan produk PCR dengan enzim restriksi (Kurt Weising *et al.*, 2005).

Terdapat beberapa cara dalam melakukan teknik penanda, namun PCR-RFLP dan CAPS adalah yang paling sering digunakan. Teknik penanda CAPS dapat dilakukan dalam dua tahapan. Pada tahapan pertama, urutan DNA yang telah ditentukan, diamplifikasi menggunakan sepasang primer urutan tertentu. Hal ini mungkin mengakibatkan fragmen PCR menjadi berbeda ukuran dan lebih informatif. Kemudian pada tahapan kedua, produk PCR diproses (*digested*) dengan enzim restriksi, biasanya dengan menggunakan empat-basa (*four-base recognition specificity*). Produk hasil amplifikasi yang telah diproses (*digested*), mungkin atau mungkin juga tidak menunjukkan polimorfisme setelah mengalami pemisahan pada gel agarose (Kurt Weising *et al.*, 2005).

Berbanding terbalik dengan pendekatan RFLP konvensional, pendekatan CAPS tidak memerlukan penggunaan radioaktif atau langkah blotting, melainkan menunjukkan semua teknik khusus yang menarik dari teknik yang berbasis pada PCR. Karena DNA yang telah diAmplifikasi secara *in vitro* tetap menunjukkan keadaan *unmethylated*, Teknik penanda CAPS juga sensitif terhadap metilasi DNA. Sama halnya dengan teknik penanda RFLP, teknik penanda CAPS juga merupakan kodominan. Beberapa kemungkinan untuk membedakan antara bentuk homozigot atau heterozigot membuat prosedur menjadi lebih menarik dalam pemetaan (Drenkard *et al.*, 1998 dalam Kurt Weising *et al.*, 2005). Karena yang disasarankan hanya sub-*set* dari substitusi basa, sedangkan sedikit dari penyisipan yang seharusnya terhapus mungkin luput dari deteksi. Uji CAPS menghasilkan informasi yang lebih sedikit dari teknik analisis urutan langsung melalui PCR. Dengan adanya penghematan biaya untuk sekuensing DNA, karena itu teknik penanda CAPS diharapkan akan diganti oleh teknik sequencing secara langsung (misalnya di *phylogeography*) (Kurt Weising *et al.*, 2005).

Pada prinsipnya, teknik penanda CAPS dapat dihasilkan baik dari DNA inti ataupun DNA organellar. Konieczny dan Ausubel (1993) menganalisis bahwa fragmen DNA inti *Arabidopsis* sudah dipetakan sampai pada ke lengan kromosom tertentu. Sedangkan Purugganan dan Wessler (1998) memperkuat dan memproses (*digested*) fragmen DNA dari elemen magellan jagung transposabel dalam varian CAPS menciptakan tanda transposon. Pada tanaman, terdapat tempat tertentu yang telah ditetapkan pada genom kloroplas, telah menjadi sasaran utama

untuk melakukan pendekatan teknik penanda CAPS. Dengan demikian, variasi untuk tempat PCR-amplified cpDNA telah diterapkan secara luas untuk merekonstruksi filogenetik pada berbagai tingkat taksonomi (Jansen et al., 1998; Olmstead, 1994; Palmer, 1988 dalam Kurt Weising *et al.*, 2005). Uji CAPS juga dapat memfasilitasi dalam penyaringan untuk intraspesifik cpDNA RFLP, yang jarang terdeteksi dengan metode tradisional (Soltis *et al.*, 1992 dalam Kurt Weising *et al.*, 2005).

Akibatnya penanda molekuler CAPS terhadap kloroplas menjadi alat standar untuk analisis filogeographik dibawah tingkat spesies. Dalam studi ini, sekuens noncoding cpDNA diamplifikasi oleh PCR dengan sepasang primer universal yang mengikat ke basa sekuen yang telah ditentukan dan diperbanyak. Hasil perbanyak (*Aliquots*) dari produk PCR yang dihasilkan diproses (*digested*) dengan salah satu set enzim restriksi, dan polimorfisme yang telah diidentifikasi serta digabung menjadi cpDNA rekombinan yang bersifat haplotipe. Jaringan parsimoni statistik dapat direkonstruksi, sehingga mencerminkan jarak genetik antar haplotipe. Membandingkan hubungan genetik dengan pola distribusi geografis telah menghasilkan manfaat yang penting, misalnya, pola rute suksesi sekunder spesies pohon ke eropa tengah pada zaman postglacial (Kurt Weising *et al.*, 2005).

2.5.1 Analisis CAPS dengan DNA Mitokondria

Penanda molekuler CAPS dilakukan dengan cara memotong (*digest*) produk PCR dengan enzim restriksi. Bila dilakukan pendekatan secara eksperimen, CAPS juga dikenal sebagai PCR-RFLP, pengerjaannya cukup sederhana. Pada langkah pertama dari percobaan CAPS, produk PCR yang telah ditentukan, diAmplifikasi dari DNA inti atau organellar, menggunakan primer yang telah dilengkapi dengan urutan basa yang sudah ditentukan (Kurt Weising *et al.*, 2005).

Pada langkah kedua, produk PCR diproses dengan satu atau lebih enzim restriksi, dan visualisasi dari polimorfisme yang telah diberi enzim restriksi, ditampilkan dengan elektroforesis pada gel agarosa dan pewarnaan ethidium bromida. Gel non-denaturing PAA dan gel SSCP juga digunakan bersamaan.

Untuk mengidentifikasi kombinasi yang cocok dari amplicon dan enzim restriksi yang digunakan perlu ditentukan secara matang selama tahap awal proyek CAPS, dengan menggunakan satu set kecil template percobaan. Kombinasi amplicon dan enzim restriksi yang telah diuji dan menunjukkan informasi polimorfisme yang paling informatif, yang kemudian diterapkan pada set DNA lengkap organisme yang diselidiki (Kurt Weising *et al.*, 2005).

2.5.2 Pilihan Beberapa Primer untuk Teknik Penanda CAPS

Pasangan primer CAPS biasanya hanya bekerja pada daerah genom tertentu dengan urutan basa yang telah diketahui. Misalnya, Konieczny dan Ausubel (1993) merancang 18 set primer berdasarkan pada peta dan urutan basa bagian dari DNA inti *Arabidopsis thaliana*, dan telah menerapkan 18 set primer tersebut untuk percobaan pemetaan genetik. Semispesifik primer juga dapat digunakan (misalnya, dalam modifikasi teknik RAPD). Teknik penanda CAPS yang berasal dari genom organellar telah menjadi acuan yang paling sering digunakan untuk mempelajari filogenetik dan khususnya filogeographik (Kurt Weising *et al.*, 2005). Pada tanaman, percobaan ini telah difasilitasi dengan adanya ketersediaan pasangan dari berbagai pasangan primer yang memperbanyak urutan basa yang diinginkan dari kedua genom mitokondria, maupun dari genom kloroplas (Kurt Weising *et al.*, 2005). Chen (1999) menunjukkan bahwa analisis CAPS yang disempurnakan terhadap spesies *Spiranthes (Orchidaceae)* dapat dicapai melalui penggabungan tiga pasang mtDNA-pasangan primer spesifik, sehingga dapat meng-Amplifikasi daerah tertentu (*intronic*) dari *nicotinamide adenin dinukleotida (NADH) gen dehidrogenase*.

Penelitian ini menggunakan metode CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphism Sequences*) dengan 2 pasangan primer universal seperti yang dideskripsikan oleh Demasure *et al.*, (1995), dimana dilakukan pengujian optimasi waktu bersamaan dengan kombinasi dari enzim restriksi endonuclease (*TasI, HindIII, dan EcoRI*). Pasangan primer universal yang digunakan pada penelitian ini adalah pasangan primer universal untuk genom mitokondria yaitu *nad1exonB/nad1exonC* dengan sekuens basa nitrogen

5' _GCATTACGATCTGCAGCTCA_3'/5' _GGAGCTCGATTAGTTTCTGC_3'
dan *18S_rRNA_F/18S_rRNA_R* dengan sekuens basa nitrogen

5'GTGTTGCTGAGACATGCGCC_3'/5' _ATATGGCGCAAGACGATTCC_3'
(Cheng *et al.*, 2003).

Primer mitokondria digunakan pada proses amplifikasi dengan cara membandingkan dengan basa nitrogen dari primer yang juga digunakan oleh tanaman *Zea mays*, *Oryza sativa*, dan *Nicotiana tabacum* dimana untuk sekuens basa nitrogennya didapatkan dari Organelle Genome Megasequencing Program (OGMP: <http://megasun.bch.unmontreal.ca>) . Pasangan primer lainnya telah juga diidentifikasi oleh Demasure *et al.*, 1995.

Setelah melalui proses PCR atau amplifikasi dengan alat thermocycler. Maka tabung vial yang berisikan DNA template dan primer siap untuk tahapan selanjutnya yaitu *digestation*(pemotongan) dengan menggunakan enzim restriksi. Pemotongan dengan enzim restriksi dilakukan dengan cara diinkubasi pada rentang waktu tertentu dan pada suhu 37⁰C. Terdapat beberapa macam enzim restriksi yang digunakan pada penelitian ini. Diantaranya:

1. Eco RI
 - a. Konsentrasi : 10 u/μl
 - b. Sumber : bakteri *E.coli* yang membawa gen cloning *ecoRIR* dari *Escherichia coli* RY13
 - c. Disertakan dengan : 2 x 1 ml buffer EcoRI 10x dan 1 ml buffer tango 10x (Anonymous^b, 2013)
2. Hind III
 - a. Konsentrasi : 10 u/μl
 - b. Sumber : bakteri *Haemophilus influenzae* Rd
 - c. Disertakan dengan : 2 x 1 ml buffer R 10x dan 1 ml buffer tango 10x (Anonymous^b, 2013)

3. Tas I

- a. Konsentrasi : 10 u/ μ l
- b. Sumber : bakteri *Thermus aquaticus* Vn4-211
- c. Disertakan dengan : 1 x 1 ml buffer B 10x dan 1 ml buffer tango 10x (Anonymous^b, 2013)



3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan dari bulan April-Juni 2013 di Laboratorium pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO) Tlekung, Kecamatan Junrejo, Kota Batu.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan ialah mortar, pestel, gelas ukur, erlenmeyer, *timer*, *beaker glass*, *stirrer*, mikropipet, timbangan analitik, vortex, tabung eppendorf, mesin spektrofotometer, *autoclave*, *waterbath*, mesin *centrifuge*, mesin elektroforesis, mesin PCR dan alat *biodoc analyze*.

Bahan yang digunakan ialah daun muda dari 50 tanaman jeruk fusan dan kedua parentalnya (Siam Madu dan Mandarin Satsuma), aquades, alcohol 70%, mercaptoethanol, pvp (polyvinyl pyrrolidone 10), buffer ekstrasi, ammonium asetat, CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), Chloform:Isoamylalcohol (24:1) (CHISAM), ethanol dingin, isopropanol dingin, buffer TE, buffer pencuci, RNase (Roche), ethanol 96 % dingin, Agarose SPI (Duchefa Biochemie), Agarose Molecular Screening (Roche), buffer TBE, PCR mix (Fast Start PCR Master, Roche), Aqua bidestilata steril (Ikapharmindo), DNA ladder 100 bp (Promega), Ethidium Bromide (EtBr), loading dye (Fermentasi; Promega) dan menggunakan 2 pasang primer mtSSR (*forward* dan *reverse*) yaitu primer 18S rRNA-5S rRNA dan nad1 exonB-nad 1 exon C (Lathar *et al.*, 2010).

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Pengambilan sampel

Sampel daun berasal dari daun 50 tanaman jeruk fusan dan jeruk tetua (Siam Madu dan Mandarin Satsuma) yang telah berumur 3 tahun. Daun diambil dan dibersihkan dengan alcohol 70 % lalu ditimbang tanpa tulang daunnya sebanyak 0,3 gram.

Tabel 1. Pengambilan sampel daun tanaman jeruk untuk isolasi DNA

Label	Kode Sampel	Label	Kode Sampel	Label	Kode Sampel
FS 31	F1	FS 3	F11	FS 79	F21
FS 74	F2	FS 13	F12	FS 56	F22
FS 12	F3	FS 1	F13	FS 109	F23
FS 75	F4	FS 96	F14	FS 64	F24
FS 105	F5	FS 49	F15	FS 89	F25
FS 70	F6	FS 71	F16	FS 107	F26
FS 100	F7	FS 57	F17	FS 87	F27
FS 15	F8	FS 69	F18	FS 10	F28
FS 90	F9	FS 77	F19	FS 66	F29
FS 101	F10	FS 86	F20	FS 83	F30
Label	Kode Sampel	Label	Kode Sampel	Label	Kode Sampel
FS 76	F31	FS 27	F41	P.SIAM MADU	F51
FS 14	F32	FS 102	F42	P.MANDARIN	F52
FS 91	F33	FS 21	F43	FS 2	F53
FS 18	F34	FS 54	F44	FS 32	F54
FS 52	F35	FS 25	F45	FS 29	F55

FS 4	F36	FS 20	F46	FS 58	F56
FS 6	F37	FS 94	F47	FS 22	F57
FS I 2	F38	FS 7	F48	FS 97	F58
FS 19	F39	FS 11	F49	FS 62	F59
FS 41	F40	FS 23	F50	FS 84	F60
FS 5	F61	FS 17	F63		
FS 8	F62				

Isolasi DNA

Penggunaan DNA volume kecil didapatkan dengan menggunakan metode CTAB (Doyle dan Doyle, 1987). Buffer ekstraksi (buffer CTAB) sebanyak 1 ml (15 ml CTAB 3 %; 14 ml NaCl 1,4 M; 4 ml EDTA 20 mM; 5 ml Tris-HCL 100 mM dan dH₂O 12 ml) dan mercaptoethanol 30 µl dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu 65⁰ C selama 30 menit. Sampel daun sebanyak 0,3 gram bersamaan dengan diberikannya pvp, digerus di dalam mortar hingga menjadi serbuk. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf berukuran 2 ml yang telah berisi buffer ekstraks. Penambahan mercaptoethanol sebanyak 30 µl dilakukan di dalam ruang asam atau di *Laminar Air Flow* (LAF). Kemudian dihomogenisasi dengan menggunakan vortex selama 2 – 5 menit dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65⁰ C selama 30 menit. Setiap 10 menit tabung eppendorf digoyang atau dibolak-balik (*inverting*). Setelah 30 menit tabung eppendorf berukuran 2 ml diangkat dari *waterbath* dan didiamkan untuk pendinginan selama 2 menit. Selanjutnya ditambahkan dengan $\frac{1}{10}$ volume 3 M Na. Asetat atau setara dengan 100 µl dan 1000 µl Chloroform:Isoamylalcohol (CHISAM) (24:1) atau sampai penuh, lalu dihomogenisasi dengan

menggunakan vortex selama 2 – 5 menit. Lalu dipisahkan dengan menggunakan mesin sentrifuge berkecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Kemudian supernatant (bagian atas) diambil dan dimasukkan ke tabung eppendorf yang baru dan memiliki ukuran lebih kecil yaitu 1,5 ml. Lalu ditambahkan 1 ml CHISAM atau sampai memenuhi tabung eppendorf, sehingga menjadi satu volume. Kemudian dilakukan penggoyangan (*shaking*) secara perlahan (*gently*). Kemudian dipisahkan dengan menggunakan mesin sentrifuge berkecepatan 12000 rpm selama 6 menit. Kemudian diambil fase atasnya lalu ditambah dengan $\frac{1}{10}$ 3 M Na Asetat atau setara dengan 100 μ l dan ditambahkan dengan $\frac{2}{3}$ volume isopropanol dingin atau setara dengan 450 μ l ke dalam tabung eppendorf. Sebelum ditambahkan Na.Asetat dan Isopropanol, supernatant dipindahkan dengan mikropipet ke dalam tabung eppendorf yang baru dan masih berukuran 1,5 ml. Kemudian digoyangkan secara perlahan (*gently*). Kemudian dipisahkan dengan menggunakan mesin sentrifuge berkecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Setelah mengalami pemisahan dalam sentrifuge, tabung eppendorf diambil dan dibuang cairan supernatannya secara hati-hati hingga menyisakan endapan DNA (pellet). Setelah itu ditambahkan ethanol atau alcohol 70 % ke dalam tabung eppendorf yang berisikan endapan DNA (pellet) tadi. Kemudian dipisahkan dengan menggunakan mesin sentrifuge berkecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Setelah dilakukan pemisahan oleh sentrifuge, tabung eppendorf diangkat dan dibuang cairannya sampai benar-benar tersisa endapan DNA (pellet). Pembuangan cairan di dalam tabung eppendorf harus dilakukan dengan sangat hati-hati, hal ini untuk mengantisipasi terbawanya endapan DNA (pellet) keluar tabung. Tabung eppendorf yang berisikan endapan DNA (pellet) dikeringanginkan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) atau bisa di ruangan lab terbuka dengan sirkulasi udara yang aman selama 17 jam. Bersamaan dengan itu, siapkan tabung eppendorf baru berukuran 2 ml yang berisikan campuran antara RNase dan buffer TE dengan perbandingan (1,5 μ l : 500 μ l). Pindahkan dengan mikropipet campuran tadi ke dalam tabung eppendorf yang telah dikeringanginkan selama 17 jam dengan ukuran 200 μ l per tabung eppendorf. Kemudian diinkubasi di dalam waterbath pada

suhu $37,5^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit. Setelah itu tabung diangkat dan di-*flip* (diketuk-ketuk), agar endapan DNA tercampur dengan larutan tadi dan disimpan pada suhu -4°C hingga digunakan.

3.3.2 Pengukuran kualitas DNA

Setelah sampel DNA diperoleh, selanjutnya untuk mengetahui kualitas DNA dilakukan elektroforesis dengan menggunakan 1% agarose SPI (Duchefa Biochemie), yang dilarutkan di dalam TBE 0,5x. langkah-langkah elektroforesis yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- a) Agarose 1 % sebelumnya ditimbang terlebih dahulu sebesar 0.32 g, dilarutkan ke dalam 40 ml TBE 0.5x, kemudian dipanaskan di atas tungku, didiamkan sampai hangat-hangat kuku (45°C) dan ditambahkan Ethium Bromide (EtBr) $\frac{1}{10.000}$ volume lalu dituang ke dalam palet/cetakan sampai menjadi keras.
- b) Gel direndam ke dalam *elektroforesis chamber*, namun terlebih dahulu *elektroforesis chamber* direndam dengan TBE 0.5x sampai setengah batas. Sampel yang akan digunakan sebanyak 5 μl DNA dan 1 μl *loading dye* yang kemudian dimasukkan ke dalam sumur (*wells*).
- c) Untuk dua sumur (*wells*) yang paling kiri, dimasukkan larutan *lambda* 5 μl dan 10 μl yang telah dicampur dengan 1 μl *loading dye* sebagai DNA pembanding
- d) Elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 50 menit.
- e) Visualisasi hasil elektroforesis diatas lampu ultraviolet dengan menggunakan alat Biodoc Analyze.

Untuk mengetahui nilai konsentrasi DNA, dilakukan pengukuran secara manual dengan cara membandingkan *band* dari *lambda* dan band dari tanaman sampel. Setiap larutan *lambda* 5 μl berisikan DNA sebanyak 2286 ng, jika *lambda* 10 μl maka DNA yang dikandungnya 2 x 2286 ng. Dengan menggunakan alat bantu berupa penggaris kita menarik garis lurus dari *lambda* sebagai bagian untuk penyetaraan. Kemudian kita membandingkan luas daerah dari *lambda* dengan luas daerah band dari DNA tanaman sampel.

Jika luas daerah tanaman sampel 3 kali lebih besar dari luas daerah lambda 10 µl maka dapat kita kalkulasikan bahwa nilai konsentrasi DNA nya sebesar $3 \times 2 \times 2286$ ng, demikian seterusnya.

3.3.3 Standar Prosedur Penggunaan Penanda Molekuler CAPS

3.3.3.1 Amplikasi DNA dengan PCR

Untuk analisa CAPS, digunakan dua pasang primer universal untuk mitokondria yaitu 18S rRNA-5S rRNA (forward: 5'-n-GTG TTG CTG AGA CAT GCG CC-3', reverse: 5'-ATA TGG CGC AAG ACG ATT CC-3') dan nad 1_exon B-nad 1_exon C (forward: 5'-n-GCA TTA CGA TCT GCA GCT CA-3', reverse: 5'-GGA GCT CGA TTA GTT TCT GC-3') (Cheng *et al.*, 2003). Reaksi PCR dibuat sebanyak 40 µl yang terdiri dari 16 µl Dream *Taq*, masing-masing primer forward dan reverse 5 µl, 8 µl DNA sampel, dan 6 µl ddH₂O.

Penggunaan prosedur penggunaan CAPS berikut untuk menghasilkan penanda molekuler CAPS dari penanda cpDNA non-coding pada berbagai jenis tumbuhan, dengan menggunakan pasangan primer seperti yang telah dikemukakan oleh Demasure *et al.*, 1995; Grivet *et al.*, 2003 dalam Kurt Weising *et al.*, 2005. Prosedur penggunaan dengan mudah dapat disesuaikan sesuai dengan organisme dan genom yang dijadikan sampel. Untuk prosedur nya secara umum terkait dengan eksperimen PCR:

1. Larutan campuran, larutan campuran terdiri dari:

- a. Dream*Taq* : 16 µl
- b. PCR primer : 5 µl masing-masing primer *forward* dan *reverse*
- c. Template DNA: 8 µl
- d. ddH₂O : 6 µl

2. Gunakan tabung vial yang memiliki dinding tipis untuk dapat digunakan sebagai tabung PCR memiliki volume 50 µl. Campur larutan, dan vials dihomogenkan dengan alat sentrifuge.

3. Thermocylers tua mungkin tidak dilengkapi dengan tutup penahan panas. Dalam hal ini, larutan perlu dilakukan penambahan (*overlay*) dua atau tiga tetes minyak mineral untuk mencegah penguapan.

4. Masukkan tabung ke thermocycler dan mulai untuk menjalankan program yang diinginkan. Disarankan untuk melakukan penggunaan program berikut:

- a. 3 menit pada 94°C (langkah denaturasi awalan)
- b. 30 siklus yang terdiri dari:
 - i. 30 detik pada 94°C (denaturasi)
 - ii. 45 detik pada 50 sampai 65°C (annealing)
Suhu untuk annealing tergantung pada panjang dan isi dari tabung vial. Sebuah percobaan awal mungkin dapat memfasilitasi percobaan percontohan untuk mengoptimalkan suhu annealing. Jika terdapat larikan (*band*) yang tak terduga menunjukkan masalah yang spesifik, disarankan untuk menghentikan prosedur.
 - iii. 90 detik pada 72°C (elongasi)
 - iv. 3 menit pada 72°C (langkah elongasi akhir)
 - v. 10 menit pada 4°C (langkah pendinginan)

Untuk pemberian label pada tabung vial PCR mengacu pada keterangan sebagai berikut ini :

- 1) Untuk pemberian label pada DNA template sesuai dengan nomor urut perlakuan
- 2) Untuk pemberian label pada DNA yang telah diberi primers adalah sebagai berikut:
 - a. ...-1 : untuk menerangkan adanya primers nad 1 exon B & C pada DNA template tersebut
 - b. ...-I : untuk menerangkan adanya primers 18s_RNA F & R pada DNA template tersebut.

3.3.3.2 Inkubasi dengan enzim restriksi

Setelah melalui proses PCR atau amplifikasi dengan alat thermocycler. Maka tabung vial yang berisikan DNA template dan primer siap untuk tahapan selanjutnya yaitu *digestation* (pemotongan) dengan menggunakan enzim restriksi. Pemotongan dengan enzim restriksi dilakukan dengan cara diinkubasi pada rentang waktu tertentu dan pada suhu 37⁰C. Terdapat beberapa macam enzim restriksi yang digunakan pada penelitian ini. Diantaranya:

1. Eco RI
 - a. Konsentrasi : 10 u/μl
 - b. Sumber : bakteri *E.coli* yang membawa gen cloning *ecoRIR* dari *Escherichia coli* RY13
 - c. Disertakan dengan : 2 x 1 ml buffer EcoRI 10x dan 1 ml buffer tango 10x (Anonymous^b, 2013)
2. Hind III
 - a. Konsentrasi : 10 u/μl
 - b. Sumber : bakteri *Haemophilus influenzae* Rd
 - c. Disertakan dengan : 2 x 1 ml buffer R 10x dan 1 ml buffer tango 10x (Anonymous^b, 2013)
3. Tas I
 - a. Konsentrasi : 10 u/μl
 - b. Sumber : bakteri *Thermus aquaticus* Vn4-211
 - c. Disertakan dengan : 1 x 1 ml buffer B 10x dan 1 ml buffer tango 10x (Anonymous^b, 2013)

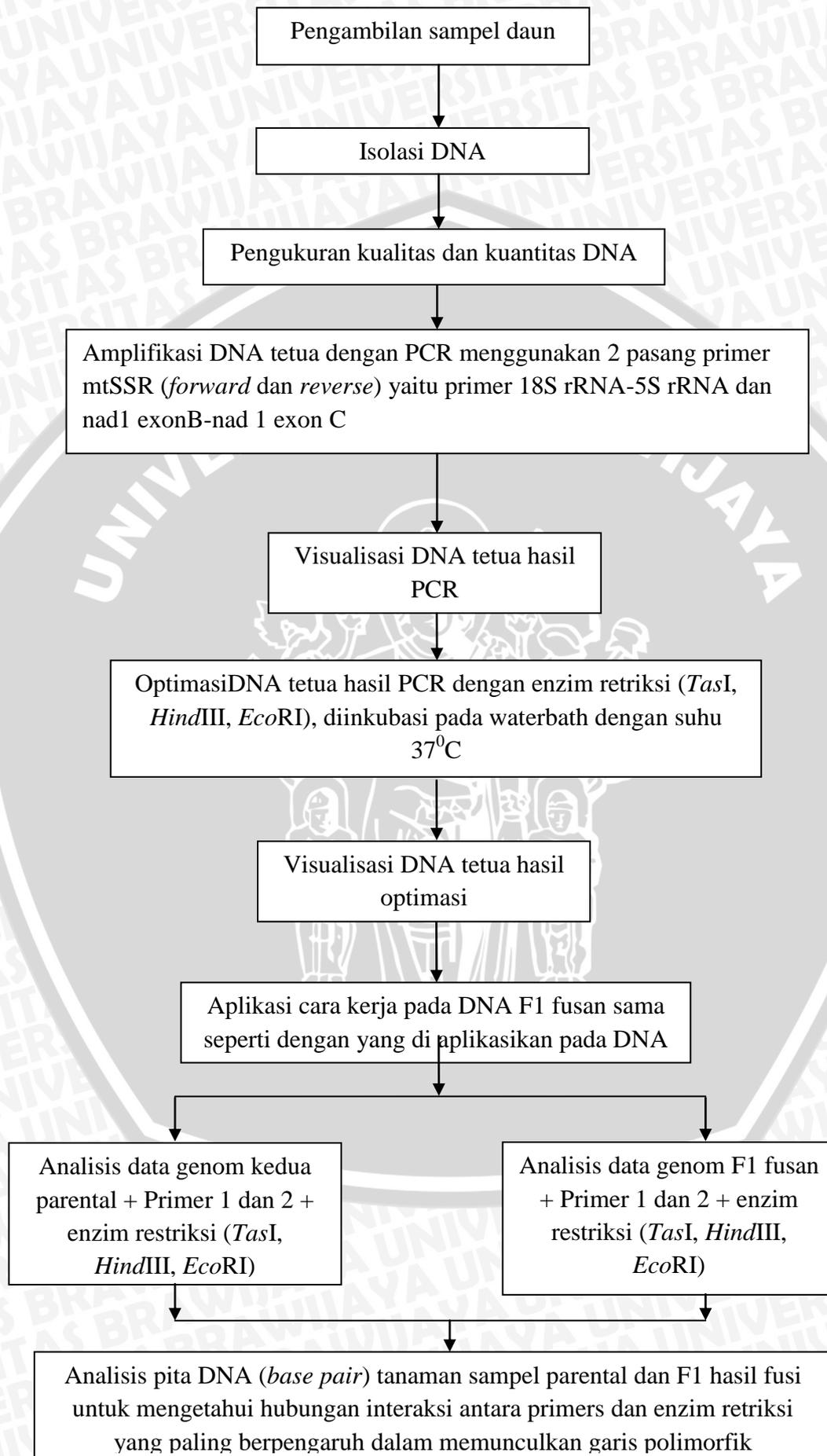
Untuk metode pelaksanaan pemotongan dengan enzim restriksi dijelaskan dengan kerangka operasional sebagai berikut:

Kerangka Operasional

Tanaman hasil fusi protoplas antara jeruk Siam Madu dan Mandarin Satsuma

Tanaman parental jeruk Siam Madu dan Mandarin Satsuma





Gambar 1. Kerangka operasional analisis molekuler berdasarkan penanda molekuler mitokondria (mtSSR) dengan metode CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) tanaman hasil fusi protoplas antara jeruk Siam Madu dengan Mandarin Satsuma.

Hal pertama yang dilakukan untuk menguji enzim restriksi secara berurutan adalah sebagai berikut:

1) Optimasi DNA parental

Optimasi DNA parental dilakukan sebagai percobaan percontohan dan juga untuk mengetahui rentang waktu inkubasi yang optimal. Terdapat 3 perangkat yang perlu untuk dipersiapkan, diantaranya sebagai berikut:

a) Waktu uji coba

Untuk penentuan waktu optimasi perendaman yang paling efektif, maka dilakukan kegiatan penelitian pada tanggal 7 April 2013 dengan acuan sebagai berikut:

Tabel 2. Waktu optimasi dan waktu perlakuan

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

b) Alat dan bahan

- Siapkan 4 buah gabus yang telah dilubangi sebanyak 12 lubang per masing-masing gabus. Gabus tersebut diberikan pelabelan untuk memudahkan dalam uji coba sesuai dengan jam perlakuan.
- Siapkan tabung vial sebanyak 12 x 4 gabus/perlakuan yaitu 48 tabung vial, dengan keterangan label per masing-masing gabus/perlakuan sebagai berikut :
 - 51-a-A : tetua no 51 (Siam Madu) + primer nad 1 exon C&B + enzim *ecoRI*
 - 51-b-A : tetua no 51 (Siam Madu) + primer 18S_RNA F&R + enzim *ecoRI*
 - 52-a-A : tetua no 52 (Mandarin Satsuma) + primer nad 1 exon C&B + enzim *ecoRI*
 - 52-b-A : tetua no 52 (Mandarin Satsuma) + primer 18S_RNA F&R + enzim *ecoRI*
 - 51-a-B : tetua no 51 (Siam Madu) + primer nad 1 exon C&B + enzim *Hind III*
 - 51-b-B : tetua no 51 (Siam Madu) + primer 18S_RNA F&R + enzim *Hind III*
 - 52-a-B : tetua no 52 (Mandarin Satsuma) + primer nad 1 exon C&B + enzim *Hind III*
 - 52-b-B : tetua no 52 (Mandarin Satsuma) + primer 18S_RNA F&R + enzim *Hind III*
 - 51-a-C : tetua no 51 (Siam Madu) + primer nad 1 exon C&B + enzim *Tas I*
 - 51-b-C : tetua no 51 (Siam Madu) + primer 18S_RNA F&R + enzim *Tas I*
 - 52-a-C : tetua no 52 (Mandarin Satsuma) + primer nad 1 exon C&B + enzim *Tas I*
 - 52-b-C : tetua no 52 (Mandarin Satsuma) + primer 18S_RNA F&R + enzim *Tas I*

2) Visualisasi DNA tetua hasil optimasi

- 3) Aplikasi hasil optimasi ke DNA F1 Fusan
- 4) Visualisasi DNA F1 Fusan
- 5) Analisis genom DNA F1 Fusan dan DNA parental
- 6) Mulai dengan mengatur uji enzim restriksi secara terpisah untuk setiap kombinasi produk-enzim, yang mengandung 9 μ l aquadest, 2 μ l buffer restriksi 10x, 8 μ l PCR, dan 1 μ l dari enzim restriksi. Khusus untuk 8 μ l produk PCR, banyak enzim restriksi yang dapat aktif dalam buffer PCR standar. PCR dan restriksi dapat dilakukan secara bersamaan dalam tabung yang sama. Namun, disarankan untuk melakukan percobaan percontohan untuk menghindari masalah akibat pemotongan bagian yang tidak diinginkan (*star activity*) di bawah kondisi sub-optimal. Jika *star activity* dicurigai, atau jika enzim restriksi pilihan terbukti tidak aktif dalam PCR mix, produk PCR tersebut perlu dimurnikan terlebih dahulu sebelum diproses (*digest*). Hal ini paling mudah dilakukan adalah menggunakan dengan perlengkapan atau PCR mix yang dijual secara komersial. 50 μ l PCR cukup diproses (*digest*) dengan lima enzim restriksi yang berbeda, masing-masing enzim restriksi dikombinasikan dengan 8 μ l produk PCR. Jika diinginkan, 10 μ l tersisa dapat digunakan untuk mengetahui ukuran yang benar dari satu fragmen utuh.

- Campur dengan hati-hati dan dihomogenkan dengan sentrifuge selama beberapa detik untuk mendapatkan bahan yang diinginkan, yang terletak di bagian dasar tabung.
- Inkubasi selama kurang lebih 3 jam pada suhu inkubasi yang direkomendasikan oleh produsen enzim (sebagian besar enzim menghendaki suhu 37⁰ C).
- Campur dengan 0,2 volume larutan buffer loading dan bagian yang telah ditentukan ke dalam gel agarosa yang berukuran 1,0-2,0%.

Konsentrasi agarosa yang optimal tergantung pada distribusi ukuran penanda CAPS. Pada tahap percobaan percontohan teknik penanda CAPS, kondisi saat elektroforesis dapat dioptimalkan dengan

cara memisahkan sampel kerja (*digested samples*) menjadi dua atau sampai beberapa hasil perbanyakkan (*Aliquots*), yang masing-masing sampel dipisahkan pada gel agarosa persentase yang berbeda (misalnya sampel untuk gel agarosa 1% dan 2%). Kita mampu untuk mendapatkan resolusi tinggi suatu fragmen (<400 bp), misalnya, dengan menggunakan campuran antara gel agarosa konvensional 1% dengan 2% NuSieve GTG agarosa (atau agarosa yang dijual secara komersil yang telah dirancang untuk digunakan pada konsentrasi larutan yang tinggi).

- Teteskan dengan etidium bromida, dan hasilnya dapat divisualisasi dan dilakukan dokumentasi.

Amplifikasi berlangsung sebagai berikut: 1 siklus denaturasi awal pada 94°C selama 3 menit, 32 siklus denaturasi pada 94°C selama 1 menit, 40 siklus annealing pada 55°C, 2 menit elongasi pada 72°C, langkah terakhir pada 72°C selama 10 menit, selanjutnya penyimpanan pada 4°C. pemotongan DNA dilakukan dengan cara menambahkan 5 unit enzim restriksi *TasI* (MBI Fermentasi) pada 5 hingga 8 µl produk PCR. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam.

3.3.4 Visualisasi dan Dokumentasi

DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi divisualisasikan melalui gel elektroforesis 0.5x TBE dan 5µg/ml ethidium bromide pada 100 V/cm selama 30 menit. Produk divisualisasikan diatas lampu ultraviolet dengan menggunakan alat BiodocAnalyze.

Pita DNA hasil Amplifikasi (amplikon) diinterpretasikan sebagai data kualitatif, dengan cara melihat kehadiran atau ketidakhadiran larik DNA dari 50 tanaman jeruk hasil fusi protoplas (F1) antara jeruk Siam Madu dengan Mandarin Satsuma, serta dari kedua parentalnya pada hasil Amplifikasi.

Sehingga dapat diinterpretasikan mengenai kombinasi terbaik antara primer dan enzim restriksi yang paling banyak memunculkan polimorfisme pada tanaman sampel baik parentalnya maupun F1 hasil fusi protoplasnya.

4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Isolasi DNA

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, 1987). 2 pasangan primer digunakan untuk mengidentifikasi sifat CMS (*Cytoplasmic Male Sterility*) pada mitokondria diantara 63 sampel dari fusi protoplasma dan parentalnya. Kriteria pengambilan sampel tanaman jeruk fusi yang akan diekstraksi adalah tanaman yang sudah memiliki buah, umur tanaman > 3 tahun, sedangkan untuk daun yang diambil adalah daun yang masih muda yang memiliki warna hijau muda (*lampiran 8*).

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. Hal ini akan dijelaskan pada poin hasil selanjutnya.

4.1.2 Uji Kualitas DNA

Metode CAPS adalah metode yang menggunakan bahan dasar DNA hanya sedikit yaitu sebesar 100 ng. Sehingga perlu dilakukan pengenceran DNA dari DNA bank yang diektraksi. Namun sebelumnya perlu dilakukan uji kualitas untuk mengetahui jumlah DNA pada DNA bank. Berikut adalah tahapan-tahapan untuk melakukan uji kualitas:

- 1) Persiapan dan pembuatan gel agarosa
- 2) Persiapan elektroforesis
- 3) Pembacaan DNA hasil elektroforesis dengan menggunakan Biodoc Analyze

Untuk pembacaan DNA dengan menggunakan alat Biodoc Analyze. Pembacaan DNA bisa dilakukan ketika proses elektroforesis selesai. Secara hati-

hati gel agarose dipindahkan dari mesin elektroforesis ke dalam mesin Biodoc Analyze, namun sebelumnya gel agarose harus ditiriskan terlebih dahulu sampai tidak ada sisa-sisa larutan Tbe 5%. Setelah gel agarose dimasukkan ke dalam alat Biodoc. Tutup Biodoc, kemudian nyalakan tombol kamera, UV light top 254 nm, UV light top 365 nm dan tombol transiluminator. Kemudian dapat dianalisis data dari hasil alat Biodoc Analyze.

Gambar yang dihasilkan mempresentasikan besaran masing-masing DNA dari tiap sampel yang berada pada DNA bank. Metode CAPS hanya membutuhkan jumlah DNA yang sedikit sekitar 100 ng dalam cairan 100 μ L ddH₂O dingin. Untuk itu diperlukan adanya pengurangan DNA dari DNA bank sesuai dengan perhitungan ke tabung eppendorf yang baru, sehingga bisa langsung digunakan untuk proses CAPS.

Untuk melakukan pengurangan DNA dilakukan dengan menggunakan rumus pengenceran, namun sebelumnya sangat direkomendasikan untuk mengetahui besaran DNA pada DNA bank sesuai hasil visualisasi. Salah satu DNA ruler yang ada pada hasil visualisasi adalah lambda (λ). lambda (λ) pada gambar terletak pada sisi kiri. Berurutan dapat kita amati lambda (λ) 5 μ L berisikan DNA sebesar 2286 ng, sedangkan di sebelah kanan dapat kita amati lambda (λ) 10 μ L yang berisikan DNA sebesar 4572 ng. Dengan menggunakan perhitungan akumulasi untuk dapat menghitung besaran DNA dengan cara membandingkan antara DNA sampel dengan DNA ruler lambda (λ) 5 μ L atau lambda (λ) 10 μ L (*lihat lampiran 9*).

4.1.3 Amplifikasi DNA tanaman fusan dengan primer mitokondria

Penelitian ini menggunakan metode CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphism Sequences*) dengan 2 pasangan primer universal seperti yang dideskripsikan oleh Demasure *et al.*, 1995, dimana dilakukan pengujian optimasi waktu bersamaan dengan kombinasi dari enzim restriksi endonuclease (*TasI*, *HindIII*, dan *EcoRI*).

Pasangan primer universal yang digunakan pada penelitian ini adalah pasangan primer universal untuk genom mitokondria yaitu *nad1exonB/nad1exonC* dengan sekuens basa nitrogen

5'_GCATTACGATCTGCAGCTCA_3'/5'_GGAGCTCGATTAGTTTCTGC_3'

dan *18S_rRNA_F/18S_rRNA_R* dengan sekuens basa nitrogen

5'_GTGTTGCTGAGACATGCGCC_3'/5'_ATATGGCGCAAGACGATTCC_3'

(Cheng *et al.*, 2003).

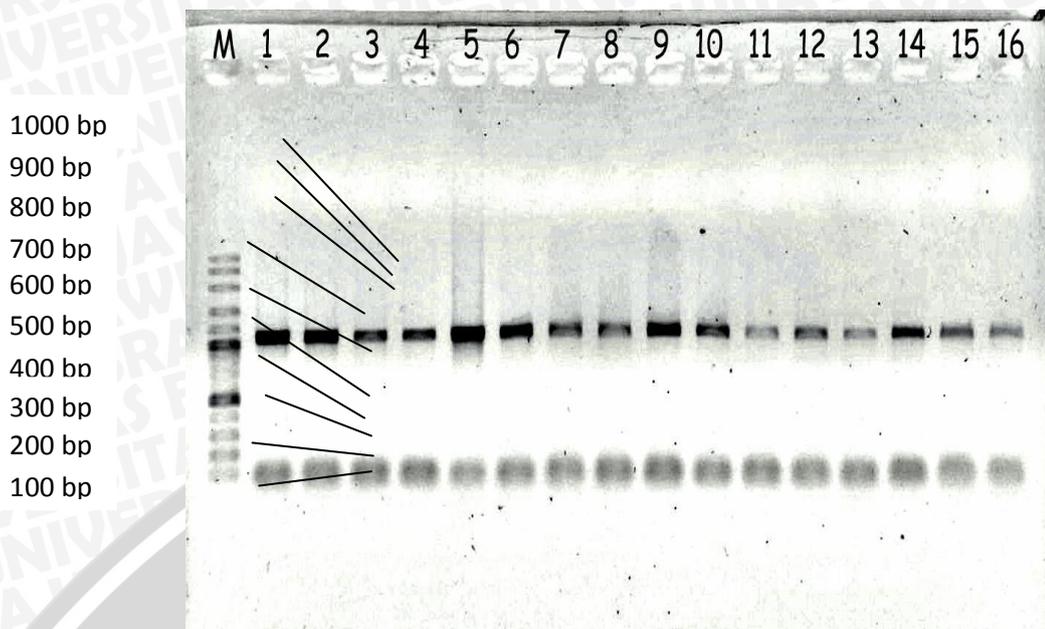
Primer mitokondria digunakan pada proses amplifikasi dengan cara membandingkan dengan basa nitrogen dari primer yang juga digunakan oleh tanaman *Zea mays*, *Oryza sativa*, dan *Nicotiana tabacum* dimana untuk sekuens basa nitrogennya didapatkan dari Organelle Genome Megasequencing Program (OGMP: <http://megasun.bch.unmontreal.ca>). Pasangan primer lainnya telah juga diidentifikasi oleh Demasure *et al.*, 1995. Primer mitokondria universal digunakan untuk mengamplifikasi 63 sampel genotype tanaman fusan. Reaksi PCR dibuat sebanyak 40 μ l yang terdiri dari 16 μ l Dream *Taq*, masing-masing primer forward dan reverse 5 μ l, 8 μ l DNA sampel, dan 6 μ l ddH₂O.

Berdasarkan Tabel 3 pada lampiran 13, terdapat hasil amplifikasi 63 sampel genotype tanaman fusan dengan menggunakan primer universal *18S_rRNA_5S_rRNA F/R*. Sehingga dapat diketahui bahwa proses PCR dengan primer universal *18S_rRNA_5S_rRNA F/R* tidak memberikan polimorfisme pita DNA diantara genotype tanaman fusan setelah diamplifikasi oleh primer universal *18S_rRNA_5S_rRNA F/R*. Tabel 7 juga memberikan informasi bahwa terdapat hasil amplifikasi 63 sampel genotype tanaman fusan dengan menggunakan primer universal *nad 1 exon C/B*. Sehingga dapat diketahui bahwa proses PCR dengan primer universal *nad 1 exon C/B* tidak memberikan polimorfisme pita DNA diantara genotype tanaman fusan setelah diamplifikasi oleh primer universal *nad 1 exon C/B*.

Pada Gambar 2, 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. Hasil visualisasi dari representasi gel agarose yang telah difoto dibawah sinar UV tertera pada Gambar 2 memperlihatkan tidak adanya polimorfisme pada pasangan kombinasi DNA sampel dan primer universal *18S_rRNA_5S_rRNA F/R*.

Pada Gambar 3, 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. Hasil visualisasi dari representasi gel agarose yang telah difoto dibawah sinar UV tertera pada Gambar 3 memperlihatkan tidak adanya polimorfisme pada pasangan kombinasi DNA sampel dan primer universal *nad 1 exon C/B*.

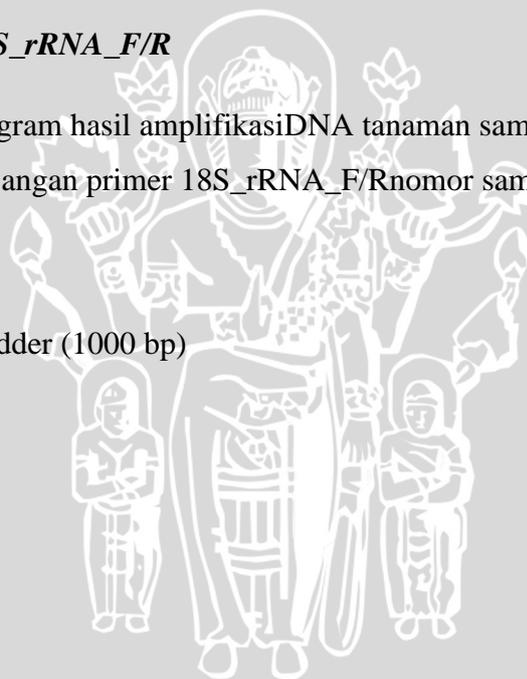


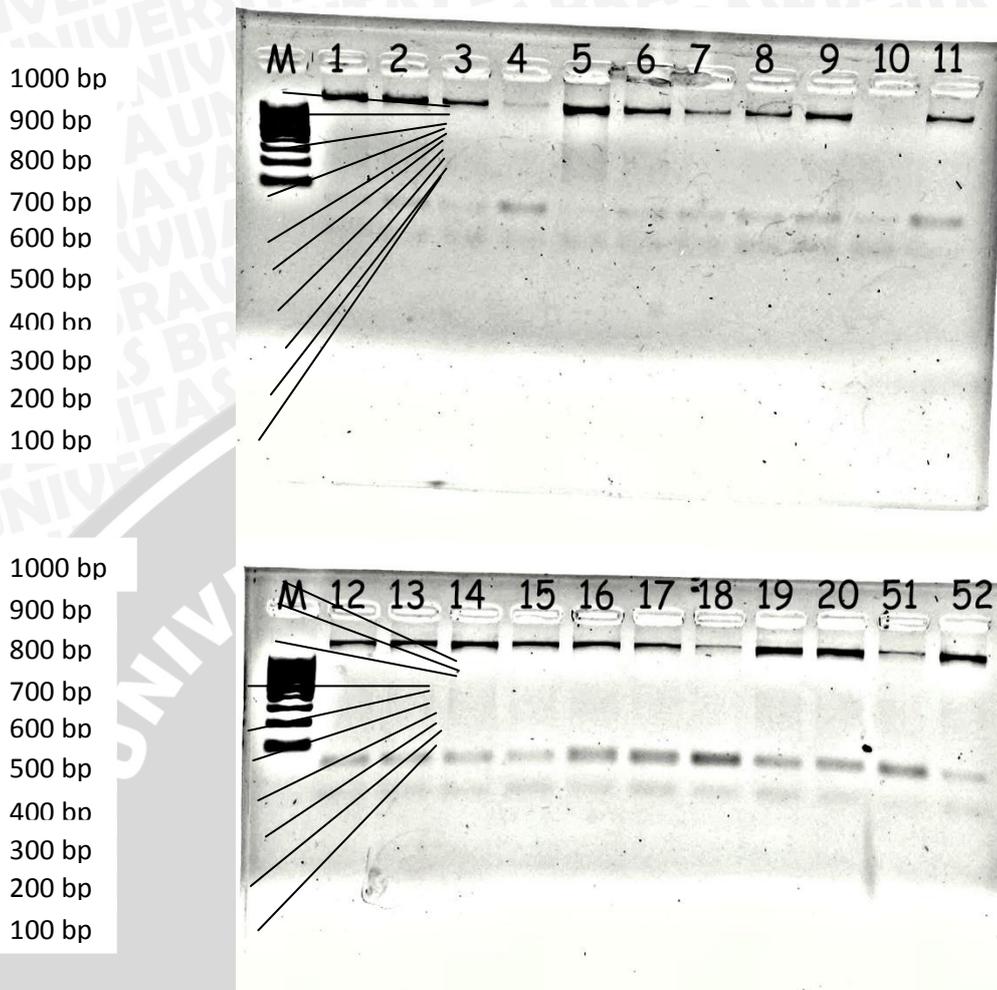
Primer 18S_rRNA_F/R

Gambar 2. Elektroforegram hasil amplifikasi DNA tanaman sampel jeruk hasil fusi dengan pasangan primer 18S_rRNA_F/R nomor sampel 1-16

Keterangan:

M = DNA Ladder (1000 bp)





Primer nad 1 exon C/B

Gambar 3. Elektrofogram hasil amplifikasi DNA tanaman sampel jeruk hasil fusi dengan pasangan primer nad 1 exon C/B nomor sampel 1-22

Keterangan:

M = DNA Ladder (1000 bp)

4.1.4 Optimasi waktu perendaman enzim restriksi pada metode CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphism Sequences*)

Metode CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphism Sequences*) digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan sitoplasmic dari hibrida somatic. Ketika hasil dari proses PCR tercipta melalui proses amplifikasi dengan primer universal yang dikombinasikan dengan enzim restriksi endonuklease, beberapa fragmen polimorfis didapatkan diantara beberapa tanaman jeruk hasil fusi seperti yang dikemukakan oleh Deng *et al.*,(2004).

Beberapa dari komposisi inti dan sitoplasmik dari hibrid somatik tanaman jeruk, suatu kesimpulan umum dapat kita tarik berdasarkan penelitian ini. Selama hibrid somatik yang bersifat tetraploid merupakan fokus utama, dengan mengesampingkan tentang kesamaan dari morfologi daun tanaman parental, DNA inti tanaman fusi berasal dari kombinasi tanaman parental (Guo *et al.*, 2004), hal ini sesuai dengan hasil penelitian.

4.1.4.1 Optimasi terhadap DNA parental

Optimasi pertama yang dilakukan terhadap DNA tanaman tetua (parental) jeruk yaitu tetua siam madu dan tetua Satsuma mandarin. Optimasi terhadap tetua dilakukan dengan tujuan penentuan waktu optimasi yang paling efektif untuk percobaan pada DNA parental akan menjadi acuan dasar untuk melakukan pemotongan antara kombinasi dari DNA tanaman jeruk fusi dengan enzim restriksi endonuclease dan primer universal.

Optimasi waktu perendaman dalam waterbath antara kombinasi DNA sampel dan pasangan primer universal dilakukan hanya pada tanaman parental pada kombinasi jam 3,6,9 dan 12. Pada dasarnya menurut Fermentas Inc., 2013 bahwa enzim restriksi endonuklease dapat memotong fragmen pada kombinasi primer universal dan DNA sampel sampai batas waktu 16 jam perendaman dalam waterbath. Untuk mengetahui waktu yang paling efektif untuk mengamati visualisasi dari proses pemotongan, maka dilakukanlah penelitian ini.

Tabel 4 menunjukkan kehadiran fragmen serta ukuran fragmen DNA parental Siam Madu dan Satsuma Mandarin setelah dilakukan optimasi perendaman enzim restriksi. Berdasarkan tabel 4, bahwa setelah dilakukan proses

amplifikasi pada setiap pasangan primer universal mitokondria yang menghasilkan monofisme, kemudian dilakukan optimasi perendaman dengan enzim restriksi yang menghasilkan kehadiran setiap fragmen pada beberapa satuan perlakuan waktu.

Berdasarkan pada Tabel 4 yang kemudian dinyatakan pada Gambar 4, 5 dan 6 dapat dibandingkan antara kombinasi primer universal, DNA parental dan enzim restriksi endonuklease pada beberapa perlakuan waktu, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa visualisasi gel agarose dibawah sinar UV perlakuan optimasi waktu yang paling banyak memunculkan garis-garis fragmen polimorfis adalah pada waktu perlakuan T1, sedangkan untuk waktu optimasi perlakuan T2, T3 dan T4 memunculkan garis-garis polimorfis yang samar, terlihat kurang jelas dan semakin memudar seiring dengan penambahan waktu perendaman dalam waterbath. Berdasarkan pada representasi dari gel agarose yang direndam pada larutan Tbe dengan kepekatan 10% pada alat elektroforesis dan diatur pada daya 100 volt selama 60 menit. Terlihat adanya perbedaan pada tiap kombinasi enzim restriksi. Kombinasi 18S_rRNA_F&R/*EcoRI* dan nad1exonB&C/*EcoRI* menunjukkan tidak adanya polimorfisme, sama halnya dengan kombinasi enzim restriksi dan primer universal selanjutnya yaitu 18S_rRNA_F&R/*HindIII* dan nad1exonB&C/*HindIII* juga tidak mampu untuk memunculkan adanya polimorfisme. Sedangkan kombinasi enzim restriksi dan primer universal selanjutnya yaitu 18S_rRNA_F&R/*TasI* dan nad1exonB&C/*TasI* mampu untuk menunjukkan adanya polimorfisme. Hal ini sesuai dengan Guo *et al.*, (2009) mengatakan bahwa primer spesifik mitokondria 18S rRNA-5S rRNA/*TasI* adalah kombinasi pasangan primer/enzim restriksi yang dapat memunculkan polimorfisme antara persilangan Satsuma Mandarin dan Tangelo.

Tabel 4. 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

Primer	Perlakuan							
	T1		T2		T3		T4	
	SM	ST	SM	ST	SM	ST	SM	ST
18S_rRNA_F/R + <i>EcoRI</i>	√ (800)	-	√ (850)	-	√ (800)	-	-	-
Nad 1 exon C/B + <i>EcoRI</i>	√ (900)	-	√ (900)	-	√ (900)	-	√ (550)√ (450)	-
18S_rRNA_F/R + <i>HindIII</i>	√ (950)	-	√ (900)	-	√ (800)	-	√ (800)	-
Nad 1 exon C/B + <i>HindIII</i>	√ (700)	√ (700)	√ (700)	√ (700)	√ (700)	√ (700)	√ (700)-	-
18S_rRNA_F/R + <i>TasI</i>	√ (550)	√ (550)	√ (550)	√ (550)	-	-	-	-
Nad 1 exon C/B + <i>TasI</i>	√ (650)	√ (650)	√ (650)	√ (650)	-	-	-	-

Keterangan:

√ = Teridentifikasi adanya fragmen DNA

- = Tidak teridentifikasi adanya fragmen DNA

SM = Parental Siam Madu

ST = Parental Satsuma Mandarin

T1 = Perlakuan 3 jam perendaman

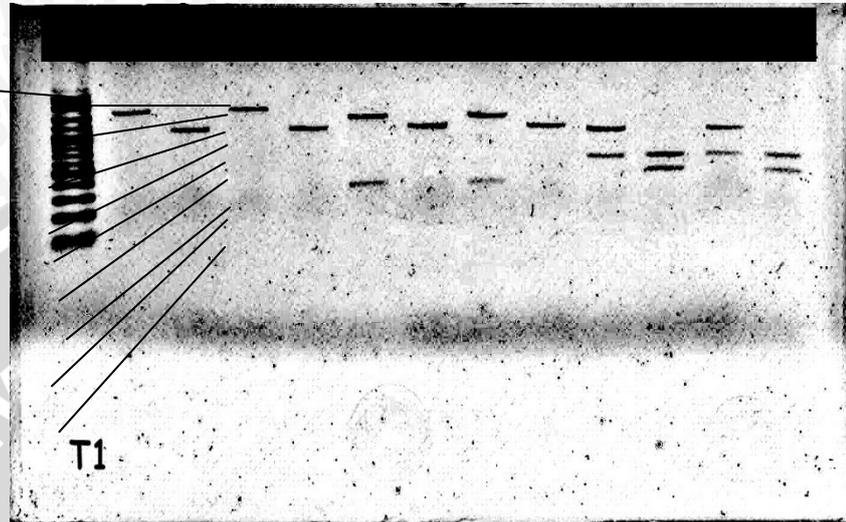
T2 = Perlakuan 6 jam perendaman

T3 = Perlakuan 9 jam perendaman

T4 = Perlakuan
12 jam
per
end
aman

M 51aA 51bA 52aA 52bA 51aB 51bB 52aB 52bB 51aC 51bC 52aC 52bC 52bC

800 bp
700 bp
600 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp



1000 bp
900 bp
800 bp
700 bp
600 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

M 51aA 51bA 52aA 52bA 51aB 51bB 52aB 52bB 51aC 51bC 52aC 52bC 52bC



Gambar 4. Elektroforegram menunjukkan kombinasi dari DNA parental, 2 pasangan primer universal mitokondria dan enzim restriksi yang direndam pada perlakuan waktu perendaman selama 3 jam (T1) & 6 jam (T2).

Keterangan:

M = DNA Ladder (1000 bp)

51 = Parental Siam Madu

52 = Parental Satsuma Mandarin

A = Enzim restriksi *EcoRI*

a = Primer nad 1 exon C/B

B = Enzim restriksi *HindIII*

b = Primer 18S_rRNA_F/R

C = Enzim restriksi *TasI*



Gambar 5. Elektroforegram menunjukkan kombinasi dari DNA parental, 2 pasangan primer universal mitokondria dan enzim restriksi yang direndam pada perlakuan waktu perendaman selama 9 jam (T3).

Keterangan:

M = DNA Ladder (1000 bp)

b = Primer 18S_rRNA_F/R

51 = Parental Siam Madu

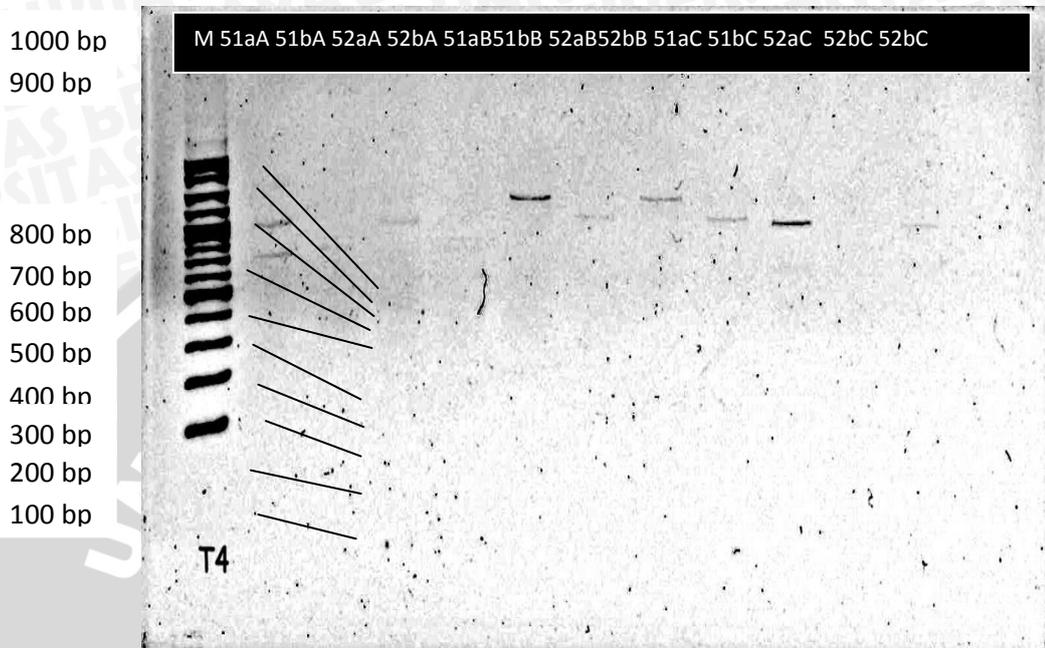
A = Enzim restriksi *EcoRI*

52 = Parental Satsuma Mandarin

B = Enzim restriksi *HindIII*

a = Primer nad 1 exon C/B

C = Enzim restriksi *TasI*



Gambar 6. Elektroforegram menunjukkan kombinasi dari DNA parental, 2 pasangan primer universal mitokondria dan enzim restriksi yang direndam pada perlakuan waktu perendaman selama 12 jam (T4).

Keterangan:

M = DNA Ladder (1000 bp)

B = Enzim restriksi *HindIII*

51 = Parental Siam Madu

C = Enzim restriksi *TasI*

52 = Parental Satsuma Mandarin

a = Primer nad 1 exon C/B

b = Primer 18S_rRNA_F/R

A = Enzim restriksi *EcoRI*

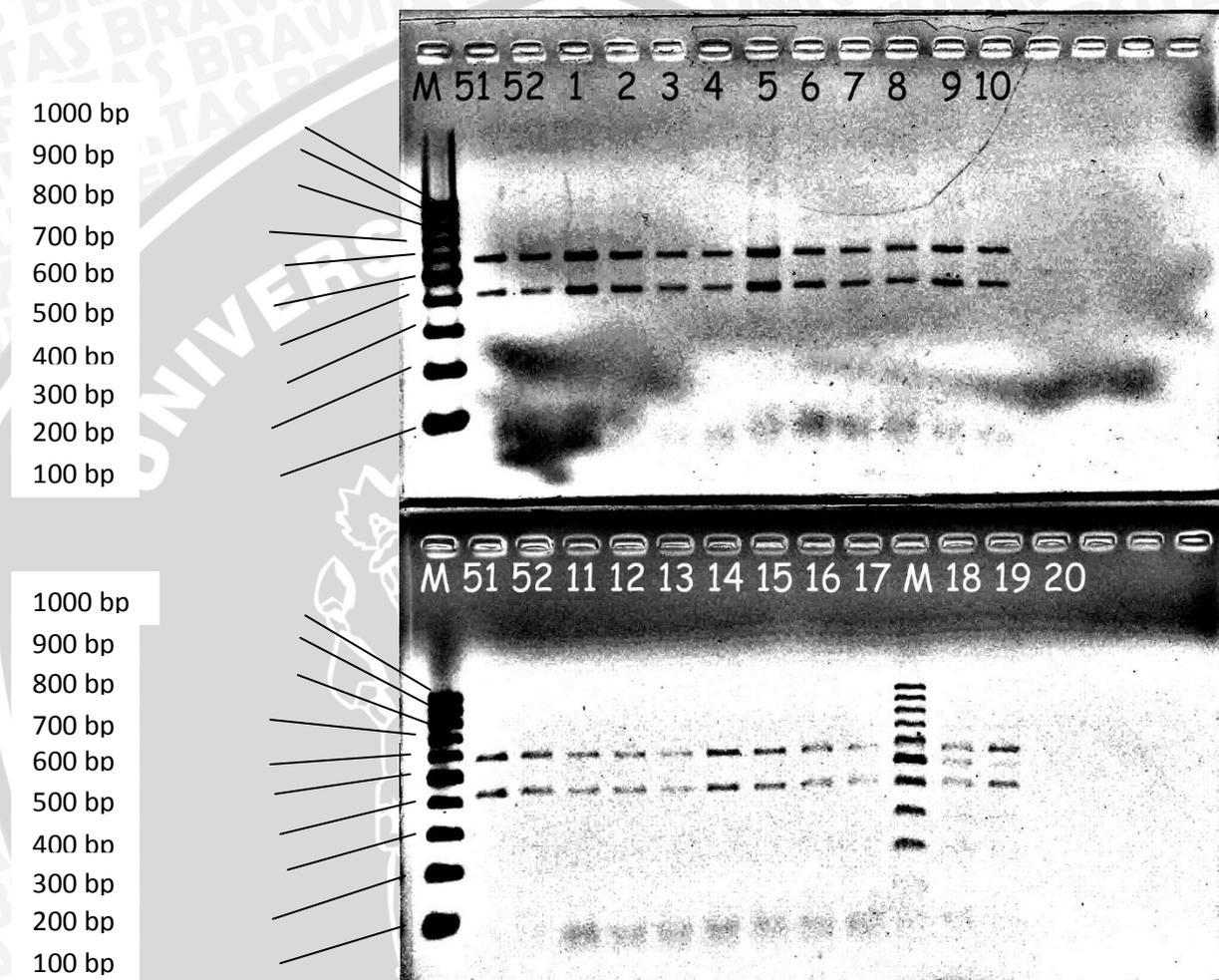
4.1.4.2 Optimasi terhadap DNA F1 tanaman jeruk hasil fusi

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 direndam dalam waterbath selama 3 jam.

Gambar 7 menunjukkan representasi dari gel agarose yang direndam dalam larutan Tbe dengan kepekataan 10% pada alat elektroforesis yang diatur dalam daya 100 volt selama 90 menit menunjukkan adanya polimorfisme antara kombinasi pasangan primer universal dengan enzim restriksi dari *18S_rRNA_F&R/TasI*. Perendaman dalam waterbath dilakukan selama 3 jam. Untuk visualisasi DNA tanaman jeruk fusi F1 dilakukan dengan menggunakan DNA ruler 1000bp. Gambar 8 menunjukkan representasi dari gel agarose yang direndam dalam larutan Tbe dengan kepekataan 10% pada alat elektroforesis yang diatur dalam daya 100 volt selama 90 menit menunjukkan adanya polimorfisme antara kombinasi pasangan primer universal dengan enzim restriksi dari *nad1exonB&C/TasI*. Perendaman dalam waterbath dilakukan selama 3 jam. Untuk visualisasi DNA tanaman jeruk fusi F1 dilakukan dengan menggunakan DNA ruler 1000bp.

Analisis berdasarkan Gambar 7 dan 8 dari foto UV light dari kombinasi pasangan primer universal dan enzim restriksi ditunjukkan pada Tabel 5. Hasil dari analisis menunjukkan bahwa perbedaan antara DNA

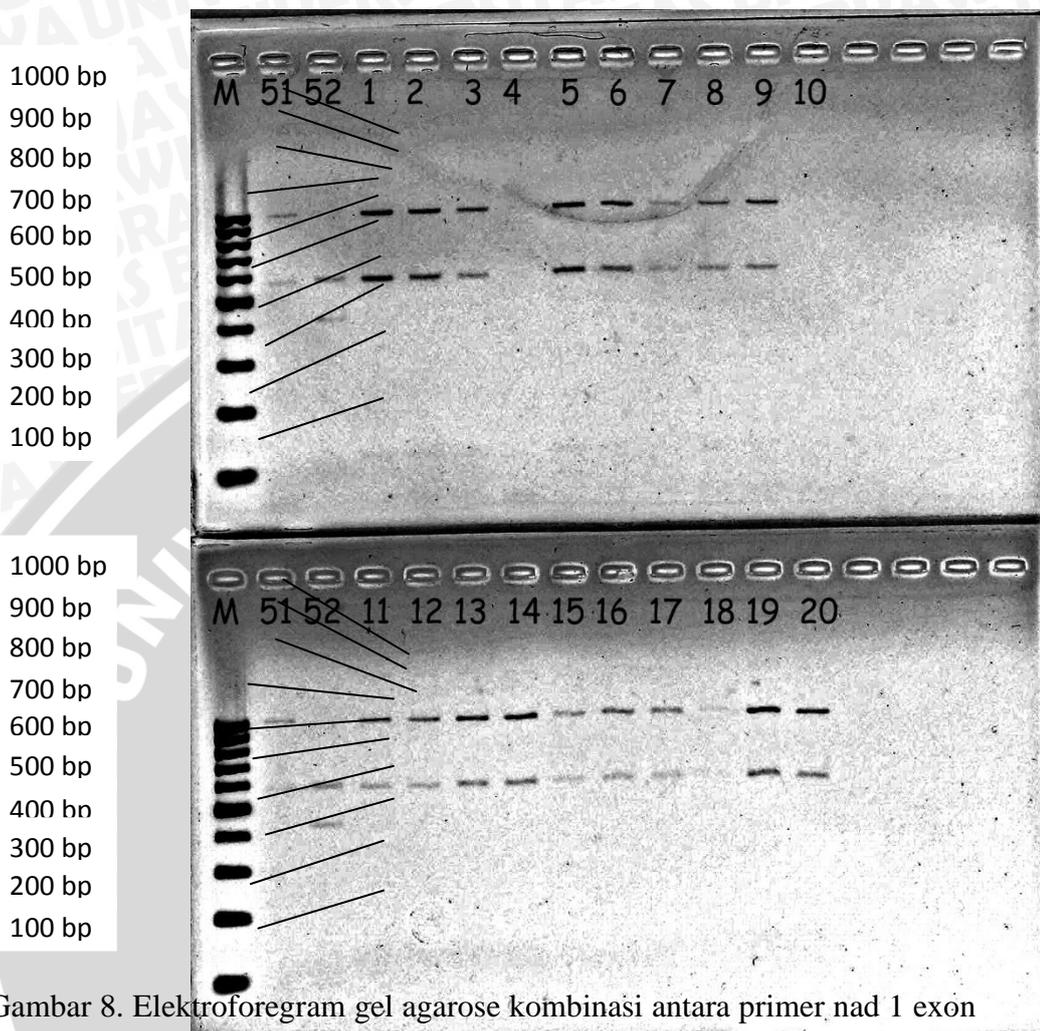
tetua dan DNA tanaman jeruk hasil fusi secara garis besar tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, namun pada beberapa lokasi pada DNA sampel tanaman hasil fusi terdapat perbedaan yang sangat signifikan jika dibandingkan berdasarkan jumlah fragmen yang terbentuk.



Gambar 7. Elektroforegram gel agarose kombinasi antara primer 18S_rRNA_5SrRNA F/R dengan enzim restriksi *TasI* pada DNA F1 tanaman hasil fusi jeruk nomor sampel 1-20, 51 dan 52

Keterangan:

M = DNA Ladder (1000 bp)



Gambar 8. Elektroforegram gel agarose kombinasi antara primer nad 1 exon C/B dengan enzim retriksi *TasI* pada DNA F1 tanaman hasil fusi jeruk nomor sampel 1-20, 51 dan 52

Keterangan:

M = DNA Ladder (1000 bp)

Tabel 5 menunjukkan bahwa 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). 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).

Tabel 5. Hasil analisis berdasarkan visualisasi dibawah sinar ultraviolet

Primer	Individu Kode Sampel										
nad1exon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Fragmen	2	2	2	0	2	2	2	2	2	0	2
Besar (bp)	300	300	300	0	300	300	300	300	300	0	300
	700	700	700	0	700	700	700	700	700	0	700
Fragmen											

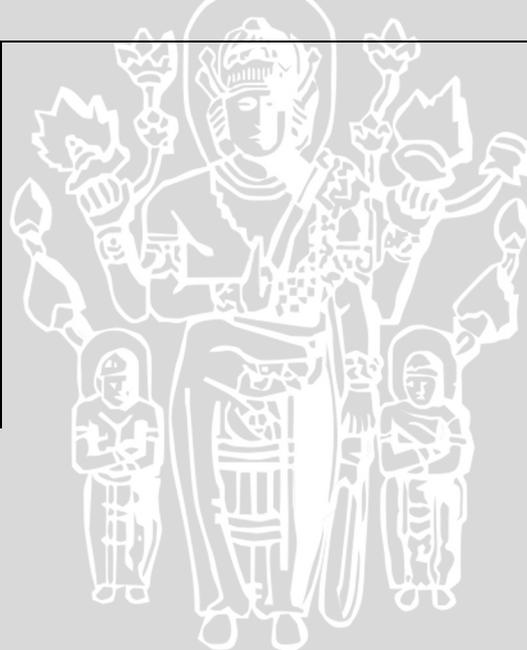
Primer	Individu Kode Sampel									
nad1exon	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Fragmen	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2
Besar (bp)	300	300	300	300	300	300	0	300	300	300
	700	700	700	700	700	700	0	700	700	700
Fragmen										

Primer	Individu Kode Sampel									
nad1exon	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Fragmen	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Besar (bp)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700
Fragmen										

Primer	Individu Kode Sampel									
nad1exon	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
Fragmen	0	2	2	2	2	2	2	2	0	0
Besar (bp)	0	300	300	300	300	300	300	300	0	0
	0	700	700	700	700	700	700	700	0	0
Fragmen										
Primer	Individu Kode Sampel									
nad1exon	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
Fragmen	2	0	0	2	2	2	2	0	0	2
Besar (bp)	300	0	0	300	300	300	300	0	0	350
	700	0	0	700	700	700	700	0	0	650
Fragmen										

Primer	Individu Kode Sampel									
nad1exon	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
Fragmen	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Besar (bp)	350	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	650	700	700	700	700	700	700	700	700	700
Fragmen										

Primer	Individu Kode Sampel	
nad1exon	62	63
Fragmen	2	2
Besar (bp)	300	300
	700	700
Fragmen		



Keterangan:

bp = satuan pasangan fragmen (base pair)



4.2 Pembahasan

Hasil elektroforegram analisis CAPS seluruh tanaman hasil fusi protoplas (G0) yang dibandingkan dengan kedua induknya, didapatkan adanya beberapa tanaman hasil fusi protoplas (G0) yang memiliki fragmen DNA yang sebagian besar sama dengan tanaman induk Siam Madu atau Satsuma Mandarin. Tanaman hasil fusi protoplas (G0) lainnya memiliki fragmen DNA yang sama dengan induk jeruk Siam Madu dan juga memiliki fragmen DNA induk jeruk Satsuma Mandarin (gabungan).

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 teramplikasi 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.

Pada proses PCR tanaman hasil fusi protoplas (G0) antara jeruk Siam Madu dengan Satsuma Mandarin dapat dikatakan memiliki genom inti gabungan jika tanaman hasil fusi protoplas (G0) tersebut memiliki kehadiran pita DNA pada ukuran basa tertentu seperti yang dimiliki oleh kedua induknya, baik satu atau dua pita DNA dan memiliki perbedaan pola pita DNA dengan kedua induknya. Demikian pula dengan tanaman hasil fusi protoplas (G0) antara jeruk Siam Madu dengan Satsuma Mandarin dapat dikatakan memiliki genom mitokondria gabungan jika tanaman hasil fusi protoplas (G0) tersebut memiliki kehadiran pita DNA pada ukuran basa tertentu seperti yang dimiliki oleh kedua induknya, baik satu atau dua pita DNA dan memiliki perbedaan pola pita DNA dengan kedua induknya.

Hasil analisis elektroforegram optimasi enzim restriksi pada metode CAPS tanaman indukan Siam Madu dan Satsuma mandarin pada Tabel 4, menunjukkan bahwa waktu inkubasi terbaik ditunjukkan pada perlakuan T1,

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.

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.

Hasil analisis elektroforegram optimasi tanaman fusan dibandingkan dengan tanaman indukan Siam Madu dan Satsuma mandarin pada Tabel 5. Analisis berdasarkan Gambar 7 dan 8 dari foto UV light dari kombinasi pasangan primer universal dan enzim restriksi ditunjukkan pada Tabel 5. 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.

Tabel 5 menunjukkan bahwa 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). 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 7 dan 8 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)

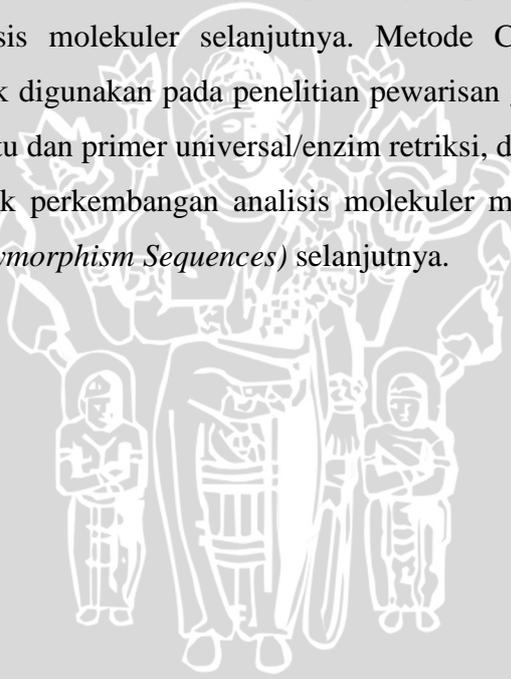
dan 50(FS 50). Berdasarkan pola fragmen pada sebagian besar perbandingan antara DNA tanaman parental dengan DNA tanaman jeruk hasil fusi untuk kombinasi primer nad 1 exon C/B tidak menunjukkan perbedaan. Untuk jumlah fragmen per kode individu sampel sebagian besar memiliki 2 fragmen, namun terdapat kode 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 dan pasangan primer 18S_rRNA_F/18S_rRNA_R dengan sequens basa nitrogen 5'GTGTTGCTGAGACATGCGCC_3' dan 5'_ATATGGCGCAAGACGATTCC_3' (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^c, 2013).

Metode analisis CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphism Sequences*) 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 (Vardi *et al.*, 2008). 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).

Di Indonesia, metode CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphism Sequences*) 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 (*Cleaved Amplified Polymorphism Sequences*) selanjutnya.



5 KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

- 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(3 jam), T2(6 jam) dan T3(9 jam).
- 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.
- Hasil analisis dari gambar 7 dan 8 menunjukkan bahwa pola fragmen DNA mitokondria tanaman parental identik dengan fragmen DNA mitokondria tanaman F1.

5.2 Saran

Waktu inkubasi yang telah teridentifikasi dapat dijadikan acuan dasar untuk penetapan standar waktu inkubasi untuk penelitian dengan metode CAPS selanjutnya dengan objek tanaman Siam Madu atau Satsuma Mandarin, namun perlu dilakukan pengembangan dan penelitian lebih lanjut

untuk metode CAPS di Indonesia khususnya untuk pemuliaan jeruk varietas unggul.

Penggunaan gel agarose disarankan yang berbentuk vertikal dengan harapan visualisasi dari band fragmen DNA bisa terlihat dengan jelas. Apabila digunakan untuk penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan DNA bank dan enzim restriksi dengan persediaan yang besar.



DAFTAR PUSTAKA

- Aini A. R. 2009. Identifikasi embrio zigotik tanaman jeruk (*Citrus sp.*) F1 hasil persilangan dengan penanda SSR. Skripsi Universitas Brawijaya. Fakultas Pertanian. Malang. Pp55.
- Anonymous^a. 2010. Mampukan jeruk keprok menggeser jeruk impor?. Sinar Tani online.
- Anonymous^b. 2013. Katalog Pengenalan Produk. Thermo Scientific Inc.
- Anonymous^c. 2013. Katalog Pengenalan Produk. Vivantis Inc.
- Aryantha I. N. P., Y. Mulyani, R. Ariffudin. 2008. Penanda molekul DNA mikrosatelit untuk karakterisasi bibit jamur kuping (*Auricularia polytricha* [Mont.] Sacc) J. Matematika dan Sains. 13 (1):7-15.
- Ashari, S. 1995. Hortikultura aspek budidaya. UI Press. Jakarta. P1-310.
- Ashari, S. 2002. Pengantar biologi reproduksi tanaman. Rineka Cipta. Jakarta. Pp113.
- Banu, E. and Heidi F. Kaeppler. 2004. Analysis of oat microsatellite for oat mapping applications. KSU J. of Sci. and Engineering. 7 (1): 16-21.
- Birky, Jr., C. W. 1976. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplast. BioSci. 26(1):26-33.
- Birky Jr., C. W. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanism and evaluation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:11331-11338.
- 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.
- 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.
- Campos, E. T., M. A. G. Espinosa, M. L. Warburton, A. Santacruz, A. V. Monter. 2005. Characterization of mandarin (*Citrus spp.*) using morphological and AFLP markers. Interciencia. 30(11):687-693.

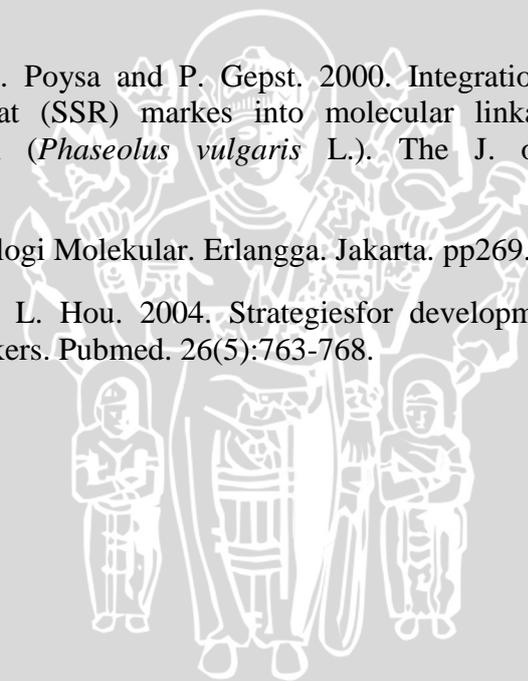
- Chen, M., M. Jensen, and S. Rodermel. 1999. The yellow variegated mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and delayed in chloroplast biogenesis. *The American Genetic Association*. 90(1):207-214.
- Chen, C., K. D. Bowman, Y. A. Choi, P. M. Dang, M. N. Rao, S. Huang, J. R. Soneji, T. G. McCollum 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.
- Cheng, Y. J., M. C. D. Vicente, H. J. Meng, W. W. Guo, N. G. Tao and X. X. Deng. 2005. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in Citrus and related genera. *Tree Physiol.* 25:661-672.
- Clark, D. 2005. *Molecular biology*. Elsevier Academic Press. Southern Illinois University. Pp802.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- George, E. F. 2008. *Plant Tissue Culture Procedure – Background 1*. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. 1:1-28.
- Golein, B., A. Talaie, Z. Zamani, A. Ebadi and A. Behjatnia. 2005. Assessment of genetic variability in some Iranian sweet oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and Mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) using SSR markers. *Int. J. of Agr & Biol.* 7(2): 172-174.
- Guo, W.W. and J. W. Grosser. 2005. Somatic hybrid vigor in citrus: Direct evidence from protoplast fusion of an embryogenic callus line with a transgenic mesophyll parent expressing the GFP gene. *J. Plant Sci.* 168:1541-1545.
- Guo, W.W., Y. J. Cheng and X. X. Deng. 2002. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*. *Plant Cell Rep.* 20:829-834.
- Guo, W. W., D. Prasad, Y. J. Cheng P. Serrano, X. X. Deng and J. W. Grosser. 2004. Targeted hybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Rep.* 22:752-758.

- Guo, W. W., R. C. Wu, Y. J. Cheng and X. X. Deng. 2006a. Production and molecular characterization of *Citrus* intergeneric somatic hybrids between red tangerine and citrange. *Plant Breeding*. 126:72-76.
- Guo, W. W., Y. J. Cheng, C. L. Chen and X. X. Deng. 2006b. Molecular analysis revealed autotetraploid, diploid and tetraploid cybrid plants regenerated from an interspecific somatic fusion in *Citrus*. *Scientia Hort*. 108:162-166.
- 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.
- Deng, X., J. Liu dan X. Xu. 2004. FCM, SSR and CAPS analysis of intergeneric somatic hybrid plants between Changsou kumquat and Dancy Tangerine. *Bot. Bull. Acad. Sin.*46: 93-98.
- Demesure B, Sodiz N, Petit RJ. 1995. A set of universal primers for amplifications of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol*. 4:129-131
- Hussein, E. H.A., S. M. M. Abd-alla, N. A. and M. S. Hussein. 2003. Genetic analysis in some *Citrus* accessions using microsatellites – and AFLP- based markers. *Egypt*. P1-2
- Jannati, M., R. Fotouhi, A. Pourjan, and Z. Salehi. 2009. Genetic diversity analysis of Irian citrus varieties using micro satellite (SSR) based markers. *J. of Hort and Forestry*. 1(7):120-125.
- Karsinah, Sudarsono, L. Setyobudi, dan H. Aswidinnoor. 2002. Keragaman genetic plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. *J. Bioteknologi Pertanian*. 7(1)8-16.
- Kunitake, H., K. Nagasawa, K. Takami and H. Komatsu. 2002. Molecular and cytogenetic characterization of triploid somatic hybrids between ‘Shogun’ Mandarin and grapefruit. *Plant Biotech*. 19(5):345-352.
- Lathar, Prashant Kumar., A. Sharma, dan I. Thakur. 2010. Isolation and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of wild yeast species from 17 different fruits. *J. Of Yeast and Fungal Research*. 1(8) pp 146-151.
- Lin, H., E. L. Civerolo, R. Hu, S. Barros, M. Francis, and M. A. Walker. 2005. Multilocus simple sequence repeat markers for differentiating strains and evaluating genetic diversity of *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(8):4888-4892.

- Liu, Y. Z and X. X. Deng. 2007. Citrus breeding and genetics in China. The Asian and Austr. J. Of Plant Sci and Biotech. 1(1):23-28.
- Luro, F. L. G. Costantino, J. Terol, X. Argoust, T. Allario, P. Wincker M. Talon, P. Ollitrault and R. Morillin. 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules Clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. BMC Genomics. 9:287.
- Miglani, G. S. 2007. Advanced genetics. Second Edition. Alpha Science International Ltd. Oxford, U. K. pp743.
- Moreira, C. D., C. D. Chase, F. G. Gmitter Jr and J. W. Grosser. 2000. Inheritance of organelle genomes in citrus somatic cybrids. Molecular Breeding. 6:401-405.
- Moreira, C. D., F. G. Gmitter Jr., J. W. Grosser, S. Huang, V. M. Ortega, and C. D. Chase. 2002. Inheritance of organelle DNA sequences in a Citrus-Poncirus intergeneric cross. The American genetic Association. 93:174-178.
- 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.
- Novelli, Valdenice M., M. Critofani, A. A. Souza and M. A. Machado. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Gen. and Mol. Biol. 29(1):90-96.
- 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.
- Ollitrault, P. 2007. Citrus breeding for efficient water and nutrient use. CIRAD. Pp1-158.
- 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.

- Pabendon, M. B., M. Dahlan, Sutrisno dan M. L. C. George. 2006. Karakterisasi kemiripan genetik koleksi inbrida jagung berdasarkan marka mikrosatelit. *Jurnal Agrobiogen*. 2(2):45-51.
- Pebendon M. B. Azrai, M., F. Kasim dan M. J Mejaya. Tanpa tahun. Prospek penggunaan markah molekuler dalam program pemuliaan jagung. *Jagung: teknik produksi dan pengembangan*. 110-133.
- Pioneer Hi-Bred International. 2001. Merkers in plant genetics research: unlocking genetics potential for increased productivity. Pioneer Hi-Bred International, Inc. Des Moines, Iowa, USA. P1-8.
- Prasetyono, J. dan Tasliah. 2004. Marka mikrosatelit: marka molekuler yang menjanjikan. *J. Tinjauan Ilmiah Riset Biologi dan Teknologi Pertanian*. Abstrak 6(2).
- Prihatman, K. 2000. Jeruk (*Citrus sp.*). Sistem informasi manajemen pembangunan dipedesaan, BAPPENAS. Pp16.
- Ruzainah. 2008. Population genetics studies of marble goby *Oxyleotris marmoratus* (bleeker, 1852) in Malaysia using microsatellite and mitochondrial DNA markers. Thesis. Universiti Sains Malaysia.
- Santoso, T. J., Dwinita W. U., dan Endang M. S. 2006. Analisis sidik jari DNA plasma nutfah kedelai menggunakan markah SSR. *Agrobiogen*. 2(1):1-7.
- Spiegel-Roy, P. and E. E. Goldschmidt. 1996. *Bilogy of Citrus*. Cambridge University Press. Pp221.
- Stafne, E. T., J. R. Clarck C. A. Weber, J. Graham, and K. S. Lewers. 2005. Simple sequence repeat (SSR) markers for genetic mapping of raspberry and blackberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130(5):1-7.
- Sukarmin dan F. Ihsan. 2008. Teknik persilangan jeruk (*Citrus sp*) untuk perakitan varietas unggul baru. *Buletin Teknik Pertanian*. 13(1):12-15.
- Thomas, M. R., N. S. Scott, R. Botta and M. H. Kijas. Tanpa tahun. Sequence-tagged site markers in grapevine and citrus. Pdf1-6.
- Turner, J. C. O. 2005. Rootstock for citrus. Department of Primary Industries and Fisheries. Queensland.
- Vaillancourt, R. E., A. Pretty and G. E. McKinnon. 2004. Maternal inheritance of mitochondria in *Eucalyptus globules*. *J. of Heredity*. 95(4):353-335.

- Vasylenko, M., O. Ovcharenko, Y. Gleba and N. Kuchuk. 2006. Production of cybrids in *Brassicaceae* species. Methods in molecular biology, vol. 318: plant cell culture protocols, second edition. Humana Press Inc. New Jersey. P219-232.
- Verma, N., M. C. Bansal and Kumar. 2004. Protoplast Fusion Technology and Its Biotechnological Applications. Department of Paper Technology, Indian Institute of Technology, Rookee, Saharanpus.
- Wikipedia. 2008. Genome. Ensiklopedia bebas.
- Weising, Kurt. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. CRC Press. Newark. ISBN 0-8493-1488-7.
- Xianlong, Z. Tanpa tahun. Production of symmetric and asymmetric somatic hybrids via protoplast fusion between cotton species. P21-24.
- Yu, K., S. J. Park V. Poysa and P. Gepst. 2000. Integration of simple sequence repeat (SSR) marks into molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The J. of Heredity. 91(6):429-434.
- Yuwono, T. 2005. Biologi Molekular. Erlangga. Jakarta. pp269.
- Zhang, Z. C. and X/ L. Hou. 2004. Strategiesfor development of SSR molecular markers. Pubmed. 26(5):763-768.



Lampiran 1. Deskripsi Jeruk Siam varietas Madu

Asal Tanaman	: Kabupaten Tanah Karo, Sumatera Utara
Tinggi Tanaman	: 3.0 – 4.0 meter (pada umur 6 – 9
Lebar Tajuk	: 3.0 – 4.0 meter
Bentuk Tanaman	: payung
Percabangan kecil	: menjorong ke atas, bercabang banyak dan
Lingkar batang m)	: 25 – 35 cm(pada ketinggian batang 0.5 – 1.0
Warna daun bagian atas	:hijau tua dan mengkilap
Warna daun bagian bawah	: hijau muda
Bentuk daun	: bulat telur, ujung runcing
Sayap daun	: tidak ada
Lebar daun	: 4 – 5 cm
Panjang daun	: 7 – 10 cm
Kedudukan daun	: mendatar
Jumlah tulang daun	: 12 – 14 (6 – 7 pasang) dengan susunan Penninservis (<i>bertulang-menyirip</i>)
Tepi daun	: bergerigi dari ujung daun sampai bagian tengah dan tepi daun rata dari bagian tengah ke arah pangkal daun
Panjang tangkai daun	: 0.8 – 1.1 cm
Bentuk bunga mekar	: seperti bintang
Jumlah bunga per tandan	: 2 – 3 buah, bunga terdiri dari bunga tunggal dan bunga majemuk yang didominasi bunga tunggal, muncul di ujung cabang dan ketiak daun
Warna mahkota bunga	: putih
Jumlah daun mahkota	: 5 helai terpisah satu sama lain



Warna dasar bunga	: coklat
Jumlah benang sari	: 18
Warna benang sari	: krem
Warna tangkai benang sari	: putih
Warna kepala putik	: krem
Warna tangkai putik	: putih
Warna daging buah matang	: orange
Ukuran buah	: panjang 5.0 – 7.0 cm; lebar/garis tengah 6.0 – 8.5 cm
Bentuk buah	: bulat sampai dengan bulat gepeng
Puncak ujung buah	: datar sampai dengan berlekuk
Pangkal buah	: tumpul/datar, tidak berleher
Tebal kulit buah (albedo)	: 2 – 4 mm (lapisan flavedo dan lapisan albedo)
Jumlah septa setiap buah	: 10 – 13
Jumlah biji tiap juring	: 0 – 3
Jumlah biji tiap buah	: 15 - 12
Jumlah buah per tandan	: 2 buah (berasal dari bunga majemuk)
Berat buah utuh	: 90 – 225 g (rata-rata 125 – 175 g)
Rasa daging buah	: manis segar
Umur mulai berbuah	: 2.5 – 3 tahun (dengan potensi hasil 8 – 10 kg/pohon/tahun)
Musim buah/panen	: panen raya/besar bulan September-Oktober, panen kecil sepanjang tahun
Ketahanan simpan buah	: 8 – 10 hari, setelah di panen dalam wadah yang dilapisi dengan potongan kertas
Persentase bagian buah yang dapat dimakan	: 94 %
Produksi buah/pohon/tahun	: 750 – 900 buah (umur 6 – 9 tahun)

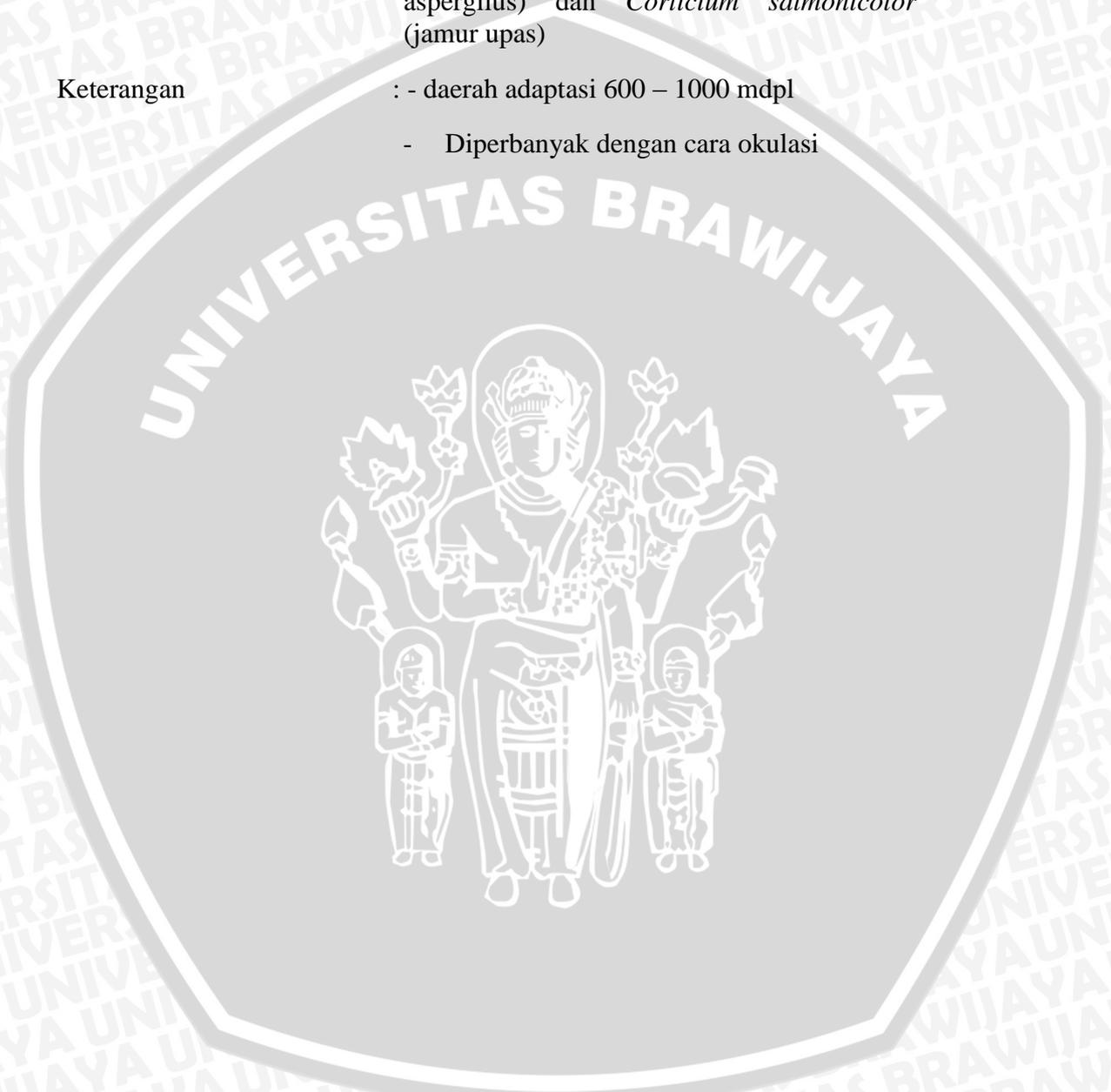
Ketahanan terhadap penyakit : -agak toleran terhadap penyakit *Gleosporium limethcolum* (antraknose) dan *Oidium tingitanium*

-Toleran terhadap *Aspergillus niger* (busuk aspergilus) dan *Corticium salmonicolor* (jamur upas)

Keterangan

: - daerah adaptasi 600 – 1000 mdpl

- Diperbanyak dengan cara okulasi



Lampiran 2. Deskripsi Jeruk Satsuma Mandarin

Bentuk daun	: Brevipetiole
Sayap daun	: Obdelstate
Bentuk helai daun	: Tidak ada
Berat buah utuh	: 125 – 350 g
Tinggi buah	: 6.35 – 16.9 cm
Diameter buah	: 6.75 – 9.55 cm
Bentuk buah	: Spheroid
Bentuk pangkal buah	: Concave colored
Bentuk ujung buah	: Truncate
Permukaan kulit buah	: berpori
Keeratan epicarp pada mesocarp	: Lemah
Warna daging kulit	: Putih
Tebal daging kulit	: 0.435 – 0.715 cm
Warna pulp	: Orange
Tekstur pulp	: Lembut
Jumlah juring buah	: 9 – 12
Kerekatan antar juring	: tidak rekat
Axis buah	: Berlubang
Tampak melintang axis	: Bulat
Diameter axis	: 0.5 – 1.4 cm
Keseragaman warna pulp	: Seragam
Juice dalam endocarp	: Tinggi
Cita rasa	: Sangat enak
Aroma juice	: Sedang
Jumlah biji	: -



Lampiran 3. Bahan dan Cara Pembuatan Larutan

1. Larutan CTAB 10 % (100 ml)
Ditimbang NaCl 4.1 gram dan CTAB 10 gram. Kemudian dilarutkan terlebih dahulu NaCl dengan 90 ml aquadest pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Setelah larut, dimasukkan CTAB yang sudah dihancurkan sedikit demi sedikit diatas *hot plate* dan diaduk dengan stirrer hingga larut. Lalu dihomogenkan dengan cara tera hingga 100 ml.
2. Buffer Tris-HCl 1 M pH 8.0 (100 ml)
Ditimbang Tris-base 12.11 gram. Dilarutkan dalam aquadest (± 80 ml). Kemudian diukur hingga pH 8.0 (tidak boleh < 8.0) dengan menambah HCl pekat. Larutan dihomogenkan dengan cara tera hingga 100 ml dan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave*.
3. Larutan EDTA 0.5 M pH 8.0 (100 ml)
Ditimbang NaEDTA 18.61 gram. Dilarutkan dalam aquadest (± 80 ml) dengan bantuan stirrer. Kemudian diukur hingga pH 8.0 (tidak boleh > 8.0) dengan menambah NaOH. Larutan dihomogenkan dengan cara tera hingga 100 ml dan sterilisasi menggunakan *autoclave*.
4. Larutan NaCl 5 M (100 ml)
Ditimbang NaCl 29.25 gram. Dilarutkan dalam aquadest dengan bantuan stirrer. Larutan dihomogenkan dengan cara tera hingga 100 ml. Diaduk kembali dengan stirrer hingga larut dan sterilisasi menggunakan *autoclave*.
5. Larutan Ammonium Asetat 2.5 M pH 7.7 (100 ml)
Ditimbang Ammonium Asetat 19.27 gram. Dilarutkan dalam aquadest (± 80 ml) dengan bantuan stirrer. Kemudian diukur hingga pH 7.7. Larutan dihomogenkan dengan cara tera hingga 100 ml. Diaduk kembali dengan stirrer hingga larut dan sterilisasi menggunakan *autoclave*.
6. Buffer Pencuci (100 ml)

Diambil 76 ml Ethanol absolute, 400 μ l Ammonium Asetat 2.5 M dan 23.6 ml aquadest. Dilarutkan dengan bantuan stirrer.

7. Larutan TE (200 ml)

Diambil 2 ml larutan Tris-HCl 1 M, 400 μ l EDTA 0.5 M, dan 197.6 ml aquadest. Semua bahan dicampur dan dilarutkan dengan bantuan *magnetic stirrer*.

8. Buffer TBE 10x (100 ml)

Ditimbang Tris-base 10.8 gram, Boric acid 5.5 gram dan diambil 4 ml EDTA 0.5 M. Dilarutkan dalam aquadest (\pm 80 ml). Larutan dihomogenkan dengan cara tera hingga 100 ml. Sterilisasi menggunakan *autoclave*.

9. Buffer Ekstraksi (CTAB 3 %, NaCl 1.4 M, EDTA 0.002 M dan Tris-HCl 100mM)

Diambil 15 ml larutan CTAB 10 %, 14 ml NaCl 5 M, 4 ml EDTA 0.25 M, 5 ml Tris-HCl 1 M dan 12 ml aquadest. Semua bahan dicampur diatas *hot plated* dan dilarutkan dengan bantuan stirrer.

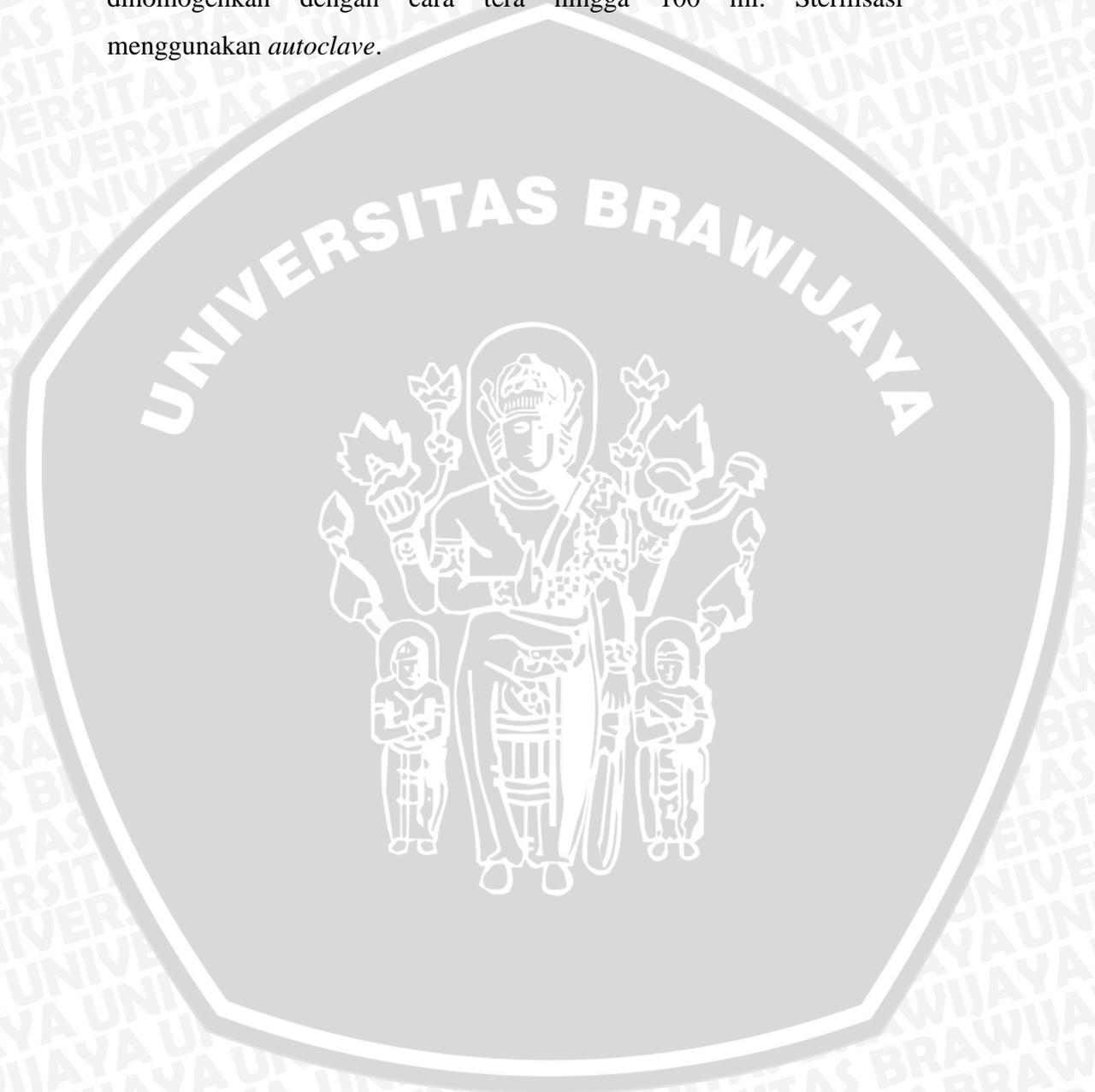
10. Pembuatan Agarose MS (Molecular Screening Agarose) 3 %

Agarose MS ditimbang sebesar 1.2 gram. Dimasukkan ke dalam 40 ml TBE 0.5x sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Dipanaskan dalam tabung Erlenmeyer diatas *hot plate* tanpa stirrer, sampai larutan agarose bening dengan cara digoyangkan secara perlahan. Setelah bening, didiamkan sebentar lalu masukkan Ethidium Bromide sebanyak 4 μ l ke dalam tabung Erlenmeyer, goyang-goyang sampai EtBr tercampur merata.

Catatan: jangan memasukkan bubuk agarose MS pada saat larutan TBE hangat/panas karena akan menggumpal. Jangan terlalu lama mendinginkan larutan agarose ketika akan memasukkan EtBr dikarenakan jika larutan cepat padat (pada permukaannya akan terbentuk lapisan sehingga EtBr sulit tercampur dan cetakan agarosanya tidak bagus).

11. Natrium Acetate 3M, pH 5.2 (100 ml)

Ditimbang NaCOOH sebesar 24.6 gram. Larutkan dengan aquadest. Kemudian diatur pH hingga 5.2 dengan menambah NaOH. Larutan dihomogenkan dengan cara tera hingga 100 ml. Sterilisasi menggunakan *autoclave*.



Lampiran 4. Daftar Bahan untuk Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis

No.	Bahan	Fungsi
1.	Tris-HCl	Merusak integritas barrier dinding sel
2.	EDTA	Menghilangkan aktifitas ion magnesium yang penting untuk mempertahankan keseluruhan struktur selubung sel
3.	NaCl	Menghilangkan kontaminan polisakarida
4.	Chloroform	Menghilangkan kontaminan protein
5.	Mercaptoethanol	Menghilangkan senyawa fenolik, anti oksidan
6.	Isopropanol	Membantu presipitasi DNA yang diekstraksi
7.	H ₂ O steril (dH ₂ O, ddH ₂ O)	Pelarut bahan yang digunakan
8.	CTAB	Menghilangkan kontaminan polisakarida
9.	TE Buffer	Pelarut DNA sampel
10.	Natrium Asetate	
11.	Ammonium Asetate	Presipitasi DNA yang diekstraksi
12.	Ethanol 70 %	Mencuci DNA dari berbagai kontaminan
13.	RNase	Menghilangkan kontaminan RNA
14.	TBE	Pelarut pembuatan agarose dalam pembuatan gel elektroforesis DNA serta sebagai elektrolit dalam elektroforesis DNA dan produk PCR
15.	Agarose	Elektroforesis kualitas DNA dan membantu dalam visualisasi hasil PCR

16.	Buffer PCR 10 %	Sebagai pelarut komponen PCR
17.	PCR mix (Dream Tag PCR mix, Faststart PCR mix)	Merupakan campuran yang sudah jadi antara dNTP, Taq DNA polymerase, dan MgCl ₂ sebagai material utama untuk sintesis DNA
18.	Forward dan Reverse Primer	Merupakan oligonukleotida pendek untuk mengawali reaksi polimerisasi
19.	Ethidium Bromide (EtBr)	Berinteraksi dengan basa DNA dan memberikan warna orange fluoresen dibawah sinar ultraviolet. Mendeteksi asam nukleat untai tunggal atau ganda (DNA/RNA)
20.	DNA Ladder	Ukuran panjang DNA (tertentu) yang sudah diketahui. Digunakan untuk mengestimasi ukuran DNA sampel yang dianalisis (dengan satuan <i>base pair</i>)
21.	Enzim restriksi (<i>TasI</i> , <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i>)	Sebagai enzim pemotong DNA untuk memotong basa DNA yang diinginkan untuk kemudian di elektroforesis
22.	Buffer Digest	Membantu enzim restriksi
23.	Loading dye	Untuk membantu pewarnaan pada DNA sehingga memudahkan untuk memvisualisasi pada saat fase elektroforesis
24.	Aluminium foil	Membantu pada saat DNA sampel akan dimasukkan ke dalam sumur (<i>wells</i>)

Lampiran 5. Daftar Alat untuk Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis

No.	Nama Alat	Fungsi
1.	Autoclave	Untuk sterilisasi alat
2.	Mesin PCR (Biothermal Thermocycler)	Untuk amplikasi DNA
3.	Vortex	Untuk menghomogenkan larutan
4.	Mikropipet dan Tip	Untuk mengambil sampel/bahan-bahan cair (larutan) dalam jumlah kecil dan tertentu
5.	Tabung Eppendorf	Tabung untuk menyimpan DNA sampel dan bahan-bahan lain
6.	Waterbath	Untuk inkubasi sampel DNA hasil ekstraksi
7.	Mesin Centrifuge	Untuk memisahkan komponen-komponen yang terdapat dalam larutan pada proses ekstraksi DNA
8.	Timbangan Analitik	Menimbang bahan-bahan yang diperlukan
9.	Mesin Spektrofotometer	Mengukur kuantitas DNA yang diuji
10.	Electroporesis chamber	Untuk memisahkan DNA hasil amplikasi pada tegangan tertentu
11.	Lemari es	Menyimpan sampel DNA dan bahan-bahan yang digunakan
12.	UVTransluminator (BiodoAnalyze)	Melihat visualisasi kualitas DNA dan hasil amplikasi
13.	Gelas ukur	Untuk mengukur kebutuhan bahan-bahan atau larutan yang akan digunakan
14.	Hot plate	Untuk memanaskan larutan sehingga larutan tersebut terlarut
15.	Magnetic stirrer	Untuk mengaduk larutan sehingga larutan

	tersebut terlarut
--	-------------------



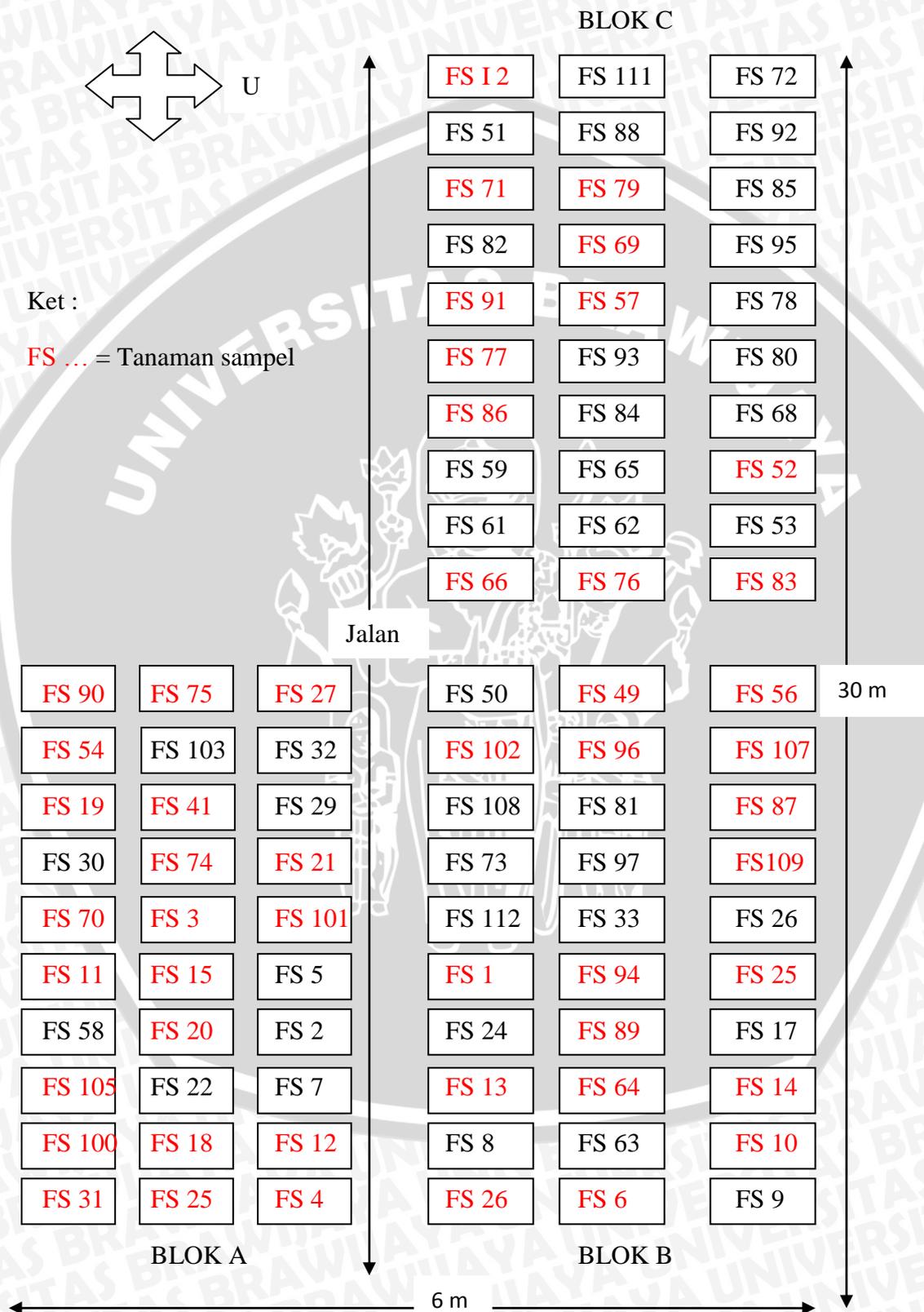
Lampiran 6. Daftar Sampel Daun Tanaman hasil Fusan

No.	Label Tanaman	Label Sampel	Bobot (gram)
1.	FS 31	F1	0.3008
2.	FS 74	F2	0.3018
3.	FS 12	F3	0.3001
4.	FS 75	F4	0.3000
5.	FS 105	F5	0.3000
6.	FS 70	F6	0.3003
7.	FS 100	F7	0.3009
8.	FS 15	F8	0.3004
9.	FS 90	F9	0.3003
10.	FS 101	F10	0.3020
11.	FS 3	F11	0.3003
12.	FS 13	F12	0.3015
13.	FS 1	F13	0.3042
14.	FS 96	F14	0.3019
15.	FS 49	F15	0.3006
16.	FS 71	F16	0.3064
17.	FS 57	F17	0.3049

18.	FS 69	F18	0.3006
19.	FS 77	F19	0.3026
20.	FS 86	F20	0.3058
21.	FS 79	F21	0.3093
22.	FS 56	F22	0.3042
23.	FS 109	F23	0.3017
24.	FS 64	F24	0.3084
25.	FS 89	F25	0.3046
26.	FS 107	F26	0.3096
27.	FS 87	F27	0.3036
28.	FS 10	F28	0.3087
29.	FS 66	F29	0.3062
30.	FS 83	F30	0.3069
31.	FS 76	F31	0.3004
32.	FS 14	F32	0.3027
33.	FS 91	F33	0.3094
34.	FS 18	F34	0.3087
35.	FS 52	F35	0.3020
36.	FS 4	F36	0.3039

37.	FS 6	F37	0.3008
38.	FS I 2	F38	0.3092
39.	FS 19	F39	0.3081
40.	FS 41	F40	0.3066
41.	FS 27	F41	0.3090
42.	FS 102	F42	0.3059
43.	FS 21	F43	0.3012
44.	FS 54	F44	0.3005
45.	FS 25	F45	0.3073
46.	FS 20	F46	0.3058
47.	FS 94	F47	0.3080
48.	FS 7	F48	0.3059
49.	FS 11	F49	0.3070
50.	FS 23	F50	0.3073
51.	Mandarin Satsuma	Parental	0.3050
52.	Siam Madu	Parental	0.3014

Lampiran 7. Denah Tanaman Jeruk hasil Fusi Protoplasma



Lampiran 8. Tabel Pengambilan Sampel Tanaman Jeruk untuk Isolasi DNA

Tabel 6. Pengambilan sampel daun muda tanaman jeruk fusi ke 1 tanggal 06 Maret 2013

No.	Label	Kode Sampel	Bobot Sampel (gr)
1	FS 31	F1	0.3008
2	FS 74	F2	0.3018
3	FS 12	F3	0.3001
4	FS 75	F4	0.3
5	FS 105	F5	0.3
6	FS 70	F6	0.3003
7	FS 100	F7	0.3009
8	FS 15	F8	0.3004
9	FS 90	F9	0.3003
10	FS 101	F10	0.3020
11	FS 3	F11	0.3003

Tabel 7. Pengambilan sampel daun muda tanaman jeruk fusi ke 2 tanggal 11 Maret 2013

No.	Label	Kode Sampel	Bobot Sampel (gr)
1	FS 13	F12	0.3015

2	FS 1	F13	0.3042
3	FS 96	F14	0.3019
4	FS 49	F15	0.3006
5	FS 71	F16	0.3064
6	FS 57	F17	0.3049
7	FS 69	F18	0.3006
8	FS 77	F19	0.3026
9	FS 86	F20	0.3058
10	FS 79	F21	0.3093
11	FS 56	F22	0.3042
12	FS 109	F23	0.3017
13	FS 64	F24	0.3084
14	FS 89	F25	0.3046
15	FS 107	F26	0.3096
16	FS 87	F27	0.3036
17	FS 10	F28	0.3087
18	FS 66	F29	0.3062
19	FS 83	F30	0.3069
20	FS 76	F31	0.3004

Tabel 8. Pengambilan sampel daun muda tanaman jeruk fusi ke 3 tanggal 14 Maret 2013

No.	Label	Kode Sampel	Bobot Sampel (gr)
1	FS 14	F32	0.3027
2	FS 91	F33	0.3094
3	FS 18	F34	0.3087
4	FS 52	F35	0.3020
5	FS 4	F36	0.3039
6	FS 6	F37	0.3008
7	FS I 2	F38	0.3092
8	FS 19	F39	0.3081
9	FS 41	F40	0.3066
10	FS 27	F41	0.3090
11	FS 102	F42	0.3059
12	FS 21	F43	0.3012
13	FS 54	F44	0.3005
14	FS 25	F45	0.3073
15	FS 20	F46	0.3058
16	FS 94	F47	0.3080
17	FS 7	F48	0.3098

18	FS 11	F49	0.3070
19	FS 23	F50	0.3073

Tabel 9. Pengambilan sampel daun muda tanaman jeruk fusi ke 4 tanggal 20 Maret 2013

No.	Label	Kode Sampel	Bobot Sampel (gr)
1	P.SIAM MADU	F51	0.3050
2	P.MANDARIN	F52	0.3014
3	FS 2	F53	0.3066
4	FS 32	F54	0.3002
5	FS 29	F55	0.3070
6	FS 58	F56	0.3035
7	FS 22	F57	0.3052
8	FS 97	F58	0.3092
9	FS 62	F59	0.3024
10	FS 84	F60	0.3080
11	FS 5	F61	0.3020
12	FS 8	F62	0.3021
13	FS 17	F63	0.3082

Lampiran 9. Tabel perhitungan volume DNA sampel hasil pengenceran tanggal 23 Maret 2013

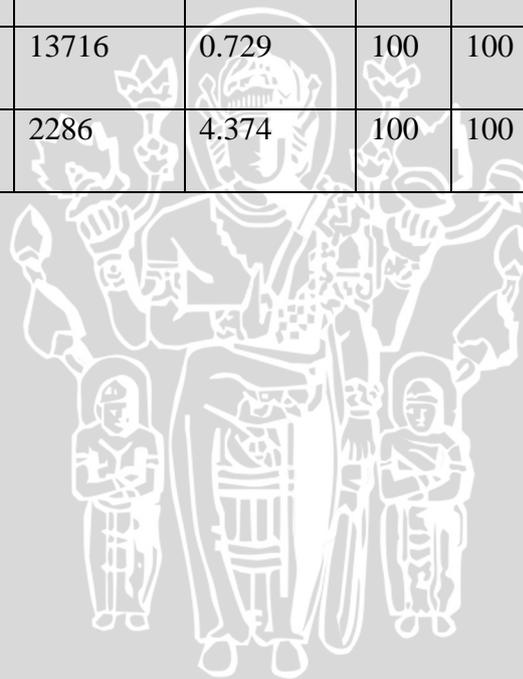
Tabel 10. Tabel perhitungan volume DNA sampel hasil pengenceran tanggal 23 Maret 2013

No.	Sampel	M1	V1	M2	V2
1	F1	2286	4.374	100	100
2	F2	3429	2.916	100	100
3	F3	11430	0.874	100	100
4	F4	11430	0.874	100	100
5	F5	6858	1.45	100	100
6	F6	13716	0.729	100	100
7	F7	11430	0.874	100	100
8	F8	11430	0.874	100	100
9	F9	4572	2.18	100	100
10	F10	6858	1.45	100	100
11	F11	13716	0.729	100	100
12	F12	13716	0.729	100	100
13	F13	13716	0.729	100	100
14	F14	6858	1.45	100	100
15	F15	11430	0.874	100	100
16	F16	18288	0.546	100	100

17	F17	13716	0.729	100	100
18	F18	18288	0.546	100	100
19	F19	11430	0.874	100	100
20	F20	18288	0.546	100	100
21	F21	11430	0.874	100	100
22	F22	13716	0.729	100	100
23	F23	11430	0.874	100	100
24	F24	11430	0.874	100	100
25	F25	13716	0.729	100	100
26	F26	11430	0.874	100	100
27	F27	13716	0.729	100	100
28	F28	18288	0.546	100	100
29	F29	13716	0.729	100	100
30	F30	18288	0.546	100	100
31	F31	16002	0.624	100	100
32	F32	9144	1.09	100	100
33	F33	13716	0.729	100	100
34	F34	11430	0.874	100	100
35	F35	16002	0.624	100	100

36	F36	6858	1.45	100	100
37	F37	16002	0.624	100	100
38	F38	9144	1.09	100	100
39	F39	9144	1.09	100	100
40	F40	18288	0.546	100	100
41	F41	18288	0.546	100	100
42	F42	16002	0.624	100	100
43	F43	11430	0.874	100	100
44	F44	9144	1.09	100	100
45	F45	11430	0.874	100	100
46	F46	16002	0.624	100	100
47	F47	16002	0.624	100	100
48	F48	13716	0.729	100	100
49	F49	13716	0.729	100	100
50	F50	11430	0.874	100	100
51	P.SIAM MADU	13716	0.729	100	100
52	P.MANDARIN	18288	0.546	100	100
53	F53	2286	4.374	100	100
54	F54	11430	0.874	100	100

55	F55	4572	2.18	100	100
56	F56	2286	4.374	100	100
57	F57	4572	2.18	100	100
58	F58	2286	4.374	100	100
59	F59	2286	4.374	100	100
60	F60	11430	0.874	100	100
61	F61	11430	0.874	100	100
62	F62	13716	0.729	100	100
63	F63	2286	4.374	100	100



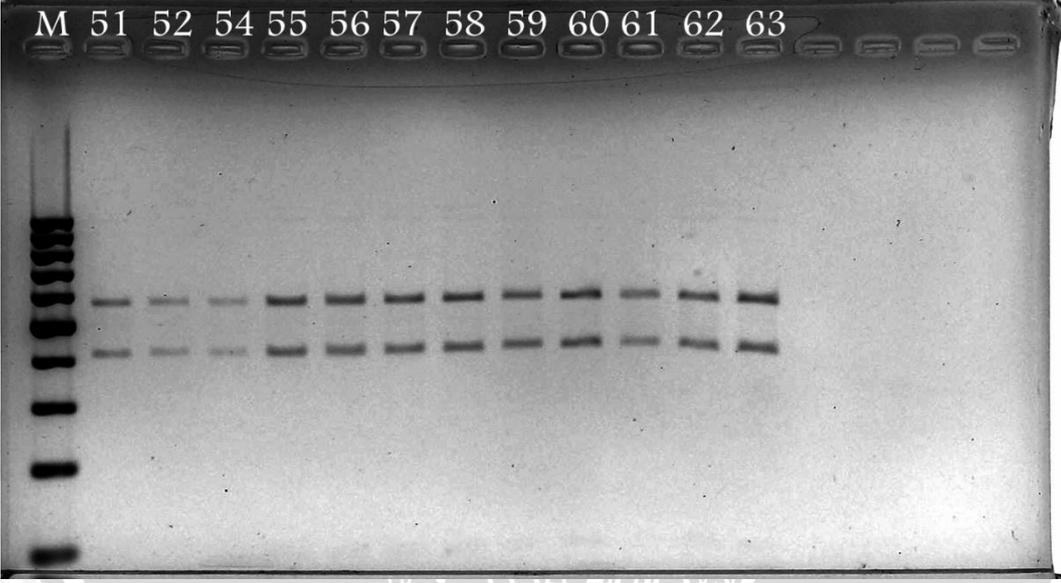
Lampiran 10. Visualisasi kombinasi antara primer 18S_rRNA dan Enzim *TasI*



M 51 52 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 53



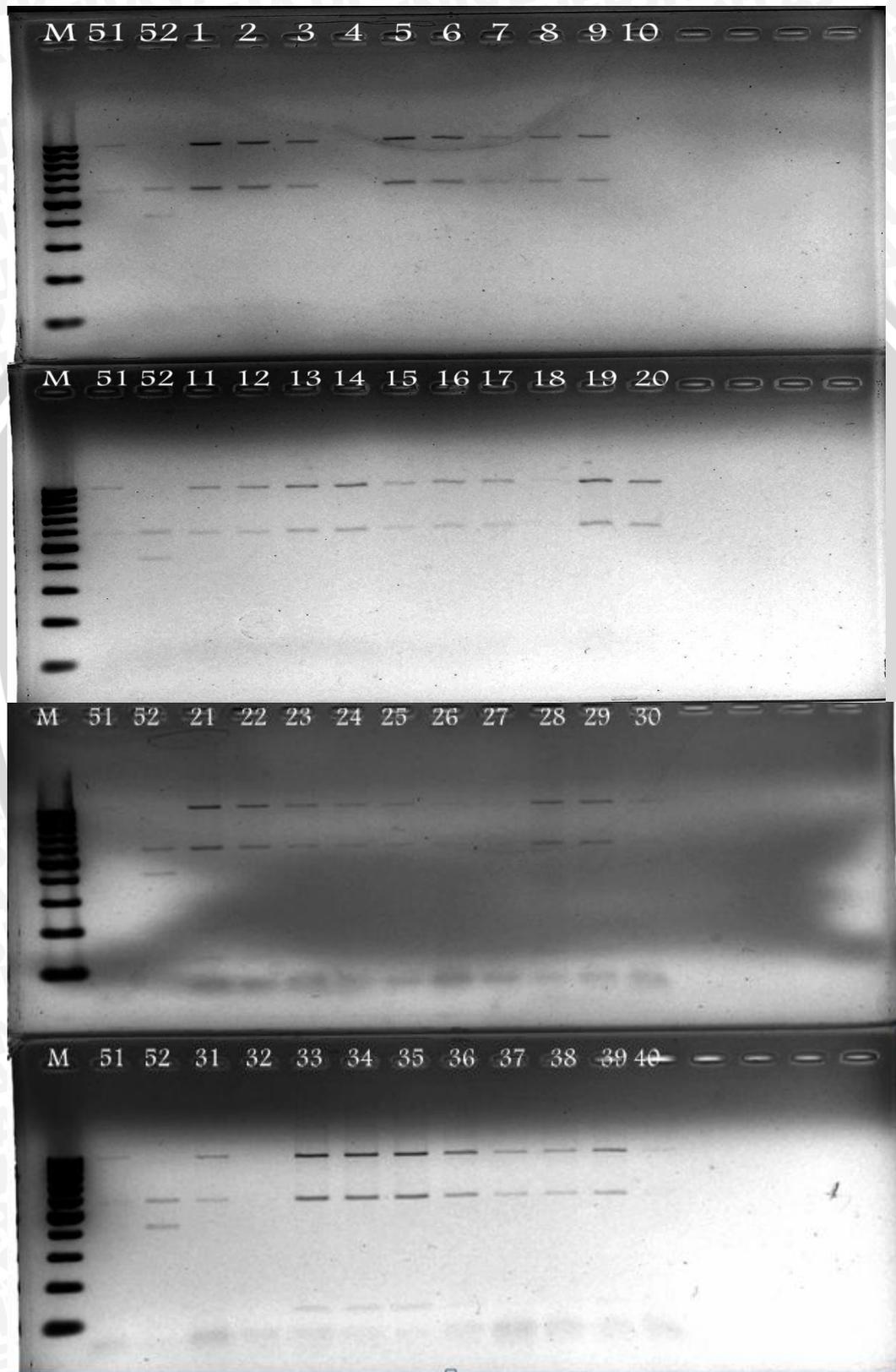
M 51 52 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63



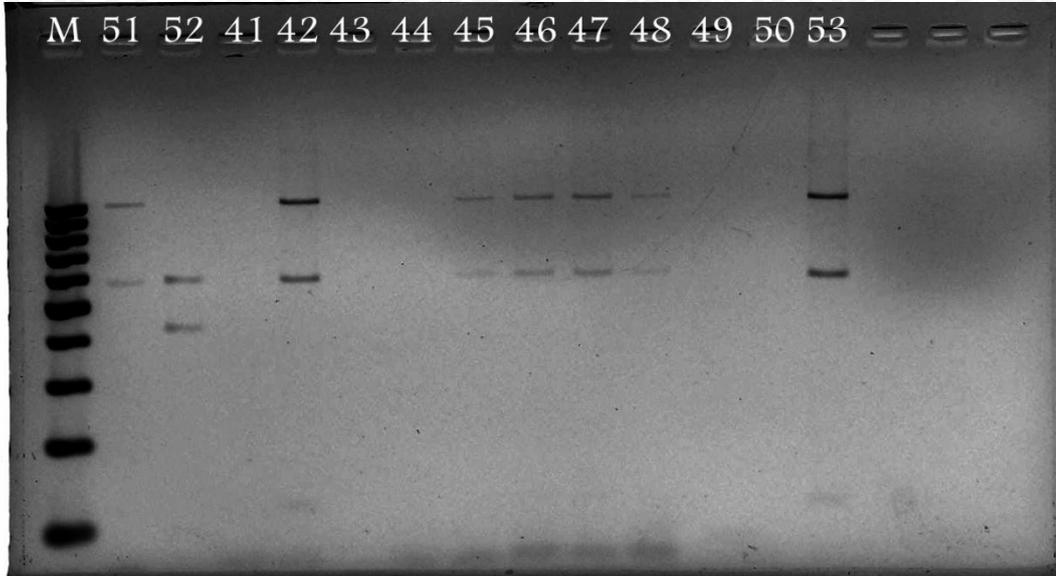
BRUNNEN



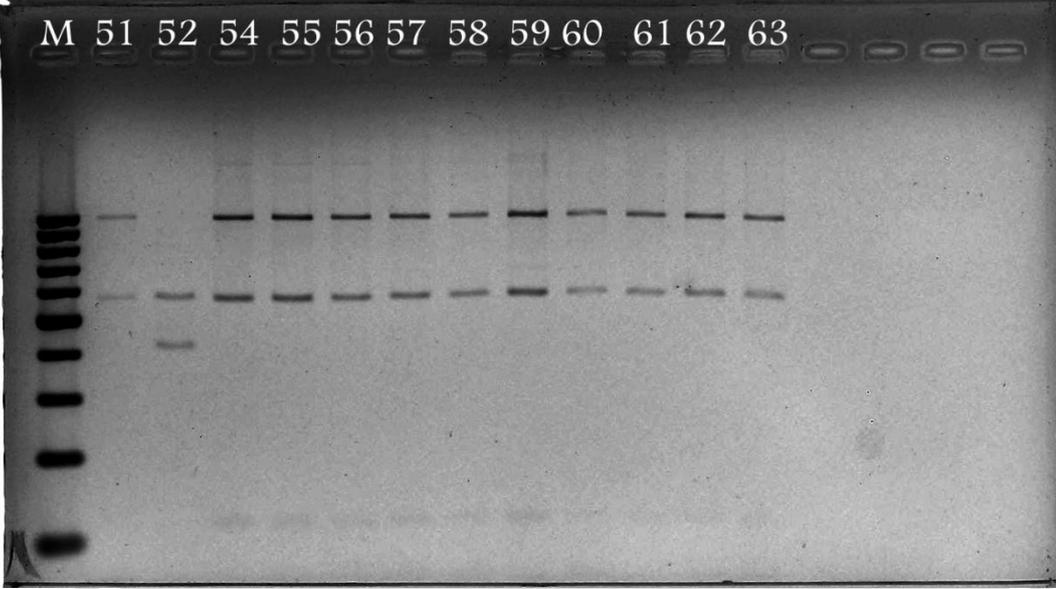
Lampiran 11. Visualisasi kombinasi antara primer nad 1 exon C/B dan Enzim *TasI*



M 51 52 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 53



M 51 52 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63



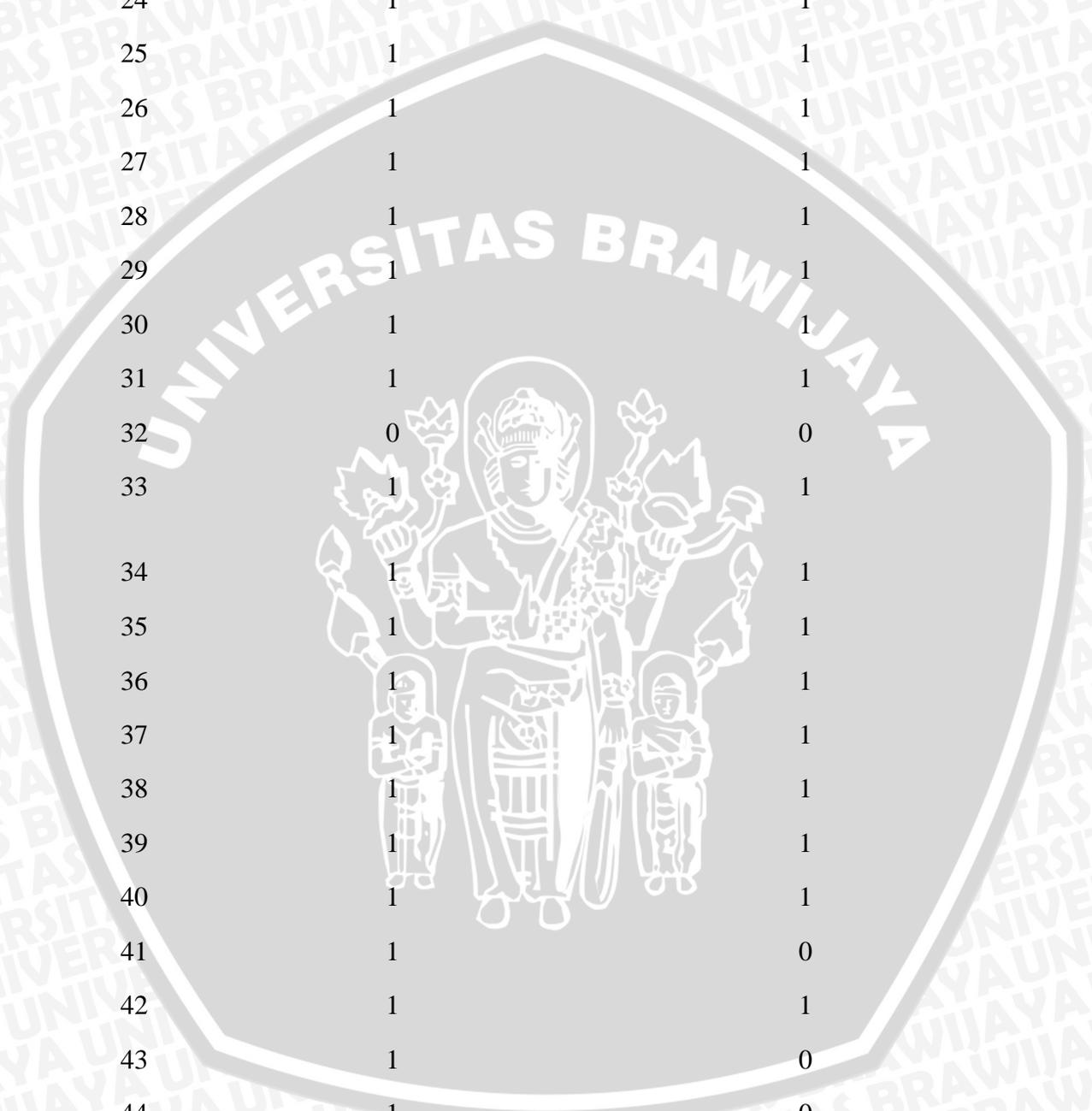
Lampiran 12. Jumlah lokus hasil visualisasi

Tabel 3. Jumlah lokus hasil visualisasi dari proses PCR antara kombinasi DNA sampel dan pasangan primer universal

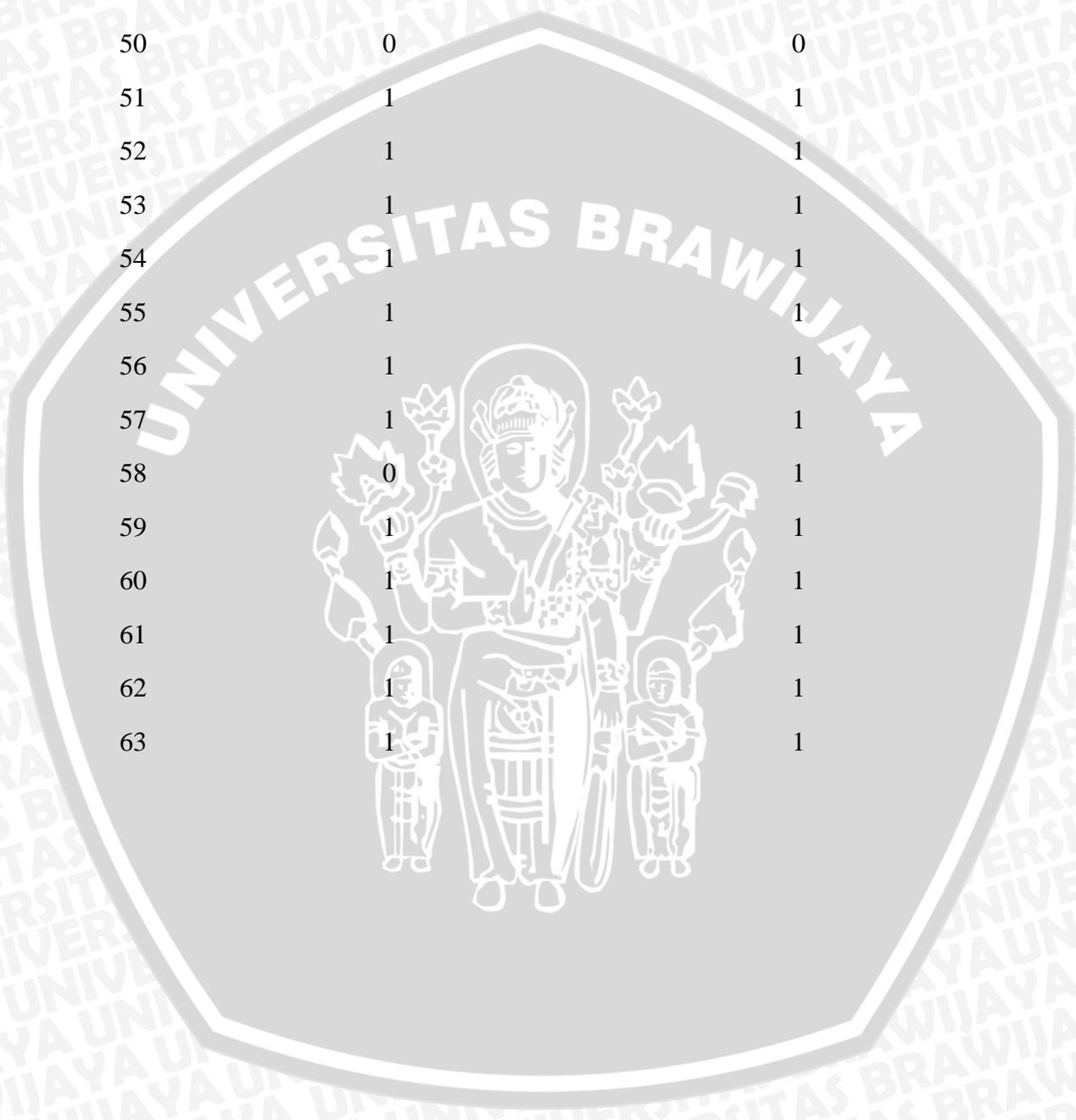
Genotipe fusan	Primer mitokondria	
	<i>18S_rRNA_5S_rRNA F/R</i>	<i>nad 1 exon C/B</i>
1	1	1
2	1	1
3	1	1
4	1	1
5	1	1
6	1	1
7	1	1
8	1	1
9	1	1
10	1	0
11	1	1
12	1	1
13	1	1
14	1	1
15	1	1
16	1	1
17	1	1
18	1	1
19	1	1
20	1	1
21	1	1



22	1	1
23	1	1
24	1	1
25	1	1
26	1	1
27	1	1
28	1	1
29	1	1
30	1	1
31	1	1
32	0	0
33	1	1
34	1	1
35	1	1
36	1	1
37	1	1
38	1	1
39	1	1
40	1	1
41	1	0
42	1	1
43	1	0
44	1	0
45	1	1
46	1	1



47	1	1
48	1	1
49	0	0
50	0	0
51	1	1
52	1	1
53	1	1
54	1	1
55	1	1
56	1	1
57	1	1
58	0	1
59	1	1
60	1	1
61	1	1
62	1	1
63	1	1



Lampiran 13. BiodataPeneliti**BIODATA MAHASISWA**

NAMA LENGKAP : Erlangga Setyawan

NIM : 0910483011

TTL : Surabaya, 31 Juli 1991

PROGRAM STUDI : Agroekoteknologi

JURUSAN : Budidaya Pertanian

MINAT : Pemuliaan Tanaman

ANGKATAN : 2009

NO TELP : +62 878 594 94 951

EMAIL : setyawan.erlangga@gmail.com

ALAMAT ASAL : Kompleks Pondok Cabe Indah Blok
G-4, Tangerang Selatan, Provinsi
Banten

ALAMAT DI MALANG :Jalan. Kepiting Kav 7, Kecamatan
Belimbing

ALAMAT TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium pemuliaan Balai
Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah
Subtropika (BALITJESTRO) Tlekung,
Kecamatan Junrejo, Kota Batu