

Kode>Nama Rumpun Ilmu : 113/ BIOLOGI

**LAPORAN
PENELITIAN DOSEN PEMULA**



**KARAKTERISASI KERAGAMAN CALON INDUKAN JERUK KEPROK
TAWANGMANGU (*Citrus Reticulata* BLANCO ssp. TAWANGMANGU)
BERDASARKAN ANALISIS *INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS* (ISSR)**

Einstivina Nuryandani, S.Si., M.Si

NIDN : 0012038303

**UNIVERSITAS TERBUKA
DESEMBER 2013**

**HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN DOSEN PEMULA**

Judul Penelitian : Karakterisasi Keragaman Calon Indukan Jeruk Keprok Tawangmangu (*Citrus Reticulata* Blanco ssp. Tawangmangu) Berdasarkan Analisis *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR)

Kode>Nama Rumpun Ilmu : 113/BIOLOGI

Ketua Peneliti :

a. Nama Lengkap : EINSTIVINA NURYANDANI, S.SI., M.SI.

b. NIDN : 0012038303

c. Jabatan Fungsional : ASISTEN AHLI

d. Program Studi : BIOLOGI

e. Nomor HP : 08159759934

f. Alamat surel (e-mail) : einstivina@ut.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : DWI ARI WAHYUNI

b. NIDN : -

c. Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS TERBUKA

Biaya Penelitian

: - diusulkan ke DIKTI Rp.....
- dana internal PT Rp15.000.000
- dana institusi lain Rp.
- *inkind* sebutkan



Semarang, 31 Desember 2013
Ketua Peneliti,

Einstivina Nuryandani, M.Si
NIP. 19830312 200812 2 004

Menyetujui



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN PENGESAHAN	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Biologi Jeruk Keprok Tawangmangu.....	4
A.1. Klasifikasi Jeruk Keprok Tawangmangu	4
A.2. Morfologi Jeruk Keprok Tawangmangu (<i>Citrus reticulata</i> Blanco spp. Tawangmangu).....	4
A.3. Persyaratan Tumbuh Jeruk Tawangmangu.....	5
A.4. Sejarah Perkembangan Jeruk Tawangmangu	6
A.5. Upaya Rehabilitasi Jeruk Tawangmangu	6
B. Markah Molekuler	7
C. ISSR	8

BAB III METODE PENELITIAN	10
A. Waktu dan Tempat Penelitian	10
B. Bahan dan Alat	10
C. Rancangan Penelitian.....	10
D. Prosedur Pengambilan Data	10
D.1. Isolasi DNA	10
D.2. Visualisasi Hasil Isolasi Dengan Elektroforesis	11
D.3. Analisis Polimorfisme DNA dengan ISSR.....	12
E. Analisis Data.....	12
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	 15
 KESIMPULAN DAN SARAN	 23
KESIMPULAN	23
SARAN.....	23
 DAFTAR PUSTAKA	 24
 LAMPIRAN	 27

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Penampakan morfologi pohon jeruk keprok Tawangmangu (a) Asesi TG10, (b) Asesi TN4, (c) Asesi TB19, (d) Asesi TB6, (e) Asesi TB21, (f) Asesi TB18, (g) Asesi TB27, dan (h) Asesi D	16
Gambar 2. Penampakan daun pohon jeruk keprok Tawangmangu yang dianalisis (a) Asesi TG10, (b) Asesi TN4, (c) Asesi TB19, (d) Asesi TB6, (e) Asesi TB21, (f) Asesi TB18, (g) Asesi TB27, dan (h) Asesi D	17
Gambar 3. Visualisasi DNA hasil isolasi menggunakan elektroforesis pada agarosa 0,8 %	18
Gambar 4. Hasil PCR DNA genom delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu menggunakan Primer PKBT 2	19
Gambar 5. Hasil PCR DNA genom delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu menggunakan Primer PKBT 3	20
Gambar 6. Hasil PCR DNA genom delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu menggunakan Primer PKBT 6	20
Gambar 7. Hasil PCR DNA genom delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu menggunakan Primer PKBT 8	21
Gambar 8. Hasil PCR DNA genom delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu menggunakan Primer PKBT 9	21
Gambar 9. Dendogram delapan buah asesi jeruk keprok Tawangmangu	22

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data biner 8 aksesi jeruk keprok tawangmangu yang diamplifikasi menggunakan Primer PKBT 2, PKBT 3, PKBT 6, PKBT 8 dan PKBT 9	28

ABSTRAK

Pemuliaan tanaman jeruk Tawangmangu menghadapi kendala dalam penentuan tetua-tetua tanaman yang potensial untuk dikembangkan. Karakterisasi molekuler merupakan salah satu upaya menentukan calon tetua bagi proses pemuliaan tanaman. Salah satu penanda DNA yang dapat diterapkan adalah metode *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR).

Penelitian ini menganalisis keragaman delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu) yaitu Asesi TG10, TN4, TB19, TB6, TB21, TB18, TB27, dan D menggunakan lima buah primer ISSR, yaitu PKBT 2, PKBT 3 PKBT 6, PKBT 8, dan PKBT 9. Data keragaman berdasarkan penampilan pola pita DNA dianalisis menggunakan analisis gerombol (*cluster analysis*) dengan teknik berhierarki yang ada dalam program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* versi 2.10 (NTSYS) metode *Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering* (SAHN). Selanjutnya pengelompokan itu ditampilkan dalam bentuk dendogram.

Amplifikasi DNA terhadap 8 asesi jeruk keprok Tawangmangu dengan menggunakan primer PKBT 2, PKBT 3 PKBT 6, PKBT 8, dan PKBT 9 menghasilkan 1 hingga 4 pita DNA berukuran sekitar 200 bp hingga 1000 bp. Dendogram menunjukkan bahwa 8 asesi yang digunakan dalam analisis ISSR memiliki kemiripan yang tinggi, yaitu sekitar 80%. Asesi TG10 memiliki kekerabatan yang paling jauh dari ketujuh asesi yang lain, yaitu terpisah pada koefisien kemiripan sekitar 80%, sedangkan Asesi TB18 terpisah dengan asesi yang lain pada koefisien kemiripan sekitar 86%.

ABSTRACT

Breeding Tawangmangu tangerines face constraints in determining crop elders potential to be developed. Molecular characterization is one way to determine a candidate parent for plant breeding process. One of the DNA markers that can be applied are Inter Simple Sequence Repeat (ISSR).

This study analyzed the diversity of eight accessions of Tawangmangu Tangerines that are TG10, TN4, TB19, TB6, TB21, TB18, TB27, dan D accession using five ISSR primers, namely PKBT 2, PKBT 3 PKBT 6, PKBT 8, dan PKBT 9. Data based on the appearance pattern of DNA bands was analyzed using cluster analysis with hierarchical techniques in Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) programme 2.10 version with Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering (SAHN) method . Furthermore, it is shown in the form of clustering dendrogram . that eight accessions of Tawangmangu tangerines using five PKBT primers produces 1 to 4 sized DNA band of about 200 bp to 1000 bp . Dendrogram showed that 8 accessions used in the ISSR analysis has a high similarity , which is about 80 % . Accession TG10 has the most distant kinship from the other seven accessions , separate similarity coefficient is about 80 % , while a separate TB18 accession with the other six accessions on approximately 86 % similarity coefficient .

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kebutuhan nasional akan buah jeruk di Indonesia cukup tinggi. Konsumsi buah jeruk penduduk Indonesia pada tahun 2005 mencapai 2,6 kg per kapita per tahun (Shanti, 2007). Buah ini umumnya digunakan sebagai buah meja. Namun sebagian besar kebutuhan jeruk dalam negeri ini masih dipenuhi dari impor. Hal ini disebabkan rendahnya produksi nasional baik dari segi kuantitas maupun dari segi kualitas. Balitbang Pertanian (2005) mengemukakan bahwa Indonesia termasuk negara pengimpor jeruk terbesar kedua di ASEAN setelah Malaysia, dengan volume impor mencapai 94.696 ton.

Sangat disayangkan memang, mengingat sebenarnya kita juga memiliki kultivar-kultivar jeruk unggulan yang sangat potensial untuk dikembangkan. Saat ini, Indonesia memiliki beberapa kultivar unggul jeruk keprok yang kualitasnya dapat menandingi jeruk impor. Beberapa kultivar jeruk keprok komersial hasil seleksi Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) maupun dari Pemerintah Daerah yang sudah dilepas oleh Kementerian Pertanian dengan kualitas buah yang tidak kalah dengan jeruk impor antara lain Keprok Batu 55 yang berasal dari Batu, Jawa Timur, keprok Garut dari Jawa Barat, keprok Pulung dari Jawa Timur, keprok Tawangmangu dari Jawa Tengah, dan keprok SOE dari NTT. Jenis keprok lainnya, seperti keprok Tejakula (Bali), keprok Madura, keprok Borneo Prima (Kaltim) dan keprok Trigas (Kalbar) tampaknya juga dapat berpotensi untuk dikembangkan di masa mendatang khususnya untuk dataran rendah (Hardiyanto, 2012 dan Menteri Pertanian Republik Indonesia, 2003).

Salah satu buah unggulan yaitu jeruk keprok Tawangmangu (*Citrus reticulata* Blanco ssp Tawangmangu), berasal dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Keunggulan jeruk keprok Tawangmangu tersebut menurut Keputusan Menteri Pertanian Nomor : 456/Kpts/PD.210/9/2003 tentang Pelepasan Jeruk Keprok Tawangmangu sebagai Varietas Unggul tanggal 15 September 2003 adalah berkualitas cukup baik, kulit buah mudah dikupas, penampilan buah menarik, rasa manis, produksi cukup tinggi dan berpotensi untuk mengangkat serta mengenalkan buah-buahan lokal kepada khalayak yang lebih luas. Persebaran tanaman ini meliputi daerah Karanganyar, Magetan, dan sekitarnya.

Jeruk keprok Tawangmangu mengalami masa-masa kejayaan sekitar tahun 1980-1983. Namun masa kejayaan tersebut berakhir sekitar tahun 1984 dengan adanya serangan *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) (Giyanti, 2001). Hampir seluruh tanaman jeruk Tawangmangu mati karena serangan penyakit tersebut, bahkan dewasa ini dapat dikatakan punah (Wahyuningsih, 2009).

Berdasarkan penelusuran data koleksi, ternyata tidak semua tanaman induk jeruk keprok Tawangmangu tersebut telah punah. Balitjestro memiliki koleksi asesi jeruk keprok Tawangmangu (Hardiyanto, 2012). Penelitian Nuryandani (2012) juga menemukan 22 asesi tanaman induk jeruk keprok Tawangmangu yang ditanam pada pekarangan warga di daerah Tawangmangu. Asesi-asesi tersebut potensial untuk dikembangkan sebagai tanaman induk bagi pengembangan jeruk keprok Tawangmangu di masa datang. Permasalahan yang dihadapi dalam pengembangan jeruk Tawangmangu adalah keterbatasan informasi tentang asesi-asesi yang ditemukan. Dalam hal ini pemuliaan tanaman memiliki peran yang sangat penting. Pemuliaan tanaman jeruk Tawangmangu menghadapi kendala dalam penentuan tetua-tetua tanaman yang potensial untuk dikembangkan. Deskripsi tanaman jeruk Tawangmangu di Indonesia masih dilakukan secara sederhana dan tidak bersifat universal. Penggunaan ciri morfologi atau fenotipe memiliki keterbatasan karena sangat dipengaruhi lingkungan sehingga akan memberikan hasil yang berbeda-beda bergantung pada tempat tumbuhnya.

Untuk itulah perlu dikembangkan suatu informasi genetik yang bersifat universal. Upaya ini dapat diwujudkan menggunakan penanda molekuler. Informasi berdasarkan analisis molekuler diharapkan mampu menjawab permasalahan dalam karakterisasi tanaman jeruk Tawangmangu yang ada di Indonesia.

Penanda molekuler antara lain penanda isozim dan penanda DNA. Kedua penanda tersebut mempunyai prinsip dan interpretasi genetika yang sama. Perbedaannya terlihat pada pita polimorfisme. Pada isozim berupa protein atau ekspresi gen, sedangkan pada penanda DNA berupa fragmen DNA. Biaya penggunaan penanda isozim lebih murah daripada penanda DNA, namun terdapat kelemahan, karena merupakan hasil ekspresi gen, yaitu protein, maka ekspresi isozim pada tanaman sangat dipengaruhi lingkungan maupun bagian tumbuhan yang digunakan dalam analisis.

Pada penelitian ini, akan digunakan penanda DNA. Salah satu penanda DNA yang dapat diterapkan adalah metode *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). Teknik

ISSR dapat melihat polimorfisme berdasarkan pada bagian mikrosatelit DNA dan menunjukkan hubungan kekerabatan antar kultivar yang diuji.

Kombinasi antara sifat morfologi kultivar-kultivar terpilih dengan karakter molekuler kultivar tersebut dapat digunakan pada tahap seleksi awal dalam menentukan tetua yang akan disilangkan untuk menghasilkan klon-klon jeruk keprok Tawangmangu unggulan.

B. Perumusan Masalah

1. Adanya keterbatasan jumlah pohon induk jeruk keprok Tawangmangu
2. Belum adanya karakterisasi secara genetik pada calon-calon indukan yang akan dijadikan tetua dalam pemuliaan tanaman.

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk :

1. melakukan karakterisasi keragaman calon pohon induk jeruk keprok Tawangmangu.
2. mempersiapkan data genetik calon indukan tanaman jeruk keprok Tawangmangu

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat:

1. memberikan manfaat dalam usaha penyediaan pohon induk jeruk keprok Tawangmangu.
2. memberikan kontribusi dalam pengembangan jeruk keprok Tawangmangu.
3. menghasilkan data molekuler jeruk keprok Tawangmangu yang bermanfaat sebagai acuan bagi program pemuliaan tanaman dan konservasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Biologi Jeruk Keprok Tawangmangu

Jeruk keprok Tawangmangu merupakan salah satu jeruk lokal komersial selain jeruk keprok Garut (Jawa Barat), Batu 55 (Jawa Timur), Pulung (Ponorogo), Madura (Pulau Madura), dan Tejakula (Bali). Berikut merupakan karakteristik jeruk keprok Tawangmangu (Hardiyanto *et al.*, 2007).

A.1. Klasifikasi Jeruk Keprok Tawangmangu

Klasifikasi botani tanaman jeruk Tawangmangu menurut Van Steenis (1975) adalah sebagai berikut.

- Divisi : Spermatophyta
- Sub divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonae
- Ordo : Rurales
- Keluarga : Rutaceae
- Genus : *Citrus*
- Spesies : *Citrus nobilis* Lour.
- Sub Spesies : Tawangmangu
- Sinonim : *Citrus reticulata* L., *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus deliciosa*, *Citrus chrysocarpa*.
- Nama daerah : Jeruk Keprok (Melayu dan Jawa, Jeruk Jepun (Sunda dan Sumatra), dan Jeruk Maseh (Verheij dan Coronel, 1992).

A.2. Morfologi Jeruk Keprok Tawangmangu (*Citrus reticulata* Blanco spp Tawangmangu)

Jeruk keprok Tawangmangu merupakan tumbuhan jenis pohon dengan tinggi mencapai 2-8 meter (Van Steenis, 1975). Penelitian Giyanti (2001) menyebutkan bahwa tinggi pohon jeruk keprok Tawangmangu berkisar antara 4,86 – 8,97 m. Sedangkan penelitian oleh Nuryandani (2012) menemukan bahwa pohon ini dapat mencapai ketinggian 9,24 meter.

Pohon ini memiliki ranting yang tidak berduri (Van Steenis, 1975 dan Giyanti, 2001). Diameter batangnya antara 8,27 – 24,82 cm (Giyanti, 2001).

Penelitian oleh Nuryandani (2012) menyebutkan bahwa diameter batang tanaman ini dapat mencapai 30,57 cm. Tajuk tanaman 95%-nya memiliki bentuk tidak beraturan, hanya 5% yang mempunyai bentuk payung. Sedangkan bentuk percabangan semua menunjukkan asimetris (Giyanti 2001).

Van Steenis (1975) menjelaskan bahwa tangkai daun bersayap sangat sempit sampai tidak bersayap, panjang 0,5 - 1,5 cm. Helaiian daun tanaman ini berbentuk bulat telur memanjang, elliptis atau berbentuk lanset dengan ujung tumpul, melekuk ke dalam sedikit, tepi bergerigi beringgit sangat lemah dengan panjang 3,5-8 cm. Diameter tangkai daun antara 1 - 1,5 mm. Bunga mempunyai diameter 1,5-2,5 cm, berkelamin dua dan daun mahkotanya berwarna putih .

Warna kulit buah jeruk keprok Tawangmangu dari hijau sampai kuning tua, hal ini tergantung dari umur buah. Berat buah rata-rata jeruk keprok asli Tawangmangu 62,98 gram. Buah jeruk keprok asli Tawangmangu mempunyai aroma dan bau yang tajam serta bentuk dari buah terdapat tonjolan seperti pusar, tekstur lembut dan lunak. Buah yang masak sempurna rasanya manis dengan aroma yang tajam (Giyanti, 2001).

Menurut Van Steenis (1975) buah jeruk keprok berbentuk bola tertekan dengan tebal kulit 0,2 - 0,3 cm. Warna daging buah oranye (Van Steenis, 1975 dan Giyanti, 2001) dengan rata-rata jumlah juring 10,5 (Giyanti, 2001). Diameter buah rata-rata adalah 5,19 cm (Giyanti, 2001) atau 5-8 cm (Van Steenis, 1975) dengan bentuk buah bulat berlekuk dan di dalamnya terdapat rongga udara yang cukup lebar (Giyanti, 2001).

Bentuk biji buah jeruk keprok Tawangmangu adalah bulat pipih dengan warna biji krem/coklat muda (Giyanti, 2001). Biji jeruk keprok Tawangmangu bersifat poliembrional, artinya dalam 1 biji terdapat lebih dari 1 embrio yang dapat tumbuh. Embrio yang berasal dari hasil pembuahan disebut embrio genetik, sedangkan embrio yang bukan berasal dari hasil pembuahan disebut embrio somatik. Embrio somatik mempunyai sifat sama dengan induknya (Utama, 2002).

A.3. Persyaratan Tumbuh Jeruk Tawangmangu

Jeruk keprok seperti Batu, Garut, dan Tawangmangu sangat baik diusahakan di tempat-tempat dengan ketinggian 700 – 1200 meter di atas permukaan laut (Sarwono,1993). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jeruk

Tawangmangu yang ditanam pada ketinggian lebih dari 1.000 m dpl pada Tanah Acrudoxin Hapludands dengan curah hujan rata-rata sebesar 3.166 mm/tahun mempunyai kualitas internal yang lebih baik dibandingkan dengan jeruk Tawangmangu yang ditanam pada ketinggian kurang dari 1.000 m dpl pada tanah Typic Dystrudepts dengan curah hujan rata-rata sebesar 2.715 mm/tahun (Apriyana *et al.*, 2009).

Menurut Apriyana *et al.* (2009), jeruk keprok Tawangmangu dengan kualitas yang baik menghendaki suhu sekitar 19⁰C pada saat pembungaan, serta suhu yang lebih tinggi dan stabil sekitar 22-23⁰C dan radiasi sekitar 400 kal/cm² saat memasuki fase pembentukan buah sampai dengan pematangan buah .

Pada ketinggian lebih dari 1.000 m dpl total padatan terlarut dan angka asam nyata dipengaruhi oleh sebagian unsur makro, seperti N, P, K, dan unsur mikro, seperti Fe, B, dan Cu, serta beberapa unsur mineral pasir, seperti Opak, Gelas Vulkanis, dan Labradorit. Pada ketinggian kurang dari 1.000 m dpl total padatan terlarut nyata dipengaruhi oleh KTK (Kapasitas Tukar Kation), Al (Alumunium), bahan organik, unsur mikro, serta mineral Opak, Gelas Vulkanis, dan Labradorit. Untuk angka asam nyata dipengaruhi oleh unsur-unsur makro. Sedangkan kandungan gula nyata dipengaruhi oleh ketersediaan Hornblende, Augit, dan Hiperstin. Dengan demikian jeruk Tawangmangu lebih cocok bila dibudidayakan pada tanah Typic Dystrudepts (tanah dengan tekstur berlempung liat berpasir) dengan ketinggian lebih dari 1.000 m dpl (Apriyana *et al.*, 2009).

Lahan ideal untuk menanam jeruk keprok yaitu lahan yang memiliki lapisan tanah yang dalam, hingga kedalaman 150 cm tidak ada lapisan kedap air, kedalaman air tanah ± 75 cm, tekstur lempung berpasir, dan pH ± 6 . Jika pH tanah di bawah 5, unsur mikro dapat meracuni tanaman dan sebaliknya tanaman akan kekurangan jika pH di atas 7 (Sutopo, 2011). Lokasi yang cocok untuk budidaya jeruk keprok Tawangmangu meliputi wilayah Kecamatan Karangpandan, Ngargoyoso, Tawangmangu, Jatiyoso, Jenawi, serta Matesih (Ernawati, 2007).

A.4. Sejarah Perkembangan Jeruk Tawangmangu

Tawangmangu merupakan sentra buah jeruk asli Tawangmangu dan sempat mengalami kejayaan pada tahun 1980-1983 (Giyanti, 2001). Pada awal dekade 1980-an (Ernawati, 2007) atau pada tahun 1984 menurut Giyanti (2001), serangan *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) telah memusnahkan ratusan ribu batang tanaman jeruk keprok produktif yang dibudidayakan di wilayah Karanganyar.

Ironisnya, tanaman tak bisa langsung ditanam ulang di lokasi yang sama,, karena memerlukan waktu belasan hingga puluhan tahun untuk menghilangkan pengaruh CVPD yang terlanjur merasuk ke lahan yang semula ditanami jeruk keprok. Sejak saat itu, produksi jeruk keprok Tawangmangu nyaris terhenti total (Ernawati, 2007).

A. 5. Upaya Rehabilitasi Jeruk Tawangmangu

Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Ungaran sejak 1996/1997-1999/2000 telah melaksanakan penelitian untuk mengembalikan sentra produksi jeruk keprok Tawangmangu. Penelitian dilaksanakan di Desa Sepanjang, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar (Hermawan, *et al.*, 2002).

Rehabilitasi jeruk keprok Tawangmangu secara besar-besaran juga telah dilakukan sejak beberapa tahun lalu yang dimotori Dinas Pertanian (Dispartan) Jateng. Sedikitnya 200.000 batang induk jeruk keprok setiap tahun didistribusikan kepada para petani di berbagai wilayah, khususnya di Bumi Intanpari. Kendati demikian, hasilnya belum optimal karena virus CVPD masih mengancam. Obat pemberantas CVPD hingga saat ini belum ditemukan. Upaya menghindari penyebaran CVPD dapat dilakukan dengan karantina dan membakar tanaman yang menunjukkan gejala terserang (Ernawati, 2007).

Endarto *et al.*, (2005) menyatakan bahwa penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) merupakan penyakit penting yang sangat merugikan dalam budidaya tanaman jeruk. Program rehabilitasi sudah dilaksanakan namun penyakit ini masih menginfeksi ulang karena sumber-sumber penyakit masih terdapat di daerah sentra. Strategi pengendalian hama dan penyakit di kebun jeruk telah diformulasikan dalam Pengelolaan Terpadu Kebun Jeruk Sehat (PTKJS).

B. Markah Molekuler

Markah atau penanda molekuler merupakan penanda yang spesifik pada tiap makhluk hidup. Markah molekuler yang pertama kali dikenal adalah markah protein yang secara genetik dikenal sebagai markah isozim (Hunter dan Markert, 1957). Menurut Hamrick dan Gode, (1989), meskipun markah ini telah banyak digunakan dalam analisis genetik tanaman, namun memiliki beberapa kekurangan antara lain markah isozim masih sangat terbatas jumlahnya. Selain itu, beberapa sistem enzim tertentu dipengaruhi oleh regulasi perkembangan jaringan, yaitu hanya mengekspresikan suatu sifat pada jaringan tertentu.

Sejalan dengan semakin berkembangnya ilmu pengetahuan, maka pada awal tahun 1980-an ditemukan teknologi molekuler yang berbasis pada DNA. Markah molekuler tersebut dapat menutupi kekurangan dari markah isozim, karena jumlah yang tidak terbatas dan dapat melingkupi seluruh genom tanaman, tidak dipengaruhi oleh regulasi perkembangan jaringan, sehingga dapat dideteksi pada seluruh jaringan dan memiliki kemampuan yang sangat tinggi dalam menangkap keragaman karakter antar individu (Smith dan Smith, 1992).

Pemanfaatan markah DNA sebagai alat bantu seleksi *Marker Assisted Selection* (MAS) lebih menguntungkan dibandingkan dengan seleksi secara fenotipik. Seleksi dengan bantuan markah molekuler didasarkan pada sifat genetik tanaman saja, tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Dengan demikian, kegiatan pemuliaan tanaman menjadi lebih tepat, cepat, serta relatif lebih hemat biaya dan waktu (Azrai, 2005).

Metode yang berbasis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mempelajari keragaman genetik atau antar asesi tanaman telah banyak berkembang seperti RAPD (*Random Amplified Polymorphisme DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisme*) dan ISSR/SSRs (*Inter Simple Sequence Repeats/Simple Sequence Repeats*) (Wahyuni *et al.*, 2004).

Tiap teknik tidak hanya berbeda dalam metode amplifikasinya tetapi juga berbeda dalam jumlah pola pita yang dihasilkan (teramplifikasi). Jumlah pola pita yang dihasilkan dengan teknik RAPD atau ISSR/SSRs lebih sedikit bila dibanding dengan RFLP atau AFLP (Wahyuni *et al.*, 2004). Biasanya sebanyak 50-100 pola pita teramplifikasi pada AFLP yang hasilnya divisualisasikan pada denaturing polyacrylamide gel (Vos *et al.*, 1995),

sedangkan pada RAPD atau ISSR jumlah pita yang teramplifikasi hanya sedikit (kurang dari 20 pola pita), dan visualisasi dapat dilakukan pada agarose gel (Wahyuni *et al.*, 2004).

C. ISSR

ISSR merupakan penanda (marker) yang berkembang lebih akhir dibanding RAPD dan RFLP dan dapat pula digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada tanaman. ISSR/SSRs dikenal juga dengan istilah microsatelite yaitu berupa pengulangan mono, di, atau trinucleotida yang biasanya terdiri atas 4 - 10 unit pengulangan, membentang pada utas DNA. Susunan basa yang demikian merupakan karakteristik dari *nuclear genom* dan bervariasi antar spesies atau populasi (Wahyuni *et al.*, 2004).

Pada ISSR, pendeteksian polimorfisme genetic dapat dilakukan tanpa perlu lebih dahulu mengetahui susunan basa (*sequence*) dari genomik tanaman diantara susunan basa yang berulang, asal susunan basa berulang tersebut mewakili secara luas dan menyebar di seluruh genom. Terdapat beberapa type ISSR primer yaitu : (1) Un-anchored primer (primer tak berjangkar). Amplifikasi dengan primer tak berjangkar terjadi bila susunan basa yang berulang jaraknya dekat dengan template (2 - 3 kb) serta orientasinya terbalik. Bersifat multipel produk sehingga jumlah pola pita yang dihasilkan dapat lebih dari satu. (2) Anchored primer (primer berjangkar) yaitu primer dengan penambahan beberapa basa tidak berulang pada posisi '3 atau '5 di awal atau akhir susunan basa pada primer yang digunakan yang fungsinya adalah untuk memastikan target amplifikasi (Wahyuni *et al.*, 2004).

Teknik ISSR digunakan untuk mempelajari keragaman genetik diantaranya pada tanaman teh (Mondal, 2002; Lai *et al.*, 2001) dan *Botrycum pumicola* (Camacho dan Liston, 2001). Teknik ISSR menginisiasi bagian tertentu dari utas DNA di daerah dekat pengulangan mikrosatelit menggunakan primer berjangkar pada posisi 5' atau '3 diawal/akhir primer dengan 2 sampai 4 tambahan basa tidak berulang (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret sampai November 2013 di wilayah sekitar Tawangmangu, Karanganyar, Jateng, Laboratorium Balai Penelitian Buah Tropika, Bogor, dan UPBJJ-UT Semarang.

B. Bahan dan Alat

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah 8 asesi tanaman jeruk keprok Tawangmangu. Delapan tanaman ini dipilih dari 22 asesi yang ditemukan tersebar di rumah-rumah penduduk dengan berdasarkan penelusuran asal-usulnya. Delapan asesi ini merupakan indukan dari 22 asesi yang ditemukan. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah Buffer ekstraksi (2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH 8, 1,4M NaCl, 20mM EDTA), polivinilpolipirilidon (PVPP), merkaptoetanol, larutan kloroform : isoamilalkohol (24:1 = v/v), larutan fenol : kloroform : isoamilalkohol (25:24:1 = v/v), isopropanol, alkohol 70%, alkohol 96%, buffer TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5; 10mM EDTA), agarosa, etidium bromida, larutan Tris-Asetat EDTA (TAE) 1x, serta *master mix* yang terdiri atas buffer reaksi pH 8, 400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP, 3mM MgCl₂, H₂O 16,8 μ l, dan 0,2 μ l Taq DNA polimerase (Promega), serta primer ISSR.

Alat yang digunakan adalah tabung Ependorf, mikropipet, sentrifuse, alat elektroforesis, pHmeter, UV transluminator, penangas air/*waterbath*, mesin PCR *Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler*, kamera digital, timbangan digital, mortar, microwave, dan sebagainya.

C. Rancangan Penelitian

Data keragaman hasil elektroforesis pada ISSR berdasarkan penampilan pola pita DNA dianalisis menggunakan analisis gerombol (*cluster analysis*) dengan teknik berhierarki yang ada dalam program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* versi 2.10 (NTSYS) metode *Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering* (SAHN). Selanjutnya pengelompokan itu ditampilkan dalam bentuk dendrogram.

D. Prosedur Pengambilan Data

D.1. Isolasi DNA

DNA diisolasi dari bagian daun yang masih muda yang telah berkembang sempurna (nomor dua atau tiga dari pucuk). Sebanyak 0,50 g daun muda jeruk keprok Tawangmangu

dari masing-masing sampel dihaluskan dalam cawan porselin dengan menambahkan pasir kuarsa agar mudah digerus. Untuk mencegah pencoklatan jaringan akibat oksidasi, ke dalam cawan berisi sampel ditambahkan *polivinilpolipiridon* (PVPP) sebanyak 40 mg.

Sampel yang sudah menjadi larutan dimasukkan ke dalam tabung Ependorf volume 1,5 ml ditambah bufer ekstraksi (2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH 8, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA) yang telah ditambah 1% merkaptoetanol sesaat sebelum digunakan sebanyak 1 ml. Selanjutnya campuran diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dengan pembalikan setiap 10 menit agar proses ekstraksi berjalan dengan baik. Kemudian campuran ditambah 1 ml larutan kloroform : isoamilalkohol (24:1 = v/v), dibolak-balik dengan pelan hingga tercampur sempurna dan disentrifuse pada kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru dengan jalan memipetnya ke dalam tabung Ependorf.

Supernatan ditambah kembali dengan 1 ml larutan kloroform : isoamilalkohol (24:1 = v/v). Selanjutnya disentrifuse pada kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang dan kemudian supernatan dipisahkan untuk kemudian dicampur 1ml isopropanol dingin, dikocok perlahan sampai timbul benang-benang putih yang merupakan DNA. Selanjutnya DNA diinkubasi selama satu malam pada suhu 4°C di dalam lemari es.

Larutan berisi DNA disentrifuse dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang dan selanjutnya supernatan dibuang. Endapan yang merupakan DNA dicuci dengan alkohol 70% serta dikeringkan pada suhu ruangan selama sekitar 1 jam dengan cara membalik tabung Ependorf. Selanjutnya endapan DNA contoh yang diperoleh dilarutkan dalam 100 µl bufer TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5; 10mM EDTA).

DNA contoh kemudian ditambah 400µl TE dan dimurnikan kembali dengan menggunakan 400µl larutan phenol : kloroform : isoamilalkohol (25:24:1 = v/v). Larutan ini dicampur dengan cara membaliknyanya perlahan-lahan hingga tercampur merata, dan selanjutnya disentrifuse pada kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung dan ditambah 1ml isopropanol dingin, dikocok perlahan sampai timbul benang-benang putih yang merupakan DNA. Selanjutnya DNA diendapkan dengan diinkubasi selama 1 malam pada suhu 4°C di dalam lemari es. Larutan berisi DNA yang sudah dimurnikan disentrifuse dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang dan selanjutnya supernatan dibuang. Endapan yang merupakan DNA dicuci dengan alkohol 70% serta dikeringkan pada suhu ruangan.

Endapan DNA diresuspensi menggunakan 100 µl bufer TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5; 10mM EDTA) dan disimpan pada freezer dengan suhu 0°C.

D.2. Visualisasi Hasil Isolasi DNA dengan Elektroforesis

DNA hasil isolasi divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8%. Pembuatan gel agarosa dengan jalan melarutkan 0,32 g bubuk agarosa dalam 40 ml larutan Tris-asetat EDTA (TAE) 1x dan dipanaskan dalam microwave selama dua menit, kemudian dituang dalam cetakan elektroforesis yang telah disiapkan dan dibiarkan lebih kurang satu jam sampai agarosa padat. Gel diletakkan ke dalam bak elektroforesis yang telah berisi larutan TAE 1x sampai gel terendam. Selanjutnya sampel yang telah disiapkan dimasukkan dalam sumur gel dan dielektroforesis selama lebih kurang satu jam pada voltase 60V. Gel yang telah di *running* selanjutnya direndam dalam larutan EtBr 1%. Hasil elektroforesis diamati di bawah UV transiluminator dan diabadikan dengan kamera digital.

D.3. Analisis Polimorfisme DNA dengan ISSR

Untuk mendapatkan tingkat polimorfisme yang tinggi dari sampel yang diamati, dilakukan seleksi terhadap primer acak. Penetapan primer hasil seleksi untuk pengujian tingkat polimorfisme jeruk keprok Tawangmangu adalah berdasarkan jumlah pita DNA contoh yang dihasilkan tegas dan terbanyak serta menunjukkan polimorfisme.

Proses PCR menggunakan campuran sebanyak 1 µl genomik DNA, 0,5 µl primer, 6 µl PCR mix, dan 5 µl air bebas ion dengan volume total reaksi 12,5 µl. Pencampuran larutan dilakukan dengan mengetuk ujung tabung pelan-pelan hingga homogen pada kondisi dingin (di atas es). Proses PCR dilakukan menggunakan alat *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* dengan tahapan program sebagai berikut: denaturasi awal pada kondisi 94°C selama 4 menit, dilanjutkan dengan 35 putaran yang terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 30 detik, amplifikasi 51°C selama 30 detik, dan pemanjangan 72°C selama 1 menit. Setelah selesai 35 putaran selanjutnya diakhiri dengan *final extension* pada 72°C selama 5 menit.

Hasil amplifikasi DNA contoh dipisahkan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1,2%. Elektroforesis menggunakan bufer TAE 1x pada kondisi voltase tetap 60 volt selama lebih kurang satu jam. Hasil elektroforesis direndam dalam EtBr 1%, diamati di atas lampu UV transiluminator dan didokumentasikan dengan kamera digital.

E. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil elektroforesis pada ISSR berdasarkan penampilan pola pita DNA dianalisis menggunakan analisis gerombol (*cluster analysis*) dengan teknik berhierarki yang ada dalam program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* versi 2.10 (NTSYS) metode *Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering* (SAHN). Selanjutnya pengelompokan itu ditampilkan dalam bentuk dendrogram.

Ukuran derajat jarak kemiripan genetik tanaman jeruk keprok Tawangmangu yang diamati berdasarkan koefisien kemiripan (*similarity coefficient*) atau jarak genetik (*genetic distance*) dengan menggunakan metode *Group Average Clustering* yang ada dalam program NTSYS dipilih metode *Unweight Pair Group Method Arithmetic* (UPGMA) dengan rumus sebagai berikut :

$$d_{(ij)k} = \frac{n_{ij} \cdot n_k}{n_{(ij)} + n_k} \sum_{s \in (ij)} \sum_{t \in k} d_{st}$$

Keterangan :

$d_{(ij)k}$ = ukuran ketidakmiripan antara gerombol ke-k dengan gerombol ij yang merupakan penggabungan ke-i dan ke-j

d_{st} = ukuran ketidakmiripan antara gerombol ke-s dalam gerombol ij dan gerombol ke-t dalam gerombol k

$n_{(ij)}$ = jumlah anggota i dalam gerombol ij

n_k = jumlah anggota gerombol k

Fragmen yang dihasilkan pada analisis ISSR yang tampak sebagai pita-pita DNA diterjemahkan menjadi data biner berdasarkan ada atau tidaknya pita yang dimiliki secara bersama oleh individu tanaman yang dianalisis. Pita DNA memiliki ukuran pasangan basa (bp) tertentu. Setiap pita dianggap sebagai satu lokus sehingga pita yang sama dari contoh tanaman diinterpretasikan sebagai satu lokus yang homolog. Lokus tersebut diubah ke dalam bentuk data biner dengan memberi nilai satu (1) untuk yang memiliki pita dan nilai nol (0) untuk yang tidak memiliki pita.

Estimasi kemiripan genetik diperoleh berdasarkan jumlah pita yang dimiliki bersama. Pengelompokan data matriks dan pembuatan dendogram dilakukan dengan metode UPGMA, fungsi *Similarity Qualitative (SIMQUAL)* pada program NTSYS versi 2.10. Tingkat kepercayaan dari dendogram berdasar UPGMA ditentukan melalui analisis *bootstrap* menggunakan program *Winboot* dengan pengulangan. Data matriks kemiripan genetik dihitung dengan rumus dari koefisien Dice (S) yaitu:

$$S = 2n_{ab} / (n_a + n_b)$$

Keterangan:

S = Koefisien kemiripan; a dan b = individu tanaman; n_{ab} = jumlah pita yang posisinya sama;

n_a = jumlah pita individu tanaman a; n_b = jumlah pita individu tanaman b.

Analisis *bootstrap* dengan ulangan 2000 kali dilakukan untuk meningkatkan akurasi hasil. Angka-angka pada garpu dendogram hasil analisis *bootstrap* pada dasarnya menunjukkan tingkat kepercayaan pengelompokan dendrogram berdasarkan koefisien kemiripan genetik.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

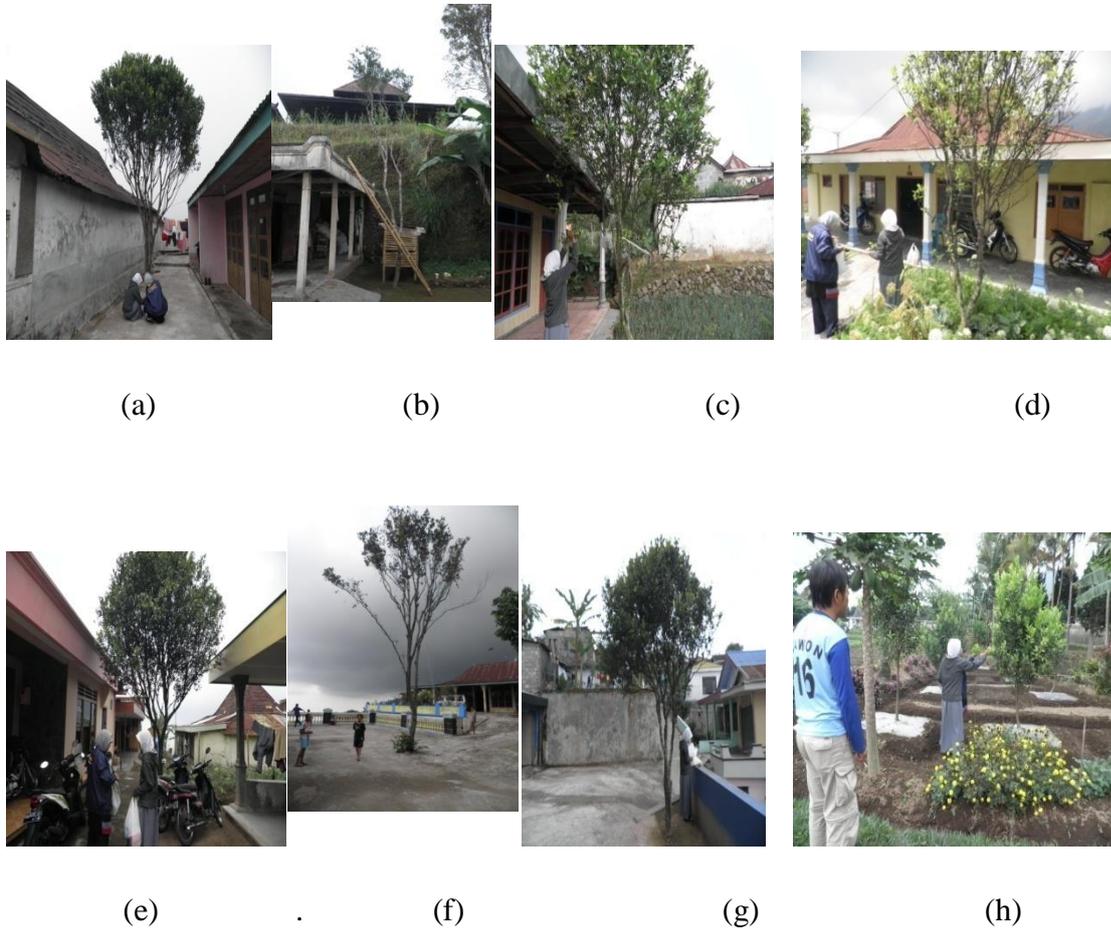
Penelitian ini menggunakan delapan buah asesi tanaman jeruk keprok Tawangmangu. Tujuh asesi induk jeruk keprok Tawangmangu berasal dari berbagai lokasi di wilayah Kecamatan Tawangmangu antara lain berasal dari daerah Desa Ngargoyoso, Desa Blumbang, dan Desa Gondosuli yang merupakan tanaman lama asli dari Tawangmangu.

Sedangkan satu asesi berasal dari Dinas Pertanian (Deptan) yang induknya merupakan tanaman jeruk keprok Tawangmangu koleksi dari Balitjestro, Malang. Asesi-asesi ini dipilih untuk dapat mengetahui keragaman pada tanaman jeruk keprok Tawangmangu. Asesi-asesi tersebut yaitu :

1. Asesi TG10 = Jeruk keprok Tawangmangu dari Gondosuli Asesi ke 10
2. Asesi TN4 = Jeruk keprok Tawangmangu dari Ngargoyoso Asesi ke 4
3. Asesi TB19 = Jeruk keprok Tawangmangu dari Blumbang Asesi ke 19
4. Asesi TB6 = Jeruk keprok Tawangmangu dari Blumbang Asesi ke 6
5. Asesi TB21 = Jeruk keprok Tawangmangu dari Blumbang Asesi ke 21
6. Asesi TB18 = Jeruk keprok Tawangmangu dari Blumbang Asesi ke 18
7. Asesi TB27 = Jeruk keprok Tawangmangu dari Blumbang Asesi ke 27
8. Asesi D = Jeruk keprok Tawangmangu dari Deptan

Asesi-asesi tersebut dipilih dari beberapa asesi yang ditemukan pada penelitian Nuryandani (2012). Asesi-asesi ini dipilih dengan pertimbangan bahwa asesi-asesi tersebut di atas sebagian besar merupakan induk dari asesi-asesi yang lain sehingga cukup untuk dapat mewakili asesi yang lain. Dengan asumsi tanaman yang berasal dari induk yang sama akan memiliki DNA yang sama karena diperbanyak melalui perbanyakan vegetatif (cangkok).

Berikut ini merupakan penampakan morfologi asesi-asesi pohon jeruk keprok Tawangmangu yang digunakan dalam penelitian ini.



Gambar 1. Penampakan morfologi pohon jeruk keprok Tawangmangu (a) Asesi TG10, (b) Asesi TN4, (c) Asesi TB19, (d) Asesi TB6, (e) Asesi TB21, (f) Asesi TB18, (g) Asesi TB27, dan (h) Asesi D.

Dari asesi-asesi yang dipilih tersebut, diambil sampel daun yang akan dianalisis DNAnya menggunakan analisis ISSR. Penampakan daun yang dianalisis dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2 berikut.



(a) TG10

(b) TN4

(c) TB21



(d) TB6

(e) TB19

(f) TB18



(g) TB27

(h) Deptan

Gambar 2. Penampakan daun pohon jeruk keprok Tawangmangu yang dianalisis (a) Asesi TG10, (b) Asesi TN4, (c) Asesi TB19, (d) Asesi TB6, (e) Asesi TB21, (f) Asesi TB18, (g) Asesi TB27, dan (h) Asesi D.

Daun jeruk keprok Tawangmangu dari sampel yang dipilih diisolasi DNANYa menggunakan metode Doyle and Doyle (1987) yang dimodifikasi dan divisualisasi melalui elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8 %. Proses isolasi DNA yang berhasil akan memperlihatkan pita DNA pada sampel DNA dari daun yang telah diisolasi. DNA λ (yang merupakan contoh DNA murni) digunakan sebagai pembanding untuk memperlihatkan adanya DNA hasil isolasi dalam proses visualisasi ini. Hasil visualisasi diperlihatkan pada Gambar 3 berikut.



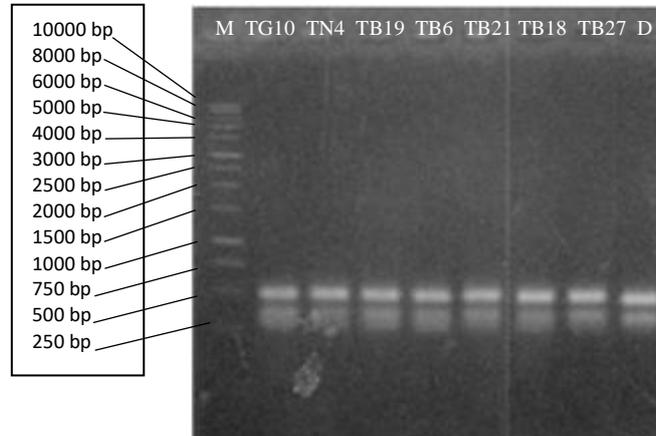
Gambar 3. Visualisasi DNA hasil isolasi menggunakan elektroforesis pada agarosa 0,8 %.

Hasil visualisasi DNA di atas menunjukkan bahwa proses isolasi DNA delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu telah menghasilkan DNA yang diharapkan dengan terlihatnya pita-pita terang DNA. Pita terang DNA yang merupakan DNA genom dari tanaman jeruk keprok Tawangmangu.

Selain pita terang DNA, juga terlihat *smear* atau potongan-potongan DNA yang tidak membentuk pita. *Smear* yang terbentuk kuantitasnya berbeda dari satu asesi dengan asesi lainnya. Menurut Herison (2003), pita *smear* merupakan molekul dengan bobot yang bervariasi yang dapat berasal dari DNA yang terdegradasi ataupun materi ikutan lain yang tidak diketahui. Kerusakan DNA genom dapat terjadi karena adanya degradasi akibat senyawa sekunder yang dilepaskan ketika sel dihancurkan maupun kerusakan akibat penanganan fisik (Milligan, 1992).

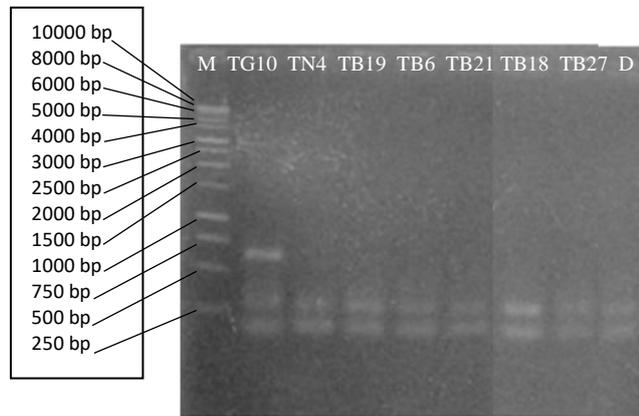
DNA genom hasil isolasi DNA ini selanjutnya melalui proses PCR (*Polimerase Chain Reaction*) menggunakan lima buah Primer untuk analisis ISSR yaitu Primer PKBT 2, Primer PKBT 3, Primer PKBT 6, Primer PKBT 8, dan Primer PKBT 9. Primer-primer ini akan mengamplifikasi DNA genom pada beberapa situs spesifik sehingga akan menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang memiliki besaran yang beragam.

Fragmen-fragmen ini akan dapat terlihat setelah divisualisasi melalui elektroforesis dengan agarosa 1,2%. Hasil PCR menggunakan primer-primer ISSR ini diperlihatkan pada Gambar 4, 5, 6, 7, dan Gambar 8 berikut ini.



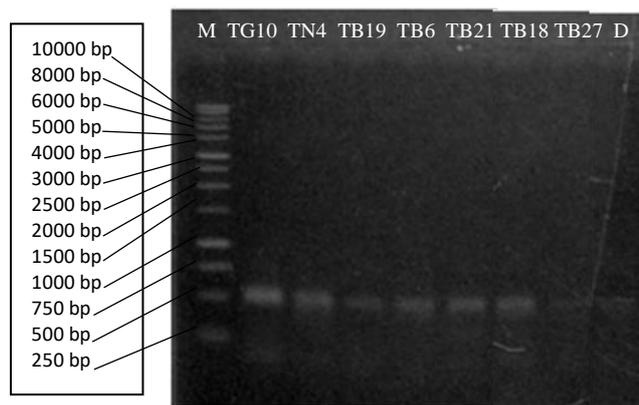
Gambar 4. Hasil PCR DNA genom delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu menggunakan Primer PKBT 2

Primer PKBT 2 memiliki urutan basa DNA 5'- ACACACACACACAC TT -3'. Hasil PCR menggunakan Primer PKBT 2 menghasilkan tiga pita monomorfik pada kedelapan asesi yang dinalisis. Ketiga pita monomorfik yang dihasilkan memiliki besaran fragmen antara 250 bp, 400 bp, dan 500 bp.



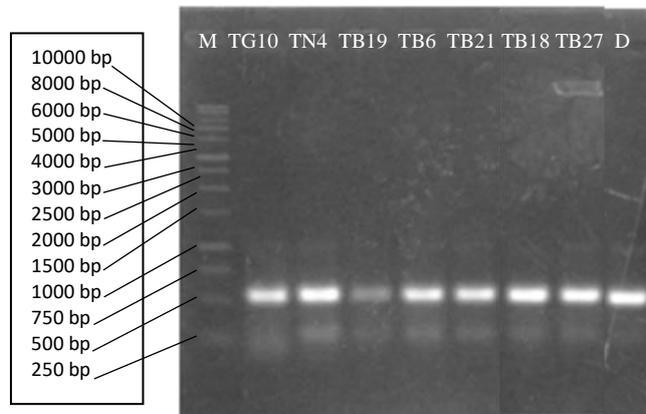
Gambar 5. Hasil PCR DNA genom delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu menggunakan Primer PKBT 3.

Primer PKBT 3 memiliki urutan basa DNA 5'- AGAGAGAGAGAGAGAG T -3'. Hasil PCR menggunakan Primer PKBT 3 menghasilkan tiga pita pada kedelapan asesi yang dianalisis. Dua pita monomorfik pada kisaran 200 bp dan 300 bp, serta satu buah pita polimorfik yang hanya dimiliki oleh asesi TG10.



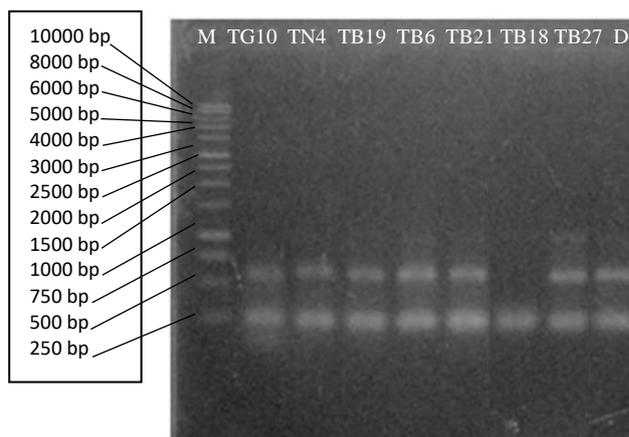
Gambar 6. Hasil PCR DNA genom delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu menggunakan Primer PKBT 6.

Primer PKBT 6 memiliki urutan basa DNA 5'- AGAGAGAGAGAGAGAG TT -3'. Hasil PCR menggunakan Primer PKBT 6 menghasilkan satu buah pita monomorfik pada kedelapan asesi yang dianalisis. Pita tersebut berada pada kisaran 500 bp.



Gambar 7. Hasil PCR DNA genom delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu menggunakan Primer PKBT 8.

Primer PKBT 8 memiliki urutan basa DNA 5'- GAGAGAGAGAGAGAGAGA C -3'. Hasil PCR menggunakan Primer PKBT 8 menghasilkan empat buah pita pada kedelapan asesi yang dianalisis. Tiga buah pita merupakan pita monomorfik yang berada pada kisaran 250 bp, 500 bp, dan 1000 bp. Sedangkan satu buah pita merupakan pita polimorfik pada asesi TG10 dengan ukuran fragmen sekitar 200 bp.

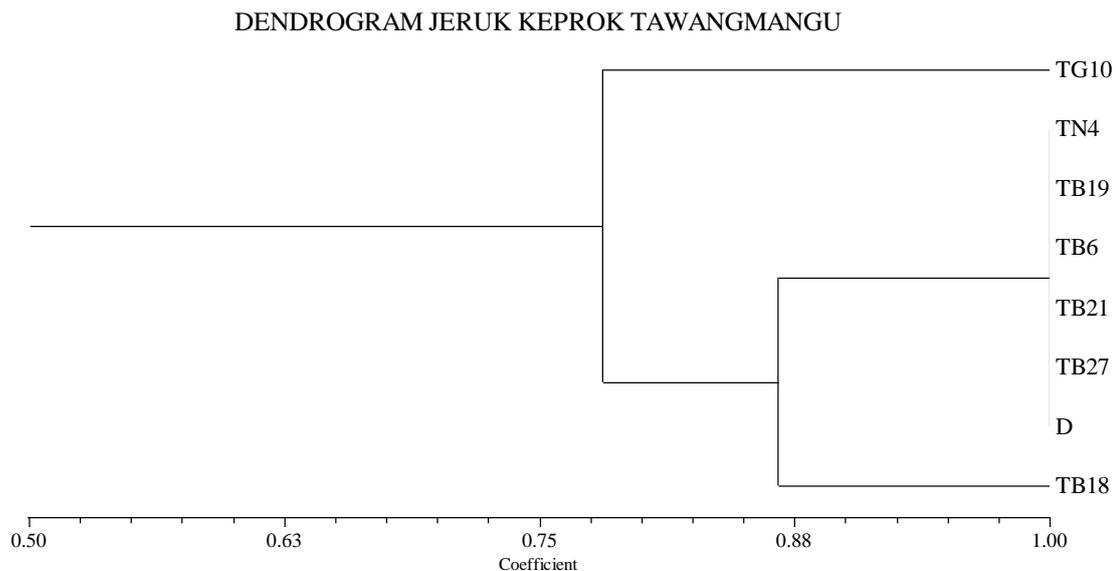


Gambar 8. Hasil PCR DNA genom delapan asesi jeruk keprok Tawangmangu menggunakan Primer PKBT 9.

Primer PKBT 9 memiliki urutan basa DNA 5'- GAGAGAGAGAGAGAGAGA T -3'. Hasil PCR menggunakan Primer PKBT 9 menghasilkan empat buah pita pada kedelapan asesi

yang dianalisis. Tiga buah pita merupakan pita polimorfik yang berada pada kisaran 200 bp, 600 bp, dan 1000 bp. Sedangkan satu buah pita merupakan pita monomorfik dengan ukuran fragmen sekitar 250 bp. Jumlah pita polimorfik dan monomorfik secara keseluruhan dapat dilihat pada Lampiran 1.

Pita-pita ini kemudian dianalisis untuk mengetahui bagaimana jarak kekerabatan antar asesi dan hasilnya disajikan dalam bentuk Dendrogram (Gambar 9).



Gambar 9. Dendrogram delapan buah asesi jeruk keprok Tawangmangu

Dari dendrogram ini dapat dilihat bahwa delapan asesi yang digunakan dalam analisis ini memiliki kemiripan yang tinggi, yaitu sekitar 80%.

Asesi TG10 memiliki kekerabatan yang paling jauh dari ketujuh asesi yang lain, yaitu terpisah koefisien kemiripan sekitar 80%, sedangkan Asesi TB18 terpisah dengan Asesi yang lain pada koefisien kemiripan sekitar 86%. Menurut Cahyarini *et al.* (2004) jarak kemiripan 0,75 atau 75% merupakan jarak kemiripan yang dekat atau tinggi. Artinya bila suatu kelompok asesi yang terpisah pada jarak kemiripan 0,75 atau lebih, maka dapat dikatakan bahwa asesi-asesi tersebut memiliki kemiripan yang tinggi atau keragaman yang rendah.

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Amplifikasi DNA terhadap 8 asesi jeruk keprok Tawangmangu dengan menggunakan primer PKBT-2, PKBT-3 PKBT-6, PKBT-8, dan PKBT-9 menghasilkan 1 hingga 4 lokus DNA berukuran sekitar 200 bp hingga 1000 bp
2. Hasil dendrogram menunjukkan bahwa 8 asesi yang digunakan dalam analisis ISSR memiliki kemiripan yang tinggi, yaitu sekitar 80%. Asesi TG10 memiliki kekerabatan yang paling jauh dari ketujuh asesi yang lain, yaitu terpisah koefisien kemiripan sekitar 80%, sedangkan Asesi TB18 terpisah dengan asesi yang lain pada koefisien kemiripan sekitar 86%. Data genetik ini dapat digunakan sebagai acuan pada program pemuliaaan tanaman selanjutnya.

B. SARAN

Agar dapat memberikan gambaran yang lebih baik akan keragaman pada tanaman jeruk keprok Tawangmangu, penelitian selanjutnya hendaknya menambah jumlah asesi yang digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriyana, Y., Haryono, dan Suciantini. (2009). Analisis Peubah Iklim dan Tanah Sebagai Faktor Penentu Mutu Internal Jeruk Keprok Tawangmangu. *J. Tanah dan Iklim* no 29.
- Azrai, M. (2005). Pemanfaatan Markah Molekuler dalam Proses seleksi Pemuliaan Tanaman. *J. Agrobiogen* 1(1) : 26-37.
- Balitbang Pertanian. (2005). *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Jeruk*. Jakarta: Departemen Pertanian.
- Cahyarini, R.D., Yunus, A., dan Purwanto, E. 2004. Identifikasi Keragaman Genetik Beberapa Varietas Lokal Kedelai di Jawa Berdasarkan Analisis Isozim. *Agrosains* 6 (2): 79-83.
- Camacho F.J. and A. Liston, 2001. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicula* (Ophioglossaceae) based on Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). *American Journal of Botany* 88 (6) : 1065 – 1070.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19 : 11-15.
- Endarto, O. Supriyanto, A.; Wuryantini, S.; Triwiratno, A. (2006). Evaluasi Penerapan Pengelolaan Terpadu Kebun Jeruk Sehat (PTKJS) Pada Daerah Endemis CVPD. *Prosiding Seminar Nasional Jeruk Tropika Indonesia Batu*, 28 - 29 Juli 2005 : 277 -295.
- Ernawati, R. (2007). Jeruk Keprok Tawangmangu, Dulu, Kini, dan Esok. <http://www.solopos.net/index.detail.asp?id=23817>. Diakses tanggal 12 Desember 2010.
- Giyanti, N. (2001). Inventarisasi dan Identifikasi Jeruk Keprok (*Citrus reticulata* Blanco) Asli Tawangmangu di Kecamatan Tawangmangu. [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret.
- Hardiyanto. (2012). Mampukah Jeruk Keprok Nasional Kita Menggeser Jeruk Impor? dari <http://balitjestro.litbang.deptan.go.id/id/476.html>. Diakses tanggal 14 Maret 2012.
- Hardiyanto, E. Mujiarto, & E.S.Sulasmi. (2007). Kekerabatan Genetik Beberapa Spesies Jeruk Berdasarkan Taksonometri. *J. Hortikultura* 17 (3): 203-216.

- Herison, C., Rustikawati, dan Eliyanti. 2003. Penentuan Protokol yang Tepat untuk Menyiapkan DNA Genom Cabai (*Capsicum sp.*). *J. Akta Agrosia* 6 (2) : 38 - 43.
- Hermawan, A., Juanda, D., & Samijan. (2002). Pola penataan pertanaman jeruk berwawasan usaha tani konservasi di lahan kering. Prosiding Seminar Nasional Membangun Sistem Produksi Tanaman Pangan Berwawasan Lingkungan. Pati, 7 November 2000. Soejitno, J; Sasa, I.J. ; Hermanto (eds). Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Hamrick, J.L. and M.J.W. Gode. 1989. Allozyme diversity in plants. In Brown, A.H.D., M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir (Eds.). *Plant Population Genetics. Breeding and Genetic Resources*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. p.318-370.
- Hunter, R.L. and C.L. Markert. 1957. Hits a chemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125:1294-1295.
- Menteri Pertanian Republik Indonesia. (2003). Keputusan Menteri Pertanian Nomor 456/Kpts/PD.210/9/2003 tanggal 15 September 2003 tentang Pelepasan Jeruk Keprok Tawangmangu sebagai Varietas Unggul.
- Milligan, B.G. 1992. Plant DNA isolation. pp59-88. In A.R. Hoelzel (Ed). *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical approach*. Oxford univ. Press. New York.
- Mondal, T.K., 2002. Assessment of genetic diversity of tea (*Camelia sinensis(L.) O. Kuntze*) by intersequence repeat polymerase reaction. *Euphytica* 128:307-315.
- Nakashima, K., M. Promintara, Y. Ohtsu, T. Kano, J.Imada dan M.Koizumi. (1996). Detection of 16S rRNA of Thai isolates of bacterium like organism associated with greening disease of citrus. *JIRCAS J.3*: 1-8.
- Nei, M. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of National Academic of Science, USA*. 76: 5269-5273
- Nuryandani, E. (2012). Persebaran Dan Karakterisasi Induk Jeruk Keprok Tawangmangu Asli (*Citrus reticulata* Blanco ssp Tawangmangu). *J. Matematika, Sains, dan Teknologi* 13 (1): 33-42.
- Sarwono, B. 1993. *Jeruk dan Kerabatnya*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Shanti, S. I. (2007). Analisis keputusan konsumen dalam mengkonsumsi jeruk lokal dan jeruk impor di ritel modern (Kasus Konsumen Giant Botani Square Bogor). [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Smith, J.S.C. and O.S. Smith. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Adv. Agron.* 47:85-129.

- Sutopo.(2011).PanduanBudidayaTanamanJeruk.Artikel.
www.balitjestro.litbang.deptan.go.id/id/234.html. Diakses tanggal 11 Desember 2011.
- Utama, D.S. (2002). Pengaruh Pemberian Ekstrak Tauge dan Air Kelapa terhadap Multiplikasi Jeruk Keprok Tawangmangu [Skripsi]. Surakarta : Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret.
- Van Steenis, C.G., (1975). *Flora Voor de Scholen in Indonesie*, diterjemahkan oleh Sorjowinoto, M., edisi VI, Jakarta: PT. Pradnya Paramitha.
- Verheij, E. W. dan R. E. Coronel. (1997). *Prosea Sumber Daya Nabati Asia Tenggara 2: Buah-buahan yang Dapat Dimakan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Wahyuni S., D. H. Xu, N. Bermawie1, H. Tsunematsu, dan T. Ban. 2004. Skrining ISSR primer studi pendahuluan kekerabatan antar jahe merah, jahe emprit dan jahe besar. *Buletin TRO* 15 (1): 33-42.
- Wahyuningsih, E. (2009). CVPD Pada Jeruk (*Citrus* spp.) dan Upaya Pengendaliannya. *Vis Vitalis*: 65-73.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda, 1994. Genome finger printing by Simple Sequence Repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20 : 176 – 183.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data biner 8 asesi jeruk keprok Tawangmangu yang diamplifikasi menggunakan Primer PKBT 2, PKBT 3, PKBT 6, PKBT 8 dan PKBT 9

Asesi	Primer PKBT 2			Primer PKBT 3			Primer PKBT 6		Primer PKBT 8				Primer PKBT 9			
	<u>2.1</u>	<u>2.2</u>	<u>2.3</u>	<u>3.1</u>	<u>3.2</u>	<u>3.3</u>	<u>6.1</u>		<u>8.1</u>	<u>8.2</u>	<u>8.3</u>	<u>8.4</u>	<u>9.1</u>	<u>9.2</u>	<u>9.3</u>	<u>9.4</u>
TG10	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
TN4	1	1	1	1	1	0	1		0	1	1	1	0	1	1	1
TB19	1	1	1	1	1	0	1		0	1	1	1	0	1	1	1
TB6	1	1	1	1	1	0	1		0	1	1	1	0	1	1	1
TB21	1	1	1	1	1	0	1		0	1	1	1	0	1	1	1
TB18	1	1	1	1	1	0	1		0	1	1	1	0	1	0	0
TB27	1	1	1	1	1	0	1		0	1	1	1	0	1	1	1
D	1	1	1	1	1	0	1		0	1	1	1	0	1	1	1

