

Keragaman Jeruk Fungsional Indonesia Berdasarkan Karakter Morfologis dan Marka RAPD (Variability of Indonesian Functional Citrus Based on Morphological Characters and RAPD Markers)

Farida Yulianti*, Norry E. Palupi, dan Dita Agisimanto

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No. 1 Junrejo, Kota Batu 65327 Jawa Timur, Indonesia
Telp. (0341) 592683; Faks. (0341) 593047; *E-mail: adiraf212@gmail.com

Diajukan: 18 Juli 2016; Direvisi: 2 September 2016; Diterima: 10 November 2016

ABSTRACT

Identification of citrus genetic variability is prerequisite for effective genetic resources management and selection process in breeding program. The objective of the research was to study fifteen accessions of Indonesian functional citrus based on morphological characters and molecular marker. The research was conducted in Plant Breeding Laboratory, Indonesian Citrus and Subtropical Fruits Reserach Institute, Malang, West Java. The morphological variability was based on observation of morphological characters, while molecular variability was based on amplification of RAPD markers. Morphology and molecular diversities were analyzed by DARWin5 program. The results showed that morphological diversity is higher than molecular diversity. The highest morphology diversity occurred between Citrumelo and Carrizo Citrange with seedless Lemon (79%), while the highest molecular diversity occurred between Lemo Swangi with seedless Lemon (49%). The specific bands were found on Jari Budha, Etrog Citron, and seedless Lemon accessions using RAPD marker OPH15_(235,280), on accession with trifoliolate leaf (Troyer Citrange, Citrumelo, and Carrizo Citrange) using OPD07₍₄₀₀₎ and OPC17₍₄₁₆₎ and on Keprok Tening using OPH04₍₅₈₃₎ and OPD07₍₃₃₀₎.

Keywords: Morphology diversity, molecular diversity, functional citrus, RAPD.

ABSTRAK

Identifikasi variabilitas genetik tanaman jeruk diperlukan dalam pengelolaan sumber daya genetik dan proses seleksi dalam program pemuliaan. Tujuan penelitian adalah mempelajari keragaman lima belas aksesori jeruk fungsional Indonesia berdasarkan karakter morfologis dan marka molekuler. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pemuliaan Tanaman, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Malang, Jawa Timur. Keragaman morfologis didasarkan pada hasil pengamatan morfologi, sedangkan keragaman molekuler didasarkan pada hasil amplifikasi marka RAPD. Keragaman morfologis dan molekuler dianalisis menggunakan program *DARWin5*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keragaman morfologis jeruk fungsional Indonesia lebih tinggi dibanding dengan keragaman molekulernya. Keragaman tertinggi berdasarkan karakter morfologis terjadi antara Citrumelo dan Carrizo Citrange dengan Lemon *seedless* (79%), sedangkan keragaman tertinggi berdasarkan marka RAPD terjadi antara Lemo Swangi dan Lemon *seedless* (49%). Pita DNA spesifik ditemukan oleh marka OPH15_(235,280) pada aksesori Jari Budha, Etrog Citron, dan Lemon *seedless*, marka OPD07₍₄₀₀₎ dan OPC17₍₄₁₆₎ pada aksesori dengan daun tipe trifoliolata (Troyer Citrange, Citrumelo, dan Carrizo Citrange) dan OPH04₍₅₈₃₎ dan OPD07₍₃₃₀₎ pada aksesori Keprok Tening.

Kata kunci: Keragaman morfologis, keragaman molekuler, jeruk fungsional, RAPD.

PENDAHULUAN

Jeruk (*Citrus* sp.) merupakan salah satu sumber daya genetik (SDG) yang memiliki keragaman tinggi. Sebanyak 213 aksesori jeruk telah dikoleksi secara *ex situ* di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro), Malang yang 130 di antaranya merupakan hasil eksplorasi dari sejumlah daerah di Indonesia. Beberapa spesies dan varietas jeruk dikelompokkan ke dalam tiga golongan, yakni (i) jeruk untuk konsumsi segar karena kandungan mineral dan vitamin di dalam cita rasa yang kuat, (ii) jeruk untuk bahan makanan olahan, dan (iii) jeruk untuk bahan baku farmasi atau kosmetik, ornamental, dan agrokimia karena kandungan metabolit sekundernya yang tinggi. Golongan jeruk ketiga ini dinamakan jeruk fungsional karena mengandung komponen aktif yang secara fisiologis memiliki nilai kesehatan di samping mengandung mineral dan vitamin (Hasler, 2002; ILSI, 1999).

Jeruk fungsional Indonesia umumnya merupakan tanaman jeruk yang digunakan sebagai obat tradisional, seperti Monte Hondu M, Monte Hondu B, Lemo Swangi, Ganesha Aceh, Keprok Tening, Keprok Akyar, dan Lemon, dan sebagai bumbu masakan, seperti Puri Agrihorti (purut) dan Sari Agrihorti (sambal). Japansche Citroen pada umumnya hanya digunakan sebagai batang bawah karena memiliki keunggulan kompatibilitas yang tinggi. Di samping itu, turunan *Poncirus trifoliata* (Citrumello, Troyer Citrange, dan Carrizo Citrange) bersifat tahan terhadap cekaman biotik dan abiotik. Jeruk Japansche Citroen termasuk jeruk fungsional karena mengandung senyawa limonin dan naringin berturut-turut sebesar 250,98 $\mu\text{g/g}$ dan 46,17 $\mu\text{g/g}$ daun kering (Agisimanto *et al.*, 2015). Sebagai turunan *P. trifoliata*, ketiga jeruk tersebut mengandung senyawa poncirin yang berfungsi sebagai antibakteri dan antiinflamasi (Yoon *et al.*, 2011).

Jeruk fungsional tersebar di seluruh wilayah Indonesia dengan penamaan mengikuti kesepakatan lokal. Berbagai varietas memiliki nama berbeda, namun memiliki ciri morfologis yang sama. Untuk keperluan konservasi dan pengembangan varietas, identitas varietas yang akurat menjadi penting. Berbagai metode karakterisasi jeruk telah banyak dikembangkan, yaitu berdasarkan karakter morfologis (Koehler-Santos *et al.*, 2003; Penjor *et al.*, 2014), biokimia (Gorinstein *et al.*, 2001; Yuan-Chuen *et al.*, 2007), dan genetik (Amar *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2011; Malik *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2008).

Klasifikasi jeruk yang hanya didasarkan pada karakter morfologis untuk mendukung program pe-

muliaan bukan merupakan pilihan tepat. Hal ini disebabkan oleh tingginya kompatibilitas dalam persilangan, frekuensi mutasi, heterozigositas, dan poliembrioni (Moore, 2001). Di samping itu, dalam proses karakterisasi kemiripan morfologi dibutuhkan waktu yang lama (Ruiz *et al.*, 2000). Pengembangan marka DNA berbasis *polymerase chain reaction* (PCR) memberikan alternatif pendekatan dalam proses identifikasi genotipe dan studi polimorfisme antarspesies dalam satu populasi tanaman (Baig *et al.*, 2009; Hussein *et al.*, 2004).

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) merupakan marka DNA berbasis PCR yang memiliki sejarah panjang dalam kegiatan studi genetik. Pemanfaatannya dalam proses identifikasi tanaman didasarkan pada keunggulannya, yaitu mudah, cepat, sensitif, tidak membutuhkan informasi sekuen DNA, membutuhkan oligonukleotida yang pendek (biasanya 10-mer), dan menghasilkan fragmen DNA dalam jumlah besar (Weising *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 1990). Pada jeruk, pemanfaatan RAPD telah banyak dilakukan, di antaranya untuk menganalisis keragaman genetik jeruk keprok (*C. reticulata*) (Coletta-Filho *et al.*, 1998), pamelon (*C. maxima*), dan grapefruit (*C. paradisi*) (Corazza-Nunes *et al.*, 2002), *C. media*, *C. limomedica*, dan *C. limon* (Pessina *et al.*, 2011), beberapa jeruk batang bawah dan batang atas (Baig *et al.*, 2009; Hussein *et al.*, 2004), dan *C. limon* (Siragusa *et al.*, 2008). Pita spesifik yang dihasilkan dari proses amplifikasi marka RAPD dapat digunakan untuk pengembangan marka molekuler lain yang digunakan untuk analisis sidik jari DNA SDG jeruk di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari keragaman lima belas aksesori jeruk fungsional Indonesia berdasarkan karakter morfologis dan marka molekuler

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pemuliaan Tanaman, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro), Malang, Jawa Timur. Sebanyak lima belas aksesori jeruk fungsional (Tabel 1) koleksi *ex situ* SDG jeruk yang dipelihara di Kebun Percobaan Puntun digunakan sebagai materi genetik penelitian. Untuk menganalisis kelima belas aksesori jeruk fungsional, digunakan empat marka RAPD (Tabel 2).

Karakterisasi Morfologis

Karakter morfologis yang diamati dalam penelitian ini adalah bentuk tajuk, warna daun, bentuk daun, bentuk helai daun, bentuk sayap daun, warna bunga

kuncup, warna bunga mekar, bentuk buah, warna kulit buah, tekstur daging buah, warna daging buah, dan rasa daging buah. Karakterisasi mengacu pada panduan karakterisasi jeruk yang dikeluarkan oleh IPGRI (1999).

Keragaman Molekuler Menggunakan Marka RAPD

Isolasi DNA dan PCR

Isolasi DNA mengikuti prosedur CTAB (Doyle dan Doyle, 1990). Kualitas DNA dicek dengan metode elektroforesis.

Amplifikasi DNA menggunakan marka RAPD (Tabel 2) dengan mesin PCR *Thermocycler* (Biometra). Tahapan PCR, yaitu satu siklus denaturasi (93°C; 2 menit), diikuti dengan 42 siklus yang terdiri atas denaturasi (92°C; 1 menit), penempelan (39°C; 1 menit), dan ekstensi (72°C; 1 menit). Siklus PCR diakhiri dengan satu siklus ekstensi akhir (72°C; 10 menit). Pemilihan marka RAPD dalam penelitian ini didasarkan pada hasil penelitian bahwa marka-marka tersebut memiliki polimorfisme yang cukup tinggi dan mampu membedakan antarvarietas jeruk (Coletta-Filho *et al.*, 1998; Ling *et al.*, 2000; Mestre *et al.*, 1997).

Campuran PCR (15 µl) berisi 100 ng genomik DNA, dNTP 0,2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), marka RAPD 10 pmol (Tabel 2), 1 unit Taq DNA polimerase dalam larutan bufer 1× dan MgCl₂ 2 mM. Pemisahan pita DNA dilakukan dengan metode elektroforesis pada gel agarosa 2,5% (Vivantis;

PC0701) mengandung etidium bromida (10 mg/l) dalam larutan TBE 0,5× selama 60 menit pada kekuatan arus 100 volt. Deteksi pita DNA dilakukan dengan sistem biodokumentasi menggunakan *Bio Doc Analyzer* (Biometra).

Analisis data

Data morfologi dan genotipe dianalisis dengan program *Dissimilarity Analysis Representation for Windows* (DARWin5). *Polymorphic index content* (PIC) dihitung berdasarkan rumus:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2$$

dengan P_i adalah frekuensi alel ke- i dan k adalah jumlah alel (Weising *et al.*, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman Morfologis Jeruk Fungsional Indonesia

Hasil pengamatan karakter morfologis jeruk fungsional Indonesia disajikan pada Tabel 3. Berdasarkan karakter morfologisnya, keragaman tertinggi terjadi pada karakter daun, bunga, dan buah, sedangkan karakter tajuk rendah keragamannya. Dendrogram yang dibangun berdasarkan karakter morfologis disajikan dalam Gambar 1. Berdasarkan dendrogram yang dihasilkan, diperoleh empat kelompok besar, yaitu kelompok satu yang terdiri atas Jari Budha, Etrog Citron, Lemon *seedless*, Lemo Swangi,

Tabel 1. Aksesori jeruk fungsional Indonesia yang digunakan dalam penelitian.

Nama aksesori	Asal daerah	Nama Latin	Kegunaan
Monte Hondu M	Sulawesi Selatan	-	Obat
Monte Hondu B	Sulawesi Selatan	-	Obat
Japansche Citroen	Introduksi	<i>Citrus × limonia</i> Osbeck	Batang bawah
Lemo Swangi	Maluku	-	Obat
Ganesha Aceh	Aceh	-	Obat
Puri Agrihorti (purut)	Tersebar di seluruh wilayah Indonesia	<i>Citrus × hystrix</i> DC	Bumbu masakan
Sari Agrihorti (sambal)	Tersebar di seluruh wilayah Indonesia	<i>C. amblycarpa</i>	Bumbu masakan
Keprak Tening	Kalimantan Barat	-	Obat
Citrumelo	Introduksi	<i>C. paradisi</i> Macf. cv. Duncan × <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Batang bawah
Carrizo Citrange	Introduksi	<i>C. sinensis</i> cv. Washington × <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	Batang bawah
Etrog Citron	Introduksi	<i>C. medica</i>	Belum dimanfaatkan
Lemon <i>seedless</i>	Introduksi	<i>C. limon</i>	Obat
Jari Budha	Introduksi	<i>C. medica</i>	Belum dimanfaatkan
Troyer Citrange	Introduksi	<i>C. sinensis</i> cv. Washington × <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	Batang bawah
Keprak Akyar	Jawa Timur	-	Obat

Tabel 2. Urutan basa marka RAPD dan kisaran pita DNA.

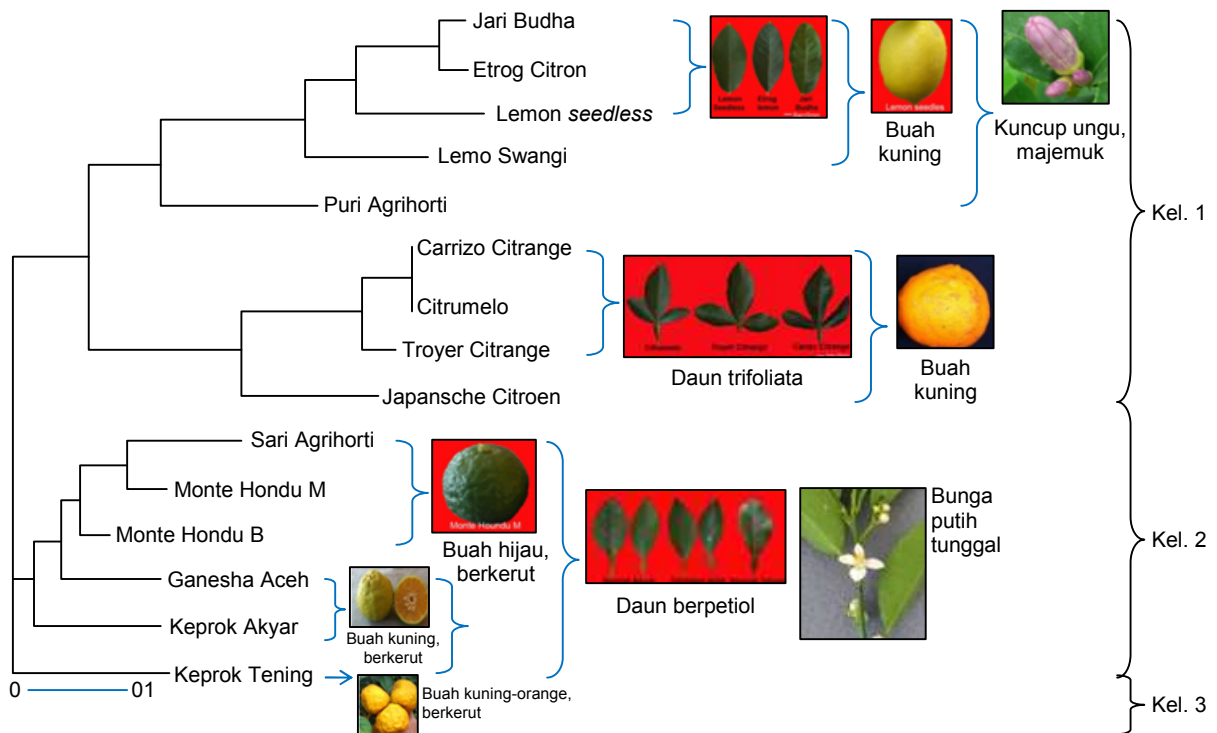
Nama marka	Sekuen	Kisaran pita DNA (bp)
OPC17	TTCCCCCAG	150–2.500
OPD07	TTGGCACGGG	210–2.500
OPH04	GGAAGTCGCC	250–2.500
OPH15	AATGGCGCAG	235–2.000

dan Puri Agrihorti; kelompok dua yang terdiri atas Carrizo Citrange, Citrumelo, Troyer Citrange, dan Japansche Citroen; kelompok tiga yang terdiri atas Sari Agrihorti, Monte Hondu M, Monte Hondu B, Ganesha Aceh, dan Keprak Akyar; kelompok empat yang hanya terdiri atas Keprak Tening. Karakter yang mendominasi dalam kelompok satu adalah bunga majemuk dengan warna bunga kuncup ungu, dalam kelompok dua adalah buah berwarna kuning, dalam kelompok tiga adalah bunga tunggal berwarna putih, daun memiliki petiol, dan dalam kelompok empat adalah warna buah kuning-oranye.

Pada kelompok satu terdapat tiga subkelompok, yaitu subkelompok yang memiliki bentuk daun *sessile* (tanpa sayap daun) dan memiliki buah lonjong dengan warna kulit kuning, subkelompok yang memiliki bentuk daun trifoliata, dan subkelompok yang memiliki daun *sessile*, buah bulat, dan berwarna kuning. Tanaman yang termasuk dalam subkelompok satu adalah Jari Budha, Etrog Citron, dan Lemon; subkelompok dua adalah Carrizo Citrange, Citrumelo, dan Carrizo Citrange; subkelompok tiga adalah Japansche Citroen. Kelompok dua terbagi menjadi dua subkelompok, yaitu subkelompok dengan warna

Tabel 3. Karakter morfologis lima belas jeruk fungsional Indonesia.

Aksesi	Bentuk tajuk	Daun				Bunga			Buah				
		Warna	Bentuk	Bentuk helai	Bentuk sayap	Jenis	Warna kuncup	Warna mekar	Bentuk	Warna kulit	Tekstur kulit	Warna daging	Rasa daging
Monte Hondu M	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Ovate</i>	<i>Obovate</i>	Majemuk	Putih	Putih	<i>Obloid</i>	Hijau	Berkerut	Putih kehijauan	Asam
Monte Hondu B	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Ovate</i>	<i>Obcordate</i>	Majemuk	Putih	Putih	<i>Speroid</i>	Hijau	Berkerut	Putih kehijauan	Asam
Japansche Citroen	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Sessile</i>	<i>Ovate</i>	-	Tunggal	Putih	Putih	<i>Speroid</i>	Kuning	Kasar	Kuning	Asam
Lemo Swangi	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Longipetiolate</i>	<i>Obovate</i>	<i>Obcordate</i>	Tunggal	Ungu	Putih	Ellipsoid	Kuning	Halus	Putih	Asam
Ganesha Aceh	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Elliptic</i>	<i>Obovate</i>	Tunggal	Putih	Putih	<i>Speroid</i>	Kuning	Berkerut	Putih kehijauan	Asam manis
Puri Agrihorti	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Longipetiolate</i>	<i>Elliptic</i>	<i>Obcordate</i>	Majemuk	Ungu	Putih	<i>Pyriform</i>	Hijau	Berkerut	Putih kehijauan	Asam
Sari Agrihorti	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Sessile</i>	<i>Elliptic</i>	<i>Obovate</i>	Tunggal	Putih	Putih	<i>Obloid</i>	Hijau	Berkerut	Putih kehijauan	Asam
Keprak Tening	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Ovate</i>	<i>Obovate</i>	Tunggal	Putih	Putih	<i>Speroid</i>	Kuning-oranye	Berkerut	Kuning	Buruk
Citrumelo	Menyebar ke atas	Hijau	Trifoliata	<i>Obovate</i>	<i>Obdeltate</i>	Tunggal	Putih	Putih	<i>Speroid</i>	Kuning	Kasar	Kuning	Asam
Carrizo Citrange	Menyebar ke atas	Hijau	Trifoliata	<i>Obovate</i>	<i>Obdeltate</i>	Tunggal	Putih	Putih	<i>Speroid</i>	Kuning	Kasar	Kuning	Asam
Etrog Citron	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Sessile</i>	<i>Ovate</i>	-	Majemuk	Ungu	Putih	<i>Ellipsoid</i>	Kuning	Bergelombang	Putih	Buruk
Lemon seedless	Menyebar ke samping	Hijau	<i>Sessile</i>	<i>Ovate</i>	-	Majemuk	Ungu	Putih	<i>Ellipsoid</i>	Kuning	Halus	Putih	Asam
Jari Budha	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Sessile</i>	<i>Ovate</i>	-	Majemuk	Ungu	Putih	Lain-lain	Kuning	Bergelombang	Putih	Buruk
Troyer Citrange	Menyebar ke atas	Hijau	Trifoliata	<i>Obovate</i>	<i>Obovate</i>	Tunggal	Putih	Putih	<i>Speroid</i>	Kuning	Kasar	Kuning	Asam
Keprak Akyar	Menyebar ke atas	Hijau	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Ovate</i>	<i>Obdeltate</i>	Tunggal	Putih	Putih	<i>Speroid</i>	Kuning	Berkerut	Putih kehijauan	Asam manis



Gambar 1. Dendrogram kekerabatan berdasarkan karakter morfologis. Bar = 0,1 koefisien keragaman.

buah hijau (Sari Agrihorti, Monte Hondu M, dan Monte Hondu B) dan subkelompok dengan warna buah kuning (Ganesha Aceh dan Keprok Akyar). Kelompok tiga hanya terdiri atas satu tanaman, yaitu Keprok Tening yang memiliki buah berwarna kuning-oranye dengan tekstur buah berkerut.

Koefisien keragaman lima belas tanaman jeruk fungsional Indonesia berdasarkan karakter morfologis bervariasi antara 0–79% (Tabel 4). Semakin tinggi koefisien keragaman, semakin berbeda karakter morfologisnya. Berdasarkan Tabel 4, tanaman yang memiliki kesamaan morfologi paling tinggi adalah Citrumelo dengan Carrizo Citrange (keragaman 0%), Citrumelo dengan Troyer Citrange, Carrizo Citrange dengan Troyer Citrange dan Etrog Citron dengan Jari Budha (disimilaritas 8%). Tanaman yang memiliki kesamaan morfologi terendah adalah Citrumelo dan Carrizo Citrange dengan Etrog Citron (76%), Citrumelo dan Carrizo Citrange dengan Lemon *seedless* (79%), dan Citrumelo dan Carrizo Citrange dengan Jari Budha (77%). Hal ini menunjukkan bahwa kesamaan morfologi tertinggi terjadi antar-tanaman dengan daun trifoliata (turunan *P. trifoliata*) dan antartanaman dari golongan *C. medica*, sedangkan kesamaan morfologi terendah adalah antara golongan trifoliata dengan golongan *C. medica*.

Keragaman Molekuler Jeruk Fungsional Indonesia

Hasil amplifikasi empat marka RAPD terhadap lima belas aksesori jeruk fungsional Indonesia (Tabel 1) menunjukkan bahwa semua marka RAPD (Tabel 2) dapat mengenali dan mengamplifikasi sekuen DNA dalam genom jeruk yang diuji. Amplifikasi tersebut menghasilkan 506 pita DNA dengan 67 lokus bersifat polimorfik dari total 72 lokus yang dihasilkan (Tabel 5). Hasil amplifikasi setiap marka pada setiap aksesori beragam antara 3–14 pita DNA (Tabel 6) dengan kisaran ukuran 150–2.500 bp. Tingkat polimorfisme marka masing-masing ditunjukkan oleh nilai PIC setiap marka yang berkisar antara 0,906 sampai dengan 0,93 (Tabel 5 dan Tabel 6).

Persentase polimorfisme yang dihasilkan oleh marka RAPD dalam penelitian ini termasuk tinggi, yaitu 92,6% seperti yang dilaporkan sebelumnya, yaitu sebesar 92,46% (Baig *et al.*, 2009) dan 95% (Pessina *et al.*, 2011). Hasil ini lebih tinggi dibanding dengan laporan keragaman genetik *grapefruit* dan pamelon (49%) (Corazza-Nunes *et al.*, 2002) dan keragaman tujuh jeruk batang bawah, jeruk manis, dan keprok (65,7%) (Hussein *et al.*, 2004). Keragaman yang tinggi tersebut terjadi karena perbedaan spesies tanaman jeruk yang diuji, marka, dan kondisi reaksi PCR yang

Tabel 4. Koefisien keragaman lima belas jeruk fungsional Indonesia berdasarkan karakter morfologis.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0,00														
2	0,11	0,00													
3	0,53	0,48	0,00												
4	0,63	0,58	0,72	0,00											
5	0,20	0,14	0,52	0,62	0,00										
6	0,47	0,41	0,55	0,49	0,46	0,00									
7	0,15	0,20	0,62	0,72	0,29	0,56	0,00								
8	0,31	0,25	0,54	0,64	0,30	0,48	0,40	0,00							
9	0,58	0,52	0,32	0,76	0,57	0,60	0,67	0,58	0,00						
10	0,58	0,52	0,32	0,76	0,57	0,60	0,67	0,58	0,00	0,00					
11	0,64	0,58	0,72	0,35	0,63	0,49	0,72	0,64	0,76	0,76	0,00				
12	0,66	0,60	0,74	0,38	0,65	0,52	0,75	0,67	0,79	0,79	0,26	0,00			
13	0,65	0,59	0,73	0,36	0,64	0,50	0,74	0,65	0,77	0,77	0,08	0,28	0,00		
14	0,55	0,49	0,29	0,73	0,54	0,57	0,64	0,55	0,08	0,08	0,73	0,76	0,74	0,00	
15	0,28	0,22	0,54	0,64	0,27	0,48	0,37	0,31	0,58	0,58	0,64	0,66	0,65	0,55	0,00

1 = Monte Hondu M, 2 = Monte Hondu B, 3 = Japansche Citroen, 4 = Lemo Swangi, 5 = Ganesha Aceh, 6 = Puri Agrihorti, 7 = Sari Agrihorti, 8 = Keprok Tening, 9 = Citrumelo, 10 = Carrizo Citrange, 11 = Etrog Citron, 12 = Lemon *seedless*, 13 = Jari Budha, 14 = Troyer Citrange, 15 = Keprok Akyar.

Tabel 5. Polimorfisme yang dihasilkan oleh lima belas aksesori jeruk fungsional Indonesia menggunakan empat marka RAPD.

Nama marka	Total alel	Alel polimorfik	Jumlah pita DNA	PIC
OPC17	16	13	120	0,906
OPD07	19	19	132	0,926
OPH04	18	17	114	0,93
OPH15	19	18	140	0,93
Total	72	67	506	
Rerata	18,00±1,41	16,75±2,63	126±11,70	0,923±0,01

digunakan. Dalam penelitian ini, spesies jeruk yang digunakan adalah *C. media*, *C. limon*, *Citrus × limonia* Osbeck, *Citrus × hystrix* DC, *C. amblycarpa*, hibrida dari *P. trifoliata*, dan jeruk lokal Indonesia yang belum diketahui spesiesnya.

Amplifikasi marka RAPD dalam penelitian ini menghasilkan beberapa pita DNA spesifik (Gambar 2 dan Tabel 7). Setiap marka menghasilkan pita DNA spesifik. Marka OPC17 menghasilkan pita spesifik yang hanya muncul pada aksesori dengan tipe daun yang memiliki petiol (Monte Hondu B, Keprok Tening, Purut, dan Lemo Swangi) dan tipe daun trifoliata (Citrumelo, Carrizo Citrange, dan Troyer Citrange). Sementara, marka OPD07 dan OPH04 menghasilkan pita DNA spesifik jeruk purut (Puri Agrihorti), Keprok Tening, dan aksesori yang memiliki daun trifoliata. Marka OPH15 menghasilkan pita spesifik untuk aksesori yang termasuk dalam golongan *C. limon*, *C. medica*, dan aksesori berdaun trifoliata (Tabel 7).

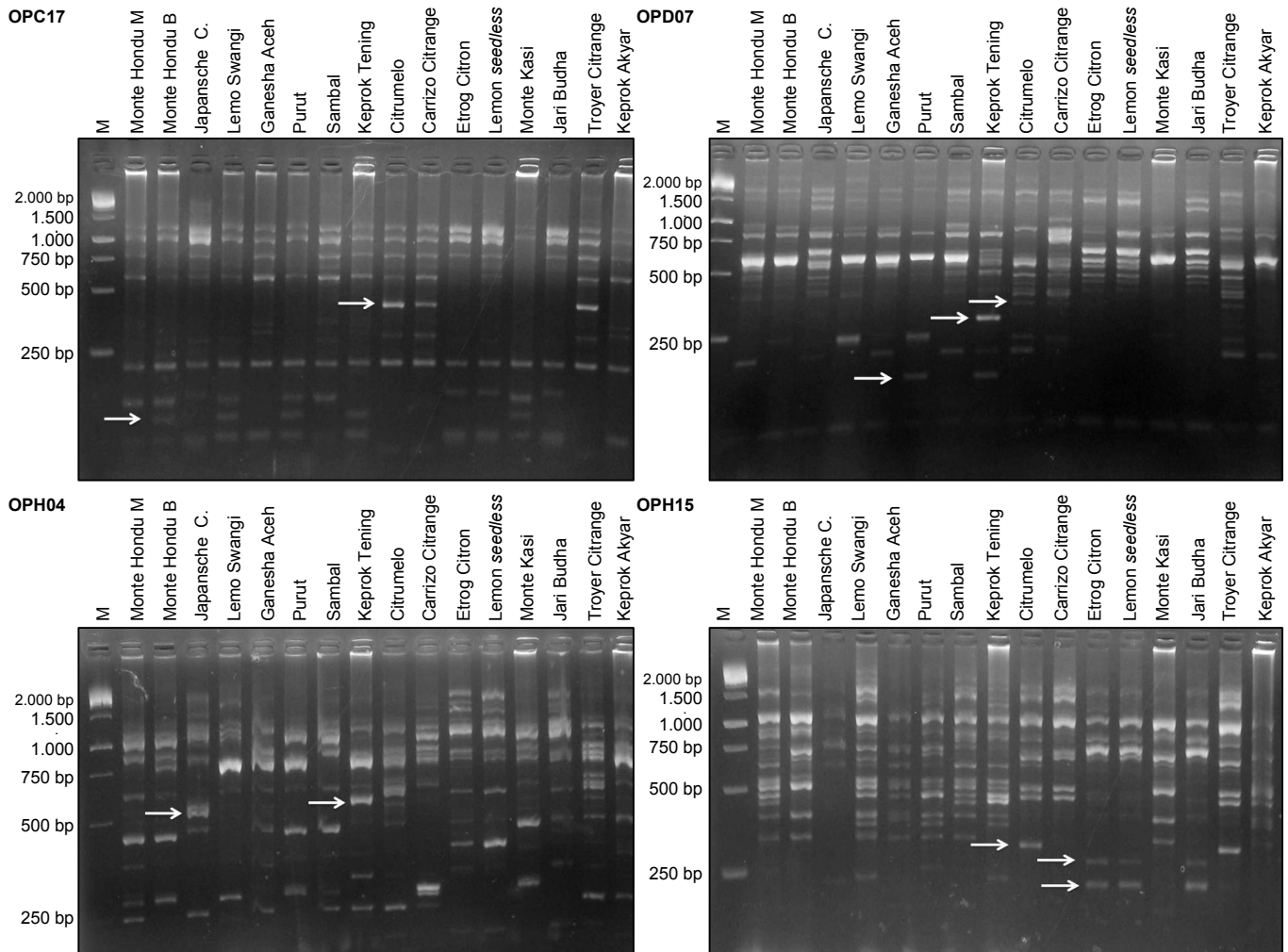
Keberadaan pita DNA spesifik pada aksesori tertentu dapat digunakan sebagai sidik jari aksesori tersebut. Sidik jari berdasarkan marka RAPD dapat digunakan untuk keperluan identifikasi kemurnian varietas, efisiensi penggunaan, dan pengelolaan sumber daya genetik dan untuk mengidentifikasi adanya kesalahan pelabelan tanaman (Hussein *et al.*, 2004). Berdasarkan hasil penghitungan koefisien keragaman (Tabel 8), diketahui bahwa keragaman genetik lima belas aksesori jeruk fungsional yang diuji sebesar 0–49%. Aksesori yang sama secara genetik adalah Keprok Akyar dan Ganesha Aceh (0%), sedangkan yang memiliki keragaman genetik tertinggi adalah Lemo Swangi dan Lemon *seedless* (49%). Nilai keragaman ini lebih kecil dibanding dengan nilai

keragaman berdasarkan karakter morfologis. Hal ini disebabkan oleh marka yang digunakan kurang spesifik dengan jumlah masih terlalu sedikit.

Analisis kluster berdasarkan keempat marka digunakan untuk membangun dendrogram hubungan kekerabatan lima belas aksesori jeruk fungsional Indonesia (Gambar 3). Identifikasi genetik aksesori jeruk menggunakan marka RAPD ini menghasilkan pengelompokan yang dapat dihubungkan dengan pita DNA spesifik. Pada kelompok satu, subkelompok satu (Jari Budha, Etrog Citron, dan Lemon *seedless*) dipengaruhi oleh pita spesifik yang dihasilkan oleh marka OPH15 pada ukuran 235 bp dan 280 bp. Japansche Citroen membentuk subkelompok tersendiri dalam kelompok satu yang dipengaruhi oleh pita spesifik yang dihasilkan oleh marka OPH04 pada ukuran 550 bp. Kelompok dua terdiri atas kelompok tanaman jeruk dengan daun trifoliata. Pada kelompok ini, pengelompokan dipengaruhi oleh pita spesifik yang dihasilkan oleh marka OPD07 pada ukuran 400 bp dan OPC17 pada ukuran 416 bp. Troyer Citrange dan Citrumelo membentuk subkelompok tersendiri dalam kelompok dua yang dipengaruhi oleh pita spesifik yang dihasilkan oleh marka OPH15 pada ukuran 320 bp. Pada kelompok tiga yang terdiri atas Puri Agrihorti, Lemo Swangi, dan Monte Hondu B dipengaruhi oleh pita spesifik yang dihasilkan oleh marka OPC17 pada ukuran 107 bp. Kelompok empat yang terdiri atas Sari Agrihorti, Monte Hondu M, dan kelompok lima yang terdiri atas Keprok Akyar dan Ganesha Aceh tidak ditemukan adanya pita spesifik. Kelompok enam hanya terdiri atas satu tanaman, yaitu Keprok Tening yang dipengaruhi oleh pita spesifik yang dihasilkan oleh marka OPH04 pada ukuran 583 bp dan OPD07 pada ukuran 330 bp.

Tabel 6. Jumlah pita DNA yang dihasilkan oleh marka RAPD pada lima belas aksesori jeruk fungsional Indonesia.

Aksesori	OPC17	OPD07	OPH04	OPH15
Monte Hondu M	6	9	8	11
Monte Hondu B	7	6	7	8
Japansche Citroen	8	10	8	5
Lemo Swangi	8	7	6	14
Ganesha Aceh	8	6	7	9
Puri Agrihorti	7	6	5	14
Sari Agrihorti	8	10	6	12
Keprok Tening	8	9	6	10
Citrumelo	7	11	8	9
Carrizo Citrange	8	11	9	7
Etrog Citron	6	9	8	4
Lemon <i>seedless</i>	8	9	6	7
Jari Budha	6	9	8	3
Troyer Citrange	10	12	10	10
Keprok Akyar	9	6	6	7
Jumlah	114	130	108	130
Rata-rata	7,60±1,12	8,67±2,02	7,20±1,37	8,67±3,31



Gambar 2. Pola pita DNA hasil amplifikasi marka RAPD pada lima belas aksesori jeruk fungsional adaptif di Indonesia. Tanda panah menunjukkan pita DNA yang unik.

Tabel 7. Pita DNA spesifik yang dihasilkan oleh marka RAPD.

Nama marka	Ukuran pita (bp)	Terdeteksi pada
OPC17	167	Aksesori dengan daun yang memiliki petiol
	416	Aksesori dengan daun trifoliata
OPD07	330	Keprok Tening
	400	Aksesori dengan daun trifoliata
OPH04	550	Japansche Citroen
	583	Keprok Tening
OPH15	235	Aksesori termasuk dalam <i>C. medica</i> dan <i>C. limon</i>
	280	Aksesori termasuk dalam <i>C. medica</i> dan <i>C. limon</i>
	320	Troyer Citrange dan Citrumelo

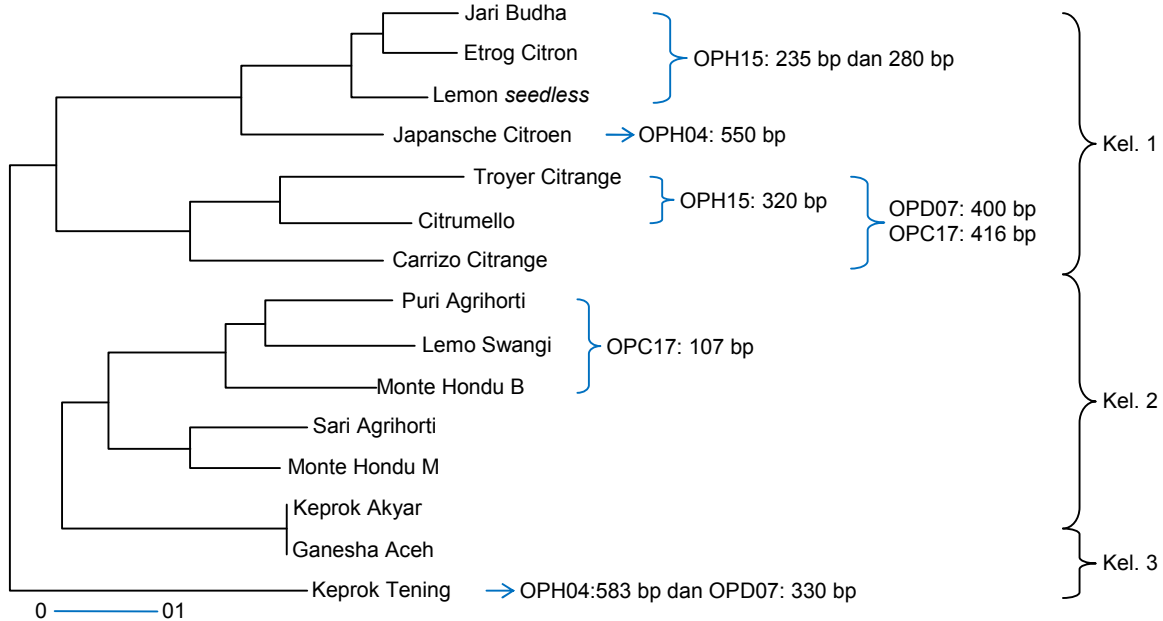
Dari pengelompokan berdasarkan karakter morfologis dan molekuler, diketahui subkelompok terdiri atas Jari Budha, Etrog Citron, dan Lemon *seedless* yang memiliki ciri khusus daun tidak berpetiol, warna buah kuning, dan warna bunga kuncup ungu; subkelompok trifoliata (Troyer Citrange, Citrumelo, dan Carrizo Citrange); subkelompok Keprok Tening,

mengelompok secara konsisten. Pita DNA spesifik yang ditemukan pada subkelompok tersebut berpeluang dikembangkan sebagai marka *sequence characterized amplified regions* (SCAR).

Tabel 8. Koefisien keragaman lima belas jeruk fungsional Indonesia berdasarkan karakter genetik.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0,00														
0,25	0,00													
0,36	0,43	0,00												
0,26	0,19	0,44	0,00											
0,24	0,31	0,37	0,32	0,00										
0,26	0,18	0,44	0,15	0,31	0,00									
0,11	0,27	0,39	0,29	0,26	0,28	0,00								
0,32	0,38	0,38	0,39	0,33	0,39	0,34	0,00							
0,38	0,44	0,40	0,46	0,39	0,45	0,40	0,40	0,00						
0,36	0,43	0,38	0,44	0,37	0,43	0,38	0,38	0,24	0,00					
0,40	0,47	0,20	0,48	0,41	0,47	0,42	0,42	0,43	0,42	0,00				
0,41	0,48	0,21	0,49	0,42	0,48	0,43	0,43	0,44	0,42	0,12	0,00			
0,41	0,47	0,21	0,48	0,42	0,48	0,43	0,43	0,44	0,42	0,08	0,13	0,00		
0,41	0,47	0,43	0,49	0,42	0,48	0,43	0,43	0,18	0,27	0,46	0,47	0,47	0,00	
0,24	0,31	0,37	0,32	0,00	0,31	0,26	0,33	0,39	0,37	0,41	0,42	0,42	0,42	0,00

1 = Monte Hondu M, 2 = Monte Hondu B, 3 = Japansche Citroen, 4 = Lemo Swangi, 5 = Ganesha Aceh, 6 = Puri Agrihorti, 7 = Sari Agrihorti, 8 = Keprok Tening, 9 = Citrumelo, 10 = Carrizo Citrange, 11 = Etrog Citron, 12 = Lemon *seedless*, 13 = Jari Budha, 14 = Troyer Citrange, 15 = Keprok Akyar.



Gambar 3. Dendrogram kekerabatan berdasarkan karakter genetik. Bar = 0,1 koefisien keragaman.

KESIMPULAN

Keragaman morfologis jeruk fungsional Indonesia lebih tinggi dibanding dengan keragaman molekulernya. Keragaman tertinggi berdasarkan karakter morfologis terjadi antara aksesii Citrumelo dan Carrizo Citrange dengan Etrog Citron (76%), Citrumelo dan Carrizo Citrange dengan Lemon *seedless* (79%), dan Citrumelo dan Carrizo Citrange dengan Jari Budha (77%), sedangkan keragaman tertinggi berdasarkan karakter genotipik terjadi antara aksesii Lemo Swangi dan Lemon *seedless* (49%).

Marka RAPD yang digunakan mampu membedakan aksesii jeruk fungsional secara efektif dengan

tingkat polimorfisme yang tinggi (90,6%). Pita DNA spesifik ditemukan oleh marka OPH15_(235,280) pada aksesii Jari Budha, Etrog Citron, dan Lemon *seedless*, marka OPD07₍₄₀₀₎ dan OPC17₍₄₁₆₎ pada aksesii dengan daun tipe trifoliata (Troyer Citrange, Citrumelo, dan Carrizo Citrange) dan OPH04₍₅₈₃₎ dan OPD07₍₃₃₀₎ pada aksesii Keprok Tening. Subkelompok yang terdiri atas Jari Budha, Etrog Citron, dan Lemon *seedless* yang memiliki ciri khusus daun tidak berpetiol, warna buah kuning, dan warna bunga kuncup ungu; subkelompok trifoliata (Troyer Citrange, Citrumelo, dan Carrizo Citrange); subkelompok Keprok Tening, mengelompok secara konsisten.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Sri Andayani, staf Kebun Percobaan Punten, Balitjestro, yang telah membantu dalam pemeliharaan tanaman induk, pengambilan sampel daun jeruk, dan karakterisasi morfologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agisimanto, D., H. Arisah, dan N.E. Palupi. 2015. Pengembangan protokol produksi limonin dan naringin dari jeruk dan penggunaan ekstraknya dalam partikel nano. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Malang.
- Amar, M.H., M.K. Biswas, Z.W. Zhang, and W.W. Guo. 2011. Exploitation of SSR, SRAP, and CAPS-SNP markers for genetic diversity of *Citrus* germplasm collection. *Sci. Hort.* 128:220–227.
- Baig, M.N.R., S. Grewal, and S. Dhillon. 2009. Molecular characterization and genetic diversity analysis of citrus cultivars by RAPD markers. *Turk. J. Agric. For.* 33:375–384.
- Biswas, M.K., L. Chai, M.H. Amar, X. Zhang, and X.X. Deng. 2011. Comparative analysis of genetic diversity in *Citrus* germplasm collection using AFLP, SSAP, SAMPL, and SSR markers. *Sci. Hort.* 129:798–803.
- Coletta-Filho, H.D., M.A. Machado, M.L.P.N. Targon, M.C.P.Q.D.G. Moreira, and J. Pompeu Jr. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarin (*Citrus* sp.) using RAPD markers. *Euphytica* 102:133–139.
- Corazza-Nunes, M.J., M.A. Machado, W.M.C. Nunes, M. Cristofani, and M.L.P.N. Targon. 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* [Burm.] Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica* 126:169–176.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Gorinstein, S., O. Martín-Belloso, P. Yong-Seo, R. Haruenkit, A. Lojek, M. Číž, A. Caspi, I. Libman, and S. Trakhtenberg. 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chem.* 74:309–315.
- Hasler, C.M. 2002. Functional foods: Benefits, concerns, and challenges. A position paper from the American Council on Science and Health. *J. Nutr.* 132:3772–3781.
- Hussein, E.H.A., S.M.M. Abd-alla, N.A. Awad, and M.S. Hussein. 2004. Assessment of genetic variability and genotyping of some citrus accessions using molecular markers. *Arab J. Biotech.* 7(1):23–36.
- International Life Sciences Institute. 1999. Functional food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39:203–316.
- International Plant Genetic Resources Institute. 1999. Descriptor for citrus. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Koehler-Santos, P., A.L.C. Dornelles, and L.B.D. Freitas. 2003. Characterization of mandarin citrus germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analyses. *Pesq. Agropec. Bras.* 38:797–806.
- Ling, P., L.W. Duncan, Z. Deng, D. Dunn, X. Hu, S. Huang, and F.G. Gmitter. 2000. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100(7):1010–1017.
- Malik, S.K., M.R. Rohini, S. Kumar, R. Choudhary, D. Pal, and R. Chaudhury. 2012. Assessment of genetic diversity in sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) cultivars of India using morphological and RAPD markers. *Agric. Res.* 1(4):317–324.
- Mestre, P.F., M.J. Asins, E.A. Carbonell, and L. Navarro. 1997. New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. to *Citrus tristeza virus*. *Theor. Appl. Genet.* 95:691–695.
- Moore, G.A. 2001. Oranges and lemons, clues to the taxonomy of from molecular markers. *Trends Genet.* 17:536–540.
- Penjor, T., T. Mimura, R. Matsumoto, M. Yamamoto, and Y. Nagano. 2014. Characterization of limes (*Citrus aurantifolia*) grown in Bhutan and Indonesia using high-throughput sequencing. *Sci. Rep.* 4:4853. doi:10.1038/srep04853.
- Pessina, D., R. Gentili, G. Barcaccia, S. Nicolè, G. Rossi, S. Barbesti, and S. Sgorbati. 2011. DNA content, morphometric and molecular marker analyses of *Citrus limonimedica*, *C. limon*, and *C. medica* for the determination of their variability and genetic relationships within the genus *Citrus*. *Sci. Hort.* 129:663–673.
- Rao, M.N., J.R. Soneji, C. Chen, S. Huang, and F.G. Gmitter. 2008. Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Genet. Genomes* 4:113–124.
- Ruiz, C., M.P. Breto, and M.J. Asins. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112:89–94.
- Siragusa, M., F.D. Pasquale, L. Abbate, L. Martorana, and N. Tusa. 2008. The genetic variability of Sicilian lemon germplasm revealed by molecular marker fingerprints. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 133:242–248.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and G. Kahl. 2005. DNA fingerprinting in plants: Principles, methods, and applications. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531–6535.

Yoon, H.Y., S.I. Yun, B.Y. Kim, Q. Jin, E.R. Woo, S.Y. Jeong, and Y.S. Chung. 2011. Poncirin promotes osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Eur. J. Pharmacol.* 664(1–3):54–59.

Yuan-Chuen, W., C. Yueh-Chueh, and K. Yu-Hua. 2007. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chem.* 102:1163–1171.
