

Perbedaan Primer RAPD dan ISSR dalam Identifikasi Hubungan Kekerbatan Genetik Jeruk Siam (*Citrus suhuniensis* L. Tan) Indonesia

Agisimanto, D., C. Martasari, dan A. Supriyanto

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No. 1 Junrejo, Batu 65301
Naskah diterima tanggal 2 Mei 2006 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 8 November 2006

ABSTRAK. Jeruk siam Indonesia tersebar di berbagai sentra produksi dengan nama yang berbeda menurut lokasi adaptasi. Morfologi jeruk-jeruk tersebut terlihat sama, dengan beberapa karakter spesifik yang berbeda. Penelitian bertujuan membandingkan kemampuan primer RAPD dan ISSR dalam mendeteksi kekerabatan di antara jeruk siam. Sampel DNA dari 19 jenis jeruk siam telah diisolasi dari daun dan diamplifikasi dengan 5 buah primer tunggal RAPD dan ISSR. Produk amplifikasi RAPD dipisahkan dalam gel agarose, sedangkan produk ISSR dalam gel poliakrilamid. Statistik pita DNA dan data matriks setiap tipe primer dihitung dan dendogram terbangun berdasarkan analisis kluster menurut UPGMA menggunakan metode SHAN pada program NTSys-PC versi 2,10. Sebanyak 2.605 buah pita DNA dan 240 lokus telah dieksplorasi oleh primer ISSR, sedangkan dengan primer RAPD hanya 515 dan 38 buah. Dari jumlah pita tersebut lokus polimorfisme primer ISSR 90,08% lebih tinggi dibanding primer RAPD. Sebanyak 16 pita spesifik dijumpai pada jeruk siam Banyuwangi 1, siam Purworejo 1, siam Madu, dan siam Banjar 2 oleh primer ISSR, dan 6 pita pada siam Lumajang 1 dan siam Banjar 3 oleh primer RAPD. Perbedaan statistik pita DNA yang dieksplorasi tersebut berhubungan dengan akurasi kemiripan dan jarak genetik jeruk-jeruk siam pada dendogram yang terbangun. Dendogram yang terbangun oleh primer ISSR memperlihatkan keragaman jeruk siam yang lebih tinggi dengan jarak genetik yang lebih tinggi. Kedekatan hubungan di antara jeruk-jeruk siam ini terbanyak pada kisaran 84-100% (RAPD) atau 74-92% (ISSR). Fokus lebih jauh harus ditujukan kepada identifikasi keragaman siam berdasarkan primer dengan sekuen mikrosatelit yang sudah terpatut kepada sifat tertentu untuk lebih memastikan keragaman siam komersial tersebut.

Katakunci: *Citrus suhuniensis*; Primer ISSR; Primer RAPD; Kekerbatan jeruk siam.

ABSTRACT. Agisimanto, D., C. Martasari, and A. Supriyanto. 2007. Differentiation Between RAPD and ISSR Primer on Genetic Diversity Identification of Siam (*Citrus suhuniensis* L. Tan) from Indonesia. Siam was widely cultivated in several citrus growing areas with some local names. Their high adaptability to difference areas, create difficulties in deciding their original varieties. The objective of the research was to compare RAPD and ISSR primer on the genetics similarities identification among siam cultivars. DNA samples from 19 varieties were isolated and amplified by 5 RAPD and ISSR primers. Amplification products of RAPD were separated in agarose gel, while ISSR in PAGE. The DNA fragments from both primers were scored and dendogram were built based on UPGMA of NTSYS-PC version 2.10. About 2605 DNA fragments and 240 loci were scored from ISSR primers, while RAPD were 515 and 38 respectively. A total number of polymorphism loci of ISSRs were 90.08% higher than RAPDs. About 16 specific loci were identified from siam Banyuwangi 1, siam Purworejo 1, siam Madu, and siam Banjar 2 by ISSR primers, and 6 specific loci from siam Lumajang 1 and siam Banjar 3 by RAPD primers. Two dendogram were established from the primers. Coefficient similarity of siam cultivars revealed by ISSR was lower, ranging from 74 to 92%, than RAPD (84-100%). Future activities should be focused on diversity studies of siam by using primer based on microsatellite sequences which are link to specific characters.

Keywords: *Citrus suhuniensis*; ISSR primer; RAPD primer; siam diversity.

Genus *Citrus* merupakan kelompok tanaman yang paling memiliki nilai ekonomis tinggi dengan keragaman tinggi antara spesies, kultivar, dan klon. Taksonomi dan filogeni jeruk pada akhirnya sangat rumit, kontroversial, dan membingungkan, akibat kompatibilitas seksual antara genus *Citrus* dan kerabat liarnya (*wide cross-compatibility*) yang membuat unit taksonomi menjadi besar, frekuensi mutasi tunas yang tinggi (*sports mutation*), dan sejarah budidaya yang panjang

dengan penyebaran tanaman yang luas (Frost dan Soost 1968, Federici *et al.* 1998, Nicolosi *et al.* 2000, Coletta-Filho *et al.* 1998) dan apomiksisi (Herrero *et al.* 1996, Fang dan Roose 1997).

Di antara spesies jeruk, kelompok Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) memiliki variasi yang relatif tinggi sebagai akibat terjadinya hibridisasi seksual di antara spesies dan hibrida intraspesifik. Mutasi somatik juga menambah variasi di dalam kelompok kultivar seperti

Satsuma dan Clementine (Cameron dan Frost 1968). Kompleksitas taksonomi jeruk Mandarin semakin bertambah karena beberapa koleksi plasma nutfah jeruk tersebut termasuk aksesinya yang diseleksi dari sentra-sentra pertanaman adalah kultivar yang sama dengan nama yang berbeda (Coletta-Filho *et al.* 1998).

Perbedaan fenotip, poliembrioni, hibridisasi, mutasi, dan konsep spesies yang berbeda telah menghambat konsensus klasifikasi sistematik kelompok Mandarin. Oleh karena itu menggunakan karakterisasi morfologi, akan sulit sekali membedakan berbagai kultivar jeruk tersebut. Untungnya, konsep klasifikasi menggunakan karakter morfologi saat ini telah didukung oleh studi biokimia dan penanda (*marker*) molekuler (Nicolosi *et al.* 2000). Kemampuan untuk mengidentifikasi kultivar jeruk menggunakan sampel daun atau jaringan vegetatif lainnya pada tahap pertumbuhan bibit sangat membantu menentukan keragaman genetik dan sekaligus memberikan proteksi atas hak kekayaan intelektual pemulia, petani, dan nurseri.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) dapat diandalkan untuk mendeteksi sekuen nukleotida yang polimorfis dengan bantuan mesin PCR (*polymerase chain reaction*) dan sebuah primer tunggal RAPD sangat bermanfaat untuk menghasilkan penanda molekuler (Williams *et al.* 1990). Teknik ini memiliki beberapa kelebihan dibanding teknik RFLP (*restriction fragment lenght polymorphism*) antara lain mudah dilakukan, cepat, hanya memerlukan sedikit DNA sebagai cetakan, dan tidak memerlukan informasi awal genom target. Oleh karenanya sejumlah penelitian penilaian keragaman genetik dan hubungan taksonomi berbagai tanaman telah dilakukan berdasarkan teknik ini. Namun demikian, profil amplifikasi RAPD dipengaruhi oleh seluruh parameter yang mempengaruhi reaksi PCR. Kemampuan pengulangan hasil RAPD dengan pola yang sama peluangnya sangat kecil dan hal itu merupakan salah satu faktor pembatas diterimanya teknik ini (Wang *et al.* 1995).

Primer yang dibuat berdasarkan urutan sekuen mikrosatelit yang menyebar di sepanjang genom dan bersifat *co-dominant* perlu digunakan untuk mengeksplorasi variasi genetik. Primer *inter-simple sequence repeat* (ISSR) yang

mengamplifikasi sekuen di antara mikrosatelit dapat dengan cepat membedakan individu-individu yang berkerabat dekat (Zietkiewicz *et al.* 1994). Sekuen mikro satelit ini tersebar di sepanjang genom eukaryotik (Tautz dan Renz 1984). Amplifikasi dengan primer ISSR dapat memperlihatkan sejumlah lokus per primer dibandingkan dengan analisis RAPD (Wolff *et al.* 1995). Primer-primer ini tidak memerlukan lokus spesifik karena primer-primer tadi akan mencari setiap tempat di dalam genom yang mengandung motif mikrosatelit (Fang dan Roose 1997). *Marker* ISSR telah digunakan untuk penelitian identifikasi kekerabatan kultivar jeruk (Fang *et al.* 1997), identifikasi bibit zigotik dan nuselar (Tusa *et al.* 2002), dan karakterisasi allotetraploid (Scarano *et al.* 2002).

Penelitian ini bertujuan mengetahui kekerabatan jeruk siam dari beberapa sentra produksi di Indonesia menggunakan penanda RAPD dan ISSR.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai Desember 2004.

Material Tanaman dan Ekstraksi DNA

Sebanyak 19 varietas jeruk siam dikoleksi dari sejumlah sentra produksi. Nama, asal koleksi, dan beberapa karakter fenotip buah jeruk siam tersebut dapat dilihat pada Tabel 1. Tanaman ditumbuhkan dan dipelihara di dalam pot besar secara optimal di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika. Untuk memperoleh tunas muda, tanaman diberi cekaman air selama 3 minggu dan kemudian disiram. DNA diekstraksi dari daun muda yang berumur 2 sampai dengan 3 minggu. Analisis data dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Bogor

Ekstraksi, Amplifikasi, dan Deteksi

Ekstraksi DNA volume kecil dilakukan berdasarkan metode CTAB (*hexadecyltrimethyl ammonium bromide*). Daun digerus dengan bantuan nitrogen cair. Tepung halus daun dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 2 ml hingga batas volume 500 μ l. Setiap sampel daun diekstrak dengan 700 μ l buffer ekstraks (1% (w/v) CTAB, 50mM Tris-

Tabel 1. Daftar genotip jeruk siam Indonesia yang digunakan dalam analisis RAPD dan ISSR (List of tangerine genotypes which are using on ISSR and RAPD analysis)

Varietas (Varieties)	Kode (Code)	Asal daerah (Origin)	Keterangan (Remark)
Siam Lumajang	SLumajang1	Lumajang-Jawa Timur	Buah berkulit tipis, manis (<i>Thin skin fruit, sweet</i>)
Siam Jember	SJember	Jember-Jawa Timur	Buah berkulit tipis, manis segar (<i>Thin skin fruit, fresh & sweet</i>)
Siam Banyuwangi	SBnyuwangi1	Banyuwangi-Jawa Timur	Buah berkulit agak tebal, manis segar (<i>Thick skin fruit, fesh & sweet</i>)
Siam Purworejo	SPurworejo1	Purworejo-Jawa Tengah	Buah berkulit tebal, manis hambar, sumber bibit (<i>Thick skin fruit, pale sweet, seed source</i>)
Siam Purworejo	SPurworejo2	Tulung Agung, Jawa Timur	Buah berkulit tipis, manis segar, sumber bibit (<i>Thin skin fruit, fresh & sweet, seed source</i>)
Siam Kintamani	SBali1	Kintamani-Bali	Buah berkulit tipis, manis (<i>Thin skin fruit, sweet</i>)
Siam Mamuju	SMamuju1	Mamuju-Sulawesi Selatan	Buah berkulit kasar, manis (<i>Rough skin fruit, sweet</i>)
Siam Banjar	SBanjar1	Barito Kuala-Kalimantan Selatan	Buah berkulit tebal,manis (<i>Thick skin fruit, sweet</i>)
Siam Banjar	SBanjar 2	Kalimantan Selatan	Buah berkulit tebal,manis (<i>Thick skin fruit, sweet</i>)
Siam Banjar	SBanjar 3	Tapin-Kalimantan Selatan	Buah berkulit tipis, manis segar (<i>Thin skin fruit, fresh & sweet</i>)
Siam Tlekung	STlekung	Batu-Jawa Timur	(koleksi Balitjeruk), manis (<i>nursery collection, sweet</i>)
Siam Pati	SPati	Batu-Jawa Timur	(koleksi Balitjeruk), manis (<i>nursery collection, sweet</i>)
Siam Ponorogo	SPonorogo	Ponorogo-Jawa Timur	(koleksi Balitjeruk), manis (<i>nursery collection, sweet</i>)
Siam Madu	SMadu	Karo-Sumatera Utara	Buah berkulit tipis, manis (<i>Thin skin fruit, sweet</i>)
Siam Pontianak	SPontianak1	Kabupaten Tebas-Kalimantan Barat	Buah berkulit tipis, manis segar, asal dari tempel (okulasi) (<i>Thin skin fruit, fresh & sweet, grafted plant</i>)
Siam Pontianak	SPontianak 2	Kabupaten Tebas-Kalimantan Barat	Buah berkulit tipis, manis segar (<i>Thin skin fruit, fresh & sweet</i>)
Siam Pontianak	SPontianak 4	Kabupaten Tebas-Kalimantan Barat	Buah berkulit tipis, manis segar, asal dari cangkakan (<i>Thin skin fruit, fresh & sweet, marcoted plant</i>)
Siam Bangkinang	SBangkinang	BBi Bangkinang-Riau	Buah berkulit tipis, manis segar, sumber bibit (<i>Thin skin fruit, frsh & sweet, seed source</i>)
Siam Jambi	SJambi	Jambi	Buah berkulit tebal, manis segar (<i>Thick skin fruit, fresh & sweet</i>)

HCl pH 8,0, 0,7M NaCl dan 10 mM Na₂EDTA) dan 100 µl 1% (v/v) *mercaptoethanol*. Suspensi dicampurkan dengan merata dan diinkubasi dalam air dengan suhu 65°C selama 30-60 menit.

Pemisahan DNA dilakukan dengan menambahkan larutan fenol: kloroform:isoamilalkohol (25:24:1 v/v) dalam perbandingan volume 1:1. Setelah sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 12 menit, supernatan dimurnikan kembali dengan larutan kloroform:isoamilalkohol (24:1 v/v) dalam perbandingan volume 2:1 dan disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 5-10 menit. Presipitasi DNA dilakukan dengan menambahkan etanol absolut dingin ke dalam supernatan. Endapan DNA dipisahkan dari larutan dengan bantuan sentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 12 menit. Endapan (pelet) DNA dicuci dengan 70% etanol dingin, dikeringkan dan dicairkan kembali dalam larutan buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) sebanyak 200 µl. Uji kualitas dan kuantitas DNA dilakukan pada gel elektroforesis agarose 0,8% berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989).

Amplifikasi (penggandaan) sampel DNA jeruk dengan primer RAPD polimorfis (OP A01, OP A03, OP A13, OP E14, dan OP N14) dilakukan dengan program mesin PCR, yaitu 1 siklus denaturasi suhu 95°C selama 5 menit, diikuti dengan 44 siklus denaturasi suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* suhu 45°C selama 1 menit dan ekstensi suhu 72°C selama 2 menit. Siklus PCR diakhiri dengan 1 siklus ekstensi akhir suhu 72°C selama 7 menit. Setiap sampel dicampurkan dengan 20 µl pereaksi PCR yang mengandung 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,3 µM Primer, dan 1 unit Taq DNA polimerase.

Amplifikasi sampel DNA jeruk dengan primer ISSR (1-8) polimorfis dilakukan berdasarkan metode Scarano *et al.* (2002). Program mesin PCR, adalah 1 siklus denaturasi suhu 94°C selama 3 menit, diikuti dengan 28 siklus denaturasi suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* suhu 53°C selama 1 menit, dan ekstensi suhu 72°C selama 2 menit. Siklus PCR untuk primer ISSR ini

Tabel 2. Kode dan sekuen primer ISSR dan RAPD yang digunakan dalam studi kekerabatan jeruk siam, jumlah lokus, dan pita yang dideteksi (*Code and sequence of tested ISSR and RAPD primers on genetic diversity analysis of siam, number of locus, and bands detected*)

Sekuen ISSR (<i>ISSR sequence</i>)		Lokus (<i>Locus</i>)	Pita (<i>Bands</i>)
ISSR1	HVH(CA) ⁷	30	427
ISSR3	(AC) ⁸ YG	43	499
ISSR6	BDB(TCC) ⁵	33	424
ISSR7	(GT) ⁸ YC	46	261
ISSR8	(AG) ⁸ YC	88	994
SEKUEN RAPD (<i>RAPD SEQUENCE</i>)			
OPA01	5'-CAGGCCCTTC-3'	8	150
OPA03	5'-AGTCAGCCAC-3'	7	130
OPE14	5'-TGCGGCTGAG-3'	7	104
OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'	8	53
OPN14	5'-TCGTGCGGGT-3'	8	78

diakhiri dengan 1 siklus ekstensi akhir suhu 72°C selama 10 menit. Setiap sampel DNA jeruk siam dicampurkan dengan 20 µl mengandung 10 ng DNA genomik sebagai cetakan, 0,25 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), 0,5 pmol primer (ISSR 1, ISSR 3, ISSR 6, ISSR 7, dan ISSR 8), 1 unit enzim Taq DNA polimerase dalam larutan buffer 1x dan 3 mM MgCl₂. Urutan basa nitrogen dari primer-primer RAPD dan ISSR tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Pemisahan pita RAPD hasil amplifikasi dilakukan dengan metode elektroforesis pada gel agarose 1,4% di dalam larutan 0,5x TBE selama 4 jam pada kekuatan arus 80 volt. Deteksi pita DNA dilakukan dengan merendam gel agarose di dalam larutan etidium bromida (10 mg/L) selama 5 menit dan difiksasi dalam film polaroid dengan kamera UV. Sementara pemisahan fragmen DNA dari analisis ISSR dilakukan pada gel poliakrilamid 6% pada kekuatan arus 2000 volt selama 1 jam. Deteksi pita DNA dilakukan berdasarkan metode pewarnaan silver.

Skoring pita DNA dilakukan berdasarkan ada dan tidaknya pita DNA pada setiap varietas. Pita-pita DNA yang terbentuk dari hasil analisis molekuler penanda dianggap sebagai 1 karakter yang mewakili 1 lokus DNA. Pita-pita DNA dengan laju migrasi yang sama diasumsikan sebagai lokus yang homolog. Profil DNA tersebut selanjutnya diterjemahkan ke dalam data biner berdasarkan kehadiran pita (1) dan tidak ada pita DNA (0) untuk membangun matrik kemiripan.

Analisis kluster (pengelompokan dendrogram) menurut UPGMA menggunakan metode SHAN pada program NTSys-PC versi 2,10.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Polimorfisme RAPD dan ISSR

Primer-primer RAPD dan ISSR mampu mendeteksi dan mengamplifikasi sekuen jeruk siam di dalam genom dengan jumlah yang beragam, baik di antara tipe primer maupun dalam 1 jenis primer. Berdasarkan statistik pita DNA pada Tabel 2, 3, dan 4 yang diperoleh dari skoring hasil amplifikasi dan deteksi, primer ISSR menunjukkan potensi yang lebih baik dalam mengevaluasi plasma nutfah jeruk siam. Primer ISSR mendeteksi lebih banyak lokus dan pita DNA dibanding primer RAPD. Dari 5 primer ISSR yang digunakan mengevaluasi keragaman 19 varietas jeruk siam, sebanyak 2.605 pita dari 240 lokus telah dihasilkan. Sementara dari 5 primer RAPD hanya diperoleh 515 pita yang menyebar di 38 lokus (Tabel 2). Dari Tabel 2 tersebut terlihat bahwa setiap primer ISSR mendeteksi sekitar 30-88 buah lokus per primer, sedangkan RAPD hanya sekitar 7-8 buah lokus.

Jumlah pita DNA yang dihasilkan oleh setiap kultivar dalam setiap primer ISSR juga lebih banyak dengan kisaran variasi antara 5 buah (primer ISSR 7) sampai 80 pita (primer 8) (Tabel 3). Primer ISSR 8 dan primer RAPD OP A01 mengamplifikasi lokus/pita DNA paling banyak, yaitu berturut-turut 88/994 dan 8/150 dibanding primer ISSR dan RAPD lainnya (Tabel 2 dan 3).

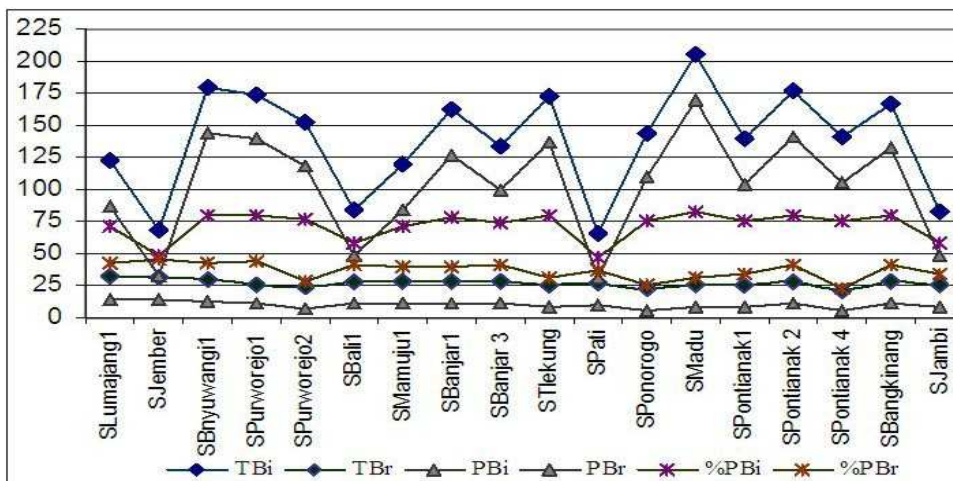
Jumlah lokus polimorfis seluruh varietas siam yang dideteksi oleh 5 primer ISSR berjumlah 1.945, sementara primer RAPD hanya 193 lokus. Rerata persentase lokus polimorfis setiap varietas dibandingkan dengan total lokus yang diperoleh oleh 5 primer ISSR adalah 42,65%, sedangkan primer-primer RAPD hanya 26,73%. Jika dihitung, maka potensi eksplorasi polimorfisme lokus pada 19 kultivar siam oleh 5 primer ISSR adalah 90,08%, lebih tinggi daripada primer RAPD. Persentase jumlah lokus monomorfis dibandingkan dengan lokus polimorfis pada kelompok primer ISSR juga jauh lebih sedikit, sebaliknya pada primer RAPD lokus monomorfis lebih banyak daripada polimorfis (Tabel 4).

Tabel 3. Total pita DNA yang dihasilkan oleh 5 primer ISSR dan 5 primer RAPD (Total bands of varieties revealed by 5 ISSR primers dan 5 RAPD primers)

Varietas (Varieties)	Primer (Primary) ISSR					Primer (Primary) RAPD				
	1	3	6	7	8	N14	A03	E14	A13	A01
Siam Lumajang (1)	24	27	16	13	42	8	7	7	3	8
Siam Jember	21	16	9	8	14	8	7	7	3	6
Siam Banyuwangi (1)	20	30	19	32	78	8	6	7	4	5
Siam Purworejo (1)	23	30	32	15	74	8	7	4	3	3
Siam Purworejo (2)	21	32	29	16	55	8	7	4	3	2
Siam Kintamani (1)	20	14	9	5	36	8	7	6	3	5
Siam Mamuju (1)	19	23	22	10	45	8	7	5	3	5
Siam Banjar (1)	26	31	21	6	78	8	7	5	3	5
Siam Banjar (2)	28	29	21	6	33	8	7	4	2	5
Siam Banjar (3)	24	23	27	11	49	8	7	7	6	1
Siam Tlekung	24	34	31	11	72	8	7	4	3	3
Siam Pati	18	8	15	5	20	8	7	4	3	5
Siam Ponorogo	24	30	23	10	57	8	6	4	3	2
Siam Madu	24	33	30	38	80	8	7	4	1	5
Siam Pontianak (1)	24	26	21	11	57	7	7	6	2	4
Siam Pontianak (3)	24	33	29	25	65	8	7	7	2	5
Siam Pontianak (4)	24	31	23	10	53	7	6	6	2	1
Siam Bangkinang	24	33	27	23	60	8	7	7	2	5
Siam Jambi	15	16	20	6	26	8	7	6	2	3

Tabel 4. Pita DNA 19 siam lokal Indonesia berdasarkan penilaian primer ISSR dan RAPD, perbandingan total pita (TB), lokus polimorfis (PL), lokus monomorfis (ML), pita spesifik (SpB), dan persentase lokus polimorfis (%PL) antara 5 primer ISSR dan 5 primer RAPD (DNA bandings of 19 Indonesia siam cultivar based on ISSR and RAPD assessments, comparison of total bands (TB), polymorphic loci (PL), specific bands (SpB), monomorphic locus (ML), and their percentage of polymorphic loci (%PL), between 5 ISSR and 5 RAPD markers)

Varieties (Varieties) Kode (Code)	ISSR					RAPD				
	TB	PL	ML	SpB	%PL	TB	PL	ML	SpB	%PL
Siam Lumajang (1)	122	87	35	0	36,25	33	14	17	2	36,84
Siam Jember	68	33	35	0	13,75	31	14	17	0	36,84
Siam Banyuwangi (1)	179	144	35	4	60,00	30	13	17	0	34,21
Siam Purworejo (1)	174	139	35	2	57,92	25	11	17	0	28,95
Siam Purworejo (2)	153	118	35	0	49,17	24	7	17	0	18,42
Siam Kintamani (1)	84	49	35	0	20,42	29	12	17	0	31,58
Siam Mamuju (1)	119	84	35	0	35,00	28	11	17	0	28,95
Siam Banjar (1)	162	127	35	0	52,92	28	11	17	0	28,95
Siam Banjar (2)	117	87	35	2	36,25	26	9	17	0	23,68
Siam Banjar (3)	134	99	35	0	41,25	29	12	17	4	31,58
Siam Tlekung	172	137	35	0	57,08	25	8	17	0	21,05
Siam Pati	66	31	35	0	12,92	27	10	17	0	26,32
Siam Ponorogo	144	109	35	0	45,42	23	6	17	0	15,79
Siam Madu	205	170	35	8	70,83	25	8	17	0	21,05
Siam Pontianak (1)	139	104	35	0	43,33	26	9	17	0	23,68
Siam Pontianak (3)	176	141	35	0	58,75	29	12	17	0	31,58
Siam Pontianak (4)	141	106	35	0	44,17	22	5	17	0	13,16
Siam Bangkinang	167	132	35	0	55,00	29	12	17	0	31,58
Siam Jambi	83	48	35	0	20,00	26	9	17	0	23,68
	2605	1945	665	16	42,65	515	193	323	6	26,73



Gambar 1. Statistik perbandingan total pita yang dihasilkan oleh primer ISSR (total pita=TBi, pita polimorfis=PBi, persentase pita polimorfis=%PBi) dan RAPD (TBr, PBr, %PBr) (*Statistical comparison of DNA fragment between ISSR (total bands=TBi, polymorphic bands=PBi, percentage of polymorphic bands=%PBi) and RAPD (TBr, PBr, %PBr)*)

Pita DNA spesifik yang mampu dideteksi oleh primer ISSR lebih banyak dibanding RAPD. Dari 19 varietas yang diuji oleh 5 primer, sebanyak 4 tanaman yang dikoleksi dari Banyuwangi (siam Banyuwangi 1), Purworejo (siam Purworejo1), Berastagi (siam Madu), dan Kalsel (siam Banjar 2) memiliki 16 pita spesifik, sedangkan primer RAPD hanya mendeteksi 6 pita pada tanaman dari Lumajang (siam Lumajang 1) dan Kalsel (siam Banjar 3) (Tabel 4).

Gambar 1 memperlihatkan statistik perbandingan jumlah lokus yang dideteksi oleh kedua jenis primer. Pada gambar tersebut terlihat bahwa potensi ISSR dalam mendeteksi keragaman jauh lebih tinggi dibandingkan dengan primer RAPD.

Keragaman Jeruk siam

Dari data biner yang dihasilkan oleh kedua tipe primer terbangun pohon dendrogram berdasarkan *unweighted pair-group methods* (UPGMA) *analysis multivariate software* NTSYS-PC versi 2.10, yang memperlihatkan keragaman jeruk siam Indonesia. Secara umum analisis RAPD menunjukkan jarak genetik jeruk-jeruk siam lebih dekat mencapai 100%, yaitu antara siam Mamuju (1) dan siam Banjar (1) sementara analisis ISSR hanya mendeteksi kedekatan jarak genetik sekitar 90%, yaitu antara siam Pontianak 1 dan siam Pontianak 4.

Pengelompokan kultivar-kultivar siam Indonesia oleh ke-5 primer RAPD memisahkan sejumlah jeruk siam komersial ke dalam beberapa kelompok yang berbeda dengan jarak genetik yang beragam. Kultivar-kultivar yang diidentifikasi adalah berasal dari jenis-jenis komersial, yaitu siam Banyuwangi, siam Ponorogo, dan siam Purworejo (Pulau Jawa), siam Banjar dan siam Pontianak (Pulau Kalimantan), siam Mamuju (Sulawesi), siam Madu dan siam Bangkinang (Sumatera), dan siam Kintamani (Bali). Primer-primer RAPD mengelompokkan kultivar-kultivar jeruk siam menjadi 4 kelompok utama dan beberapa subkelompok seperti dibawah ini.

1. Kelompok siam Banyuwangi:
 - a. Subkelompok siam Lumajang 1 dan Jember,
 - b. Subkelompok siam Pontianak 3 dan Bangkinang
 - c. Subkelompok siam Banyuwangi 1
2. Kelompok siam Tlekung:
 - a. Subkelompok siam Purworejo kluster: siam Purworejo 1 dan 2
 - b. Subkelompok siam Ponorogo,
 - c. Subkelompok siam Banjar 2 dan siam Tlekung
3. Kelompok siam Mamuju:
 - a. Subkelompok siam Bali 1,

- b. Subkelompok siam Mamuju1 dan Banjar1
- c. Subkelompok siam Pati dan siam Madu
- 4. Kelompok siam Pontianak: siam Pontianak 1 dan 4, dan siam Jambi
- 5. Kelompok siam Banjar: siam Banjar 3.

Jeruk-jeruk siam di dalam kelompok siam Banyuwangi mempunyai kemiripan hingga 86%. Lebih rinci lagi siam Lumajang dan siam Jember dari Jawa Timur berada dalam 1 rumpun dengan derajat kemiripan sekitar 92%, dan berbeda jarak genetiknya dengan siam Banyuwangi sebesar 12%. Antaranggota kelompok siam Tlekung mempunyai derajat kemiripan hingga 88%. siam Purworejo 1 dan siam Purworejo 2 yang dikoleksi dari daerah Purworejo dan Tulung Agung memiliki derajat kemiripan hingga 96% (dengan jarak genetik 4%). Rumpun siam Purworejo ini berbeda sekitar 8% dengan siam Ponorogo. Kelompok siam Mamuju terdiri dari beberapa kultivar yang tersebar di Berastagi-Sumatera (siam Madu) dan Pati-Jatim (siam Pati) yang berada serumpun dengan jarak genetik 4-6%. Pada subkelompok yang lain kelompok siam Mamuju memiliki siam Kintamani (Kintamani-Bali) dengan siam Mamuju 1 dan siam Banjar 1 yang 100% sama. siam Kintamani dan siam Mamuju/siam Banjar pada kelompok ini memiliki jarak genetik yang pendek yaitu sekitar 2-4%. Sementara pada kelompok siam Pontianak, siam Pontianak 1,4 dan siam Jambi memiliki kemiripan hingga 90%. Kelompok terakhir siam Banjar (3) berjarak genetik sekitar 30% dengan tanaman lain.

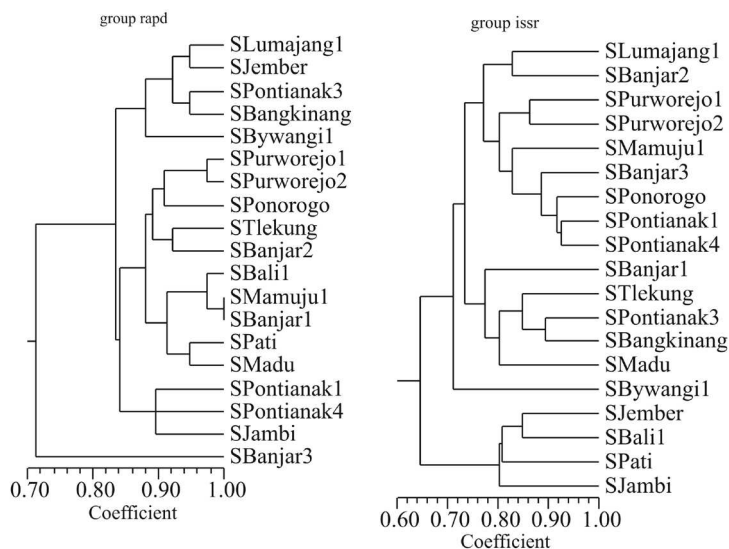
Sementara primer-primer ISSR mengelompokkan kultivar-kultivar jeruk siam menjadi 5 kelompok utama dan beberapa subkelompok, seperti di bawah ini.

- 1. Kelompok siam Lumajang: siam Lumajang dan siam Banjar 2
- 2. Kelompok siam Purworejo:
 - a. Subkelompok siam Purworejo: siam Purworejo 1 dan 2
 - b. Subkelompok siam Mamuju: siam Mamuju 1
 - c. Subkelompok siam Banjar: siam Banjar 3
 - d. Subkelompok siam Ponorogo: siam Ponorogo

- e. Subkelompok siam Pontianak: siam Pontianak 1 dan 4
- 3. Kelompok siam Tlekung :
 - a. Subkelompok siam Banjar: siam Banjar 1
 - b. Subkelompok siam Tlekung
 - c. Subkelompok siam Bangkinang: siam Pontianak 3 dan Bangkinang
 - d. Subkelompok siam Madu
- 4. Kelompok siam Banyuwangi
- 5. Kelompok siam Jember:
 - a. Subkelompok siam Jember: siam Jember dan Bali 1
 - b. Subkelompok siam Pati
 - c. Subkelompok siam Jambi

Kelompok siam Lumajang yang terdiri dari siam Lumajang dan Banjar (2) memiliki kemiripan hingga 82%. Kelompok siam Purworejo memiliki beberapa subkelompok yang menggambarkan pengelompokan berdasarkan wilayah koleksi. Subkelompok pertama siam Purworejo (1 dan 2) memiliki jarak genetik sekitar 16%. Subkelompok ini memiliki kemiripan hingga 80% dengan siam Ponorogo. Subkelompok siam Pontianak (1 dan 4) ternyata berbeda 8%. Dalam kelompok siam Tlekung, terdapat kedekatan hubungan antara siam Pontianak (3) (Kalimantan-Barat) dengan siam Bangkinang (Riau) sebesar 88%. siam Bangkinang pada pengelompokan ISSR ini memiliki kesamaan mencapai 80% dengan siam Madu (Karo-Sumut). Pada kelompok yang lain yaitu kelompok siam Jember, memperlihatkan adanya hubungan antara siam Jember dengan siam Kintamani (Bali 1) dengan kemiripan hingga 84%. siam Jember terpaut perbedaan genetik yang cukup jauh dengan kerabatnya sesama siam Jawa Timur.

Pengelompokan jeruk siam Nasional oleh primer RAPD dan ISSR memperlihatkan keragaman letak setiap individu di dalam pohon dendrogram, dengan koefisien kemiripan dan jarak genetik yang berbeda. Secara umum primer RAPD mendeteksi kedekatan hubungan di antara jeruk siam yang lebih tinggi (lebih dari 70%), sementara ISSR hanya 64%. Kedekatan hubungan di antara jeruk-jeruk siam ini terbanyak pada kisaran 84-100% (RAPD) dan 74-92% (ISSR). Hanya primer RAPD saja yang mendeteksi kemiripan siam hingga 100% yaitu siam Mamuju (1) dan siam Banjar (1).



Gambar 2. Dendrogram keragaman 19 kultivar jeruk siam Indonesia berdasarkan data matriks berdasarkan primer-primer ISSR gabungan (1, 3, 6, 7 dan 8) (kanan), dan primer-primer RAPD gabungan (OPA01, OPA03, OPA13, OPE14, OPN14) (kiri) (*Dendrogram of 19 siam cultivars based on ISSR primers (right) and RAPD groups (left)*)

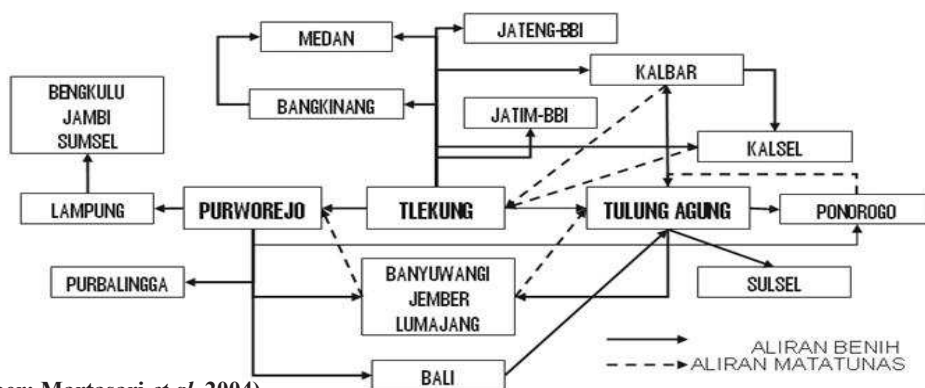
Hal yang menarik adalah hubungan kekerabatan jeruk siam ini berhubungan dengan lokasi asal jeruk yang dikoleksi atau sejarah budidaya. Jeruk siam Purworejo (1 dan 2) selalu konsisten pada kedua tipe primer meskipun jarak genetik yang diperlihatkan sedikit berbeda, dimana primer-primer RAPD mendeteksi kedekatan yang lebih tinggi (96%) dibanding ISSR (84%). Kasus yang sama dijumpai pada siam Pontianak 1 dan 4, yang selalu berada pada 1 rumpun. Namun pada kasus siam Pontianak ini primer ISSR mendeteksi kedekatan hubungan yang lebih tinggi di antara keduanya yaitu 92%, sementara RAPD hanya 90%.

Berdasarkan lokasi sumber koleksi hubungan kekerabatan jeruk berkaitan erat dengan pola penyebaran pohon induk dan bibit jeruk di Indonesia yang telah terjadi dalam kurun waktu yang lama. Sumber utama jeruk adalah berasal dari 3 lokasi, yaitu Tlekung (Batu-Jawa Timur), Purworejo (Jawa Tengah), dan Tulung Agung (Jawa Timur). Dari ketiga lokasi tersebut pohon induk dan bibit sebar jeruk atau mata tunas disebarkan dan dipertukarkan ke berbagai sentra produksi di beberapa pulau (Gambar 3). Fenomena alur distribusi bibit jeruk tersebut telah ikut memicu munculnya keragaman jeruk yang baru di beberapa lokasi. Hal ini

mungkin merupakan respons genetik terhadap perubahan faktor lingkungan dan daya adaptasi jeruk. Kombinasi kemampuan adaptasi dan seringnya petani menyeleksi mata tunas dari pohon yang baik dan menjadikannya menjadi bibit kemungkinan berpengaruh besar terhadap kemunculan keragaman baru.

Karakterisasi subgenus *Citrus* dan spesiesnya seringkali menghadapi kesulitan dalam membangun klasifikasi taksonomi berdasarkan karakter morfologi dan geografi spesifik. Hal ini disebabkan pertama, jeruk merupakan tanaman yang sudah sangat lama dibudidayakan sehingga sulit menentukan asal dan keragamannya akibat campur tangan manusia dalam hibridisasi, penyebaran yang luas, dan sedikitnya jeruk liar. Penyebab kedua adalah aspek biologi reproduksi sebagian besar jeruk yang bertipe aseksual melalui proses semai nuselar.

Pengukuran keragaman genetik dan studi pola penyebaran spesies merupakan tahapan penting untuk membangun hubungan kekerabatan genetik, dan sumber informasi yang penting dalam karakterisasi dan konservasi plasma nutfah untuk keberhasilan pengendalian erosi genetik, merancang strategi sampling atau koleksi inti, menyusun program pemuliaan (Herrero *et al.* 1996) dan memahami latar belakang genetik jeruk



(Sumber: Martasari et al. 2004)

Gambar 3. Fenomena distribusi benih dan matatunas jeruk siam di Indonesia (*Phenomenas of seedlings and budwoods distribution in Indonesia*)

yang lebih jelas sehingga penggunaan plasma nutfah jeruk menjadi lebih baik.

Penanda molekuler telah digunakan secara luas di berbagai tanaman untuk menjelaskan hubungan filogenetik, dan seharusnya dapat bermanfaat pula untuk studi taksonomi jeruk (Nicolosi et al. 2000). Penanda DNA atau molekuler semakin penting di dalam program pemuliaan karena stabilitas fenotipnya, kemampuan mendeteksi polimorfisme dan mudah dikembangkan yang memungkinkan penggunaannya dalam membantu pemuliaan (*marker-assisted breeding*).

Untuk efisiensi pelaksanaan karakterisasi dengan banyaknya tanaman yang harus dianalisis, maka penanda DNA yang dipilih haruslah murah dan mudah dihitung. Selain itu, untuk memaksimalkan produksi pita dan eksplorasi polimorfisme, penanda molekuler sebaiknya bersifat umum dan tersebar di sepanjang genom dan berbasis PCR. Primer random seperti RAPD dan primer yang mengamplifikasi mikrosatelit atau daerah di antara mikrosatelit sesuai untuk karakterisasi plasma nutfah karena kemampuannya mengeksplorasi genom.

Analisis RAPD pada jeruk telah digunakan untuk identifikasi kimera (Sugawara dan Oowada 1995), identifikasi kultivar lemon (Deng et al. 1995), hubungan filogenetik dalam genus Citrus dan kerabat dekatnya (Federici et al. 1998). Penggunaan penanda RAPD dalam melihat

sidikjari jeruk siam mudah dilakukan, dan sejumlah primer dapat dikerjakan sekaligus meski jumlah sampel terbatas. Data pita DNA RAPD yang lebih banyak diperlukan untuk homogenitas kultivar-kultivar komersial.

Marker ISSR telah digunakan untuk membuat sidikjari (*fingerprint*) plasma nutfah Trifoliata (Fang et al. 1997), identifikasi kerapatan hubungan kultivar jeruk (Fang dan Roose 1997), identifikasi bibit zigotik dan nuselar (Tusa et al. 2002). Inter Simple Sequence Repeat diaplikasi dalam input yang minimal dengan hanya menggunakan gel agarose dan deteksi nonradioaktif. Reaksi PCR dioptimasi dengan hanya memodifikasi protokol standar kondisi PCR termasuk magnesium klorida ($MgCl_2$) dan profil mesin PCR (Cai et al. 1994). Bila amplikon ISSR diseparasi dengan gel poliakrilamid, jumlah pita DNA yang dapat dideteksi lebih banyak dibandingkan dengan analisis RAPD (Wolff et al. 1995). Sebagaimana penanda mikrosatelit, amplifikasi ISSR dapat dengan cepat membedakan individu-individu yang berkerabat dekat (Zietkiewicz et al. 1994).

Keragaman genetik yang kecil pada jeruk yang dibudidayakan seperti spesies *C. sinensis* dan *C. paradisi* sudah diuji oleh penanda mikrosatelit. Keragaman genetik di antara spesies tersebut dapat dideteksi oleh penanda yang berdasar kepada penyebaran mikrosatelit di dalam genom (Kijas et al. 1995). Banyaknya amplikon yang di-

hasilkan dari daerah sekitar ISSR, mengakibatkan diperolehnya pola pita yang lebih kompleks dan berbeda diantara genotip dari spesies yang sama (Scarano *et al.* 2002).

KESIMPULAN

Primer ISSR mendeteksi lebih banyak pita DNA dibandingkan dengan primer RAPD, sehingga akurasi identifikasi dan eksplorasi polimorfisme menjadi lebih tinggi. Dendrogram yang terbangun oleh primer ISSR memperlihatkan keragaman jeruk siam yang lebih banyak dengan jarak genetik yang lebih jauh. Berdasarkan hal-hal tersebut, identifikasi kekerabatan jeruk siam lebih efisien dilakukan menggunakan primer ISSR. Penelitian lebih jauh harus difokuskan kepada identifikasi keragaman siam berdasarkan primer dengan sekuen mikrosatelit yang sudah terpaut dengan sifat tertentu untuk lebih memastikan keragaman genetik jeruk siam tersebut.

PUSTAKA

1. Cai, Q., C.L. Guy, and G.A. Moore. 1994. Extension of the Linkage Map in Citrus Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers and RFLP Mapping of Cold-Acclimation-Responsive Loci. *Theoretical Applied Genetics* 89:604-614.
2. Cameron, S.W., and H.B. Frost. 1968. Genetics, Breeding, and Nucellar Embryony. In: W. Reuther, L.D. Batchelor & H.D. Weeber (Eds), *The Citrus Industry*. University of California, USA. 2:325-389.
3. 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 Mandarins (*Citrus* Spp.) Using RAPD Markers. *Euphytica* 102:133-39.
4. Deng, Z.N., A. Gentile, E. Nicolosi, A. Vardi, and E. Tribulato. 1995. Identification of In Vivo and In Vitro Lemon Mutants by RAPD Markers. *J. Hort. Sci.* 70:117-125.
5. Fang, D. Q., M. L. Roose, R. R. Krueger, and C. T. Federici. 1997. Fingerprinting Trifoliate Orange Germplasm Accessions With Isozymes, RFLPs, and Inter-Simple Sequence Repeat Markers. *Theoretical Applied Genetics* 95:211-219.
6. Fang, D. Q., and M. L. Roose. 1997. Identification of Closely Related Citrus Cultivars With Inter-Simple Sequence Repeats Markers. *Theoretical Applied Genetics* 95:408-417.
7. Federici, C.T., D.Q. Fang, R.W. Scora, and M.L. Roose. 1998. Phylogenetic Relationships Within the Genus Citrus (*Rutaceae*) and Related Genera as Revealed by RFLP and RAPD Analysis. *Theoretical Applied Genetics* 96:812-822.
8. Frost and Soost, 1968. Seed Production: Development of Gametes and Embryos. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds). University of California Press. *The Citrus Industry*. 1:190-423.
9. Herrero, R., M.J. Asins, E.A. Carbonell, and L. Navarro. 1996. Genetic Diversity in the Orange Subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and Intragenus Genetic Variability. *Theoretical Applied Genetics* 92:599-609.
10. Kijas, J.M.H., J.C.S. Fowler, and M.R. Thomas. 1995. An Evaluation of Sequence Tagged Microsatellite Site Markers for Genetic Analysis Within Citrus and Related Species. *Genome* 38:349-355.
12. Nicolosi, E., Z.N. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. Continella, and E. Tribulato. 2000. Citrus Phylogeny and Genetic Origin of Important Species as Investigated by Molecular Markers. *Theoretical Applied Genetics* 100:1155-1166.
13. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
14. Scarano, M.T., L. Abbate, S. Ferrante, S. Lucretti, and N. Tusa. 2002. ISSR-PCR Technique: A Useful Method for Characterizing New Allotetraploid Somatic Hybrids of Mandarin. *Plant Cell Reports* 20:1162-1166.
15. Sugawara, K, and A. Oowada. 1995. Identification of Citrus Chimeras by RAPD Analysis. *HortScience* 30:1276-1278.
16. Tautz, D., and M. Renz. 1984. Simple Sequences are Ubiquitous Repetitive Components of Eukaryotic Genomes. *Nucleic Acids Research* 12:4127-4138.
17. Tusa, N., L. Abbate, S. Ferrante, S. Lucretti, and M.T. Scarano. 2002. Identification of Zygotic and Nucellar Seedlings in Citrus Interploid Crosses by Means of Isozymes, Flow Cytometry and ISSR-PCR. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7:703-708.
18. Wang, R.R.C., J. Chen, and L.R. Joppa. 1995. Production and Identification of Chromosome Specific RAPD Markers for Langdon Durum Wheat Disomic Substitution Lines. *Crop Science*. 35:886-888.
19. 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 Research* 18:6531-6535.
20. Wolff, K., E. Zietkiewicz, H. Hofstra. 1995. Identification of Chrysanthemum Cultivars and Stability of DNA Fingerprint Patterns. *Theoretical Applied Genetics* 91:439-447.
21. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genome* 20:176-183.