



KARAKTERISASI MOLEKULER JERUK KEPROK SELAYAR (*Citrus reticulata*) ASAL KABUPATEN SELAYAR DAN KABUPATEN BANTAENG MENGGUNAKAN MARKA MOLEKULER *Simple Sequence Repeat* (SSR)

N A Arif¹, S jafraenan², Juhriah³, A R Latif⁴

^{1,2,4} program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Sipatokkong Mambo

^{2,3} Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar,

⁴Program Studi Keperawatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Sulawesi Barat
Indonesia

Email: nurulfrianiarif23@gmail.com

Jl. Dr wahidin sudirohusodo No.75 Macanang, Tanete Riattang Barat, Bone

ABSTRAK

Jeruk keprok selayar (*Citrus reticulata*) merupakan salah satu komoditas sumber pendapatan petani jeruk yang pernah ada di Sulawesi Selatan khususnya di kepulauan selayar. Namun jeruk selayar yang khas dari kabupaten selayar khususnya di kecamatan Bontomatene sudah tidak berkembang luas lagi di tingkat petani dan masih bertumpu pada sumber daya setempat sehingga diperlukan perbaikan/introduksi teknologi untuk memperoleh hasil yang optima dan beberapa tahun terakhir Kembali dibudidayakan di kabupaten bantaeng dengan kondisi lingkungan yang berbeda dari asal jeruk keprok ini. Upaya dalam mengkarakterisasi jeruk keprok selayar menggunakan amplifikasi PCR menggunakan marka molekuler Simple Sequence Repeat (SSR) untuk mengetahui karakter DNA pada jeruk keprok selayar. menggunakan 4 marka SSR (GB-CU-133, GB-CU-038, GB-CU-182, GB-CU-104). Analisis data yang dihasilkan melalui aplikasi NTSYS menghasilkan dendrogram dengan tingkat kemiripan antar individu terbentuk 2 kelompok dengan koefisien 80%. Meskipun demikian nilai tersebut memperlihatkan tingkat keragaman yang rendah.

Kata Kunci: Jeruk Keprok selayar, *Sequence Repeat* (SSR),

ABSTRACT

Selayar tangerines (Citrus reticulata) is one of the commodity sources of income for citrus farmers in South Sulawesi, especially in the Selayar Islands. However, the typical tangerine of Selayar regency, especially in the Bontomatene district, is no longer widespread at the farmer level and still relies on local resources, so that technology improvements/introductions are needed to obtain optimal results. In recent years, it has been recultivated in Bantaeng district with environmental conditions which is different from the origin of this tangerine. Efforts in characterizing Selayar tangerines are by PCR amplification using Simple Sequence Repeat (SSR) molecular markers to determine the DNA character in Selayar tangerines and using 4 SSR markers (GB-CU- 133, GB-CU-038, GB-CU- 182, GB-CU-104). Analysis of the data generated through the NTSYS application produces a dendrogram with a level of similarity between individuals formed 2 groups with a coefficient of 80%. However, the value shows a low level of diversity.

Keywords: *Selayar tangerines (Citrus reticulata), Sequence Repeat* (SSR),

Submitted: 15/10/2023

Accepted: 25/11/2023

Published: 31/12/2023

Copyright © 2023 N A Arif, S jafraenan, Juhriah, A R Latif

Lisencee Universitas Amal Ilmiah Yapis Wamena



CrossMark



Pendahuluan

Jeruk keprok (*Citrus reticulata*) merupakan salah satu jenis jeruk local yang dibudidayakan di Indonesia. Kepulauan selayar merupakan salah satu bagian dari provinsi Sulawesi Selatan yang memiliki jeruk keprok khas dari selayar. Jeruk keprok selayar merupakan salah satu komoditas hortikultural unggulan [1] dan spesifik daerah Sulawesi selatan. Tanaman ini sudah lama diusahakan oleh petani dengan keuntungan usaha tani yang cukup tinggi [2].

Jeruk di introduksi ke Selayar pada tahun 1925 [1]. Jeruk keprok selayar merupakan komoditas primadona bagi petani setempat, dimana pemerintah setempat menetapkan jeruk sebagai salah satu komoditas andalan dan dikembangkan dalam skala agribisnis [2]. Namun pada beberapa tahun terakhir, luas pertanaman jeruk keprok selayar tidak bertambah, bahkan pada tahun 1997 mulai menurun [3]. Penurunan luas areal dan produktivitas tanaman terutama disebabkan oleh kematian tanaman setelah berbuah karena serangan penyakit blendok dan busa [2]. Dengan demikian budidaya jeruk keprok asal selayar pemerintah kabupaten bantaeng Kembali membudidayakan di bantaeng agar jeruk ini tidak punah [4]. Jeruk keprok merupakan asset berharga dalam keanekaragaman hayati di Indonesia khususnya di Sulawesi selatan. Salah satu cara yang dilakukan yaitu dengan mendata keanekaragaman genetiknya.

Marka SSR adalah lokus spesifik, kodominan dan marka molekuler yang didasarkan pada sekuen DNA repetitive [5]. Saat ini mikrosatelit dapat dipakai sebagai alat dalam program pemuliaan karena kemampuan yang tinggi dalam mendeteksi perbedaan urutan basa, sampai satu pasang basa [6]. Penggunaan mikrosatelit relatif mudah karena menggunakan teknik PCR. Marka SSR telah digunakan dalam penelitian untuk mengetahui kekerabatan jeruk keprok dari beberapa sentra produksi di Indonesia [7].

Metode Penelitian

Plant material

Pengambilan sampel di dua lokasi yaitu kabupaten Selayar kecamatan Bonto matene desa batang mata sebagai tanaman jeruk keprok yang menjadi tetua (parental) dan Kabupaten Bantaeng Desa Bonto Langkasa sebagai hasil budidaya ulang dan pengembangan jeruk keprok.

DNA Ekstraktion

Ekstraksi DNA menggunakan Genomic DNA mini kit (plant) dengan kode sample CrB1, CrB2, CrB3, CrB4, CrB5 dan CrT1, CrT2, CrT3, CrT4, CrT5. Dengan beberapa tahap tissue dissociation, lysis, DNA binding, wash and DNA elution.

PCR Amplification and Electroforesis

Amplifikasi PCR dengan primer spesifik jeruk keprok menggunakan lima jenis primer spesifik berdasarkan [8] dengan menggunakan GoTaq Mix. Jumlah campuran reaksi yang akan di amplifikasi PCR sebanyak 25 µl. Adapun kondisi dalam siklus PCR yaitu dengan suhu predenaturasi 94°C selama 5 menit, diikuti oleh 32 siklus yang terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi 94 °C selama 1 menit, tahap berikutnya penempelan (annealing) pada suhu yang dioptimasi sesuai masing-masing primer selama 30 detik, kemudian tahap pemanjangan (elongasi) dengan suhu 72 °C selama 1 menit diakhiri dengan tahapan pemanjangan akhir suhu 72 °C selama 4 menit [9]. Hasil Amplifikasi PCR dilihat melalui gel agarose dengan 1 unit alat elektroforesis.

SSR Markers

Menggunakan 5 primer SSR dari Genetika sains Indonesia (GB-CU-133, GB-CU-038, GB-CU-182, GBCU- 104) dengan amplifikasi PCR dalam volume total 25µl.

Table 1. list of SSR primer sequence

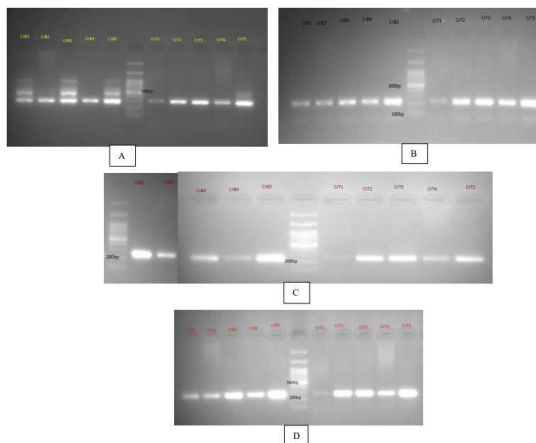
Locus	Sequences 5' to 3'	Repeat motif	Allele size range (bp)	Number of allele	PIC	GD
GB-CU-038	AACGACGGCATACTGC GAGTCCTCTCCCTGTCC	(AG)2(GA)4	310-342	8	0.450	0.564
GB-CU-182	GCTGATGCCAAATCGGAG GCCATTTCCTTTCCACC	(TC)11, (TG)5GG(TG)2	220-223	7	0.514	0.513
GB-CU-104	AAGGATGGGACTTCAATG GCCACCATTTACAAAGCA	(TTC)13	252-278	6	0.643	0.438
GB-CU-133	TGCAGCTCGTGTGTTC TGACACAACCTTGACCTTGTAC	(TG)2(T)6, (TG)5(GC)3	158-195	6	0.674	0.420

Scoring dan statistic

Estimasi kekerabatan didasarkan atas jumlah \ kesamaan pita yang teramplifikasi akan dianalisis dengan perangkat lunak Numerical Taxonomy And Multivariate Analysis System (NTSys). Hasil analisis disajikan dalam bentuk dendrogram menggunakan metode Unweighted Pair-Group With Arithme Average (UPGMA) [9].

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi DNA dari ke-10 sampel jeruk keprok selayar menggunakan Genom DNA mini Kit (plan) kemudian di uji kuantitas menggunakan Invitrogen untuk melihat adanya DNA jeruk keprok selayar pada isolasi DNA. Adapun hasil kuantitas dari sampel yang mewakili (CrB1 dan CrT1) yaitu 26.6 ng/ μ l. kemudian di amplifikasi menggunakan PCR dengan marker SSR (GB-CU-133, GB-CU-038, GB-CU-182, GB-CU-104) dapat difisualisasikan dengan gel agarose 0,8% menggunakan satu unit elektroforesis, berdasarkan primer SSR yang digunakan, dapat dilihat pada gambar 1.

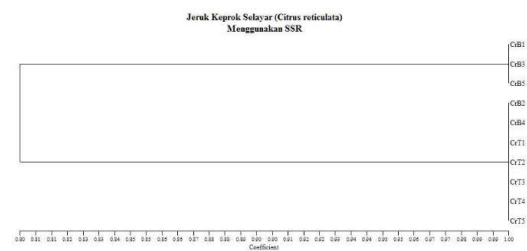


Gambar.1 profil SSR dari jeruk keprok selayar dari 2 lokasi pengambilan sampel menggunakan marker (M) 100 bp dan 4 primer yaitu (A) GB-CU 038, (B) BG-CU-182, (C) GB-CU-104, (D) GB-CU 098. Berdasarkan hasil visualisasi bahwa hasil dari isolasi DNA menggunakan Genomik DNA mini kit (plant) telah menghasilkan DNA dengan terlihatnya pita yang merupakan DNA genom dari tanaman jeruk keprok selayar. DNA genom selanjutnya melalui PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dari 4 primer SSR yang digunakan yaitu GB-CU-038, BG-CU-182, GB-CU-104, GB-CU-098, mampu mencetak beberapa pita DNA. Yang memiliki besaran yang beragam.

Hasil amplifikasi PCR dari Primer GB-CU-038 menghasilkan 1 pita polimorfik pada kisaran 342 bp dan 2 pita monomorfik pada kode sample CrB1, CrB3, dan CrB5 pada kisaran 480 bp dan 950 bp. Dari primer BG-CU-182 menghasilkan. Pita DNA polimorfik pada kisaran 223bp, primer GB-CU-104 menghasilkan pita DNA polimorfik pada kisaran 252bp dan primer menghasilkan pita DNA pada kisaran 298 bp.

Pita-pita DNA ini kemudian dianalisis untuk mengetahui jarak kekerabatan antar kedua lokasi jeruk keprok selayar yang diambil dari selayar dan di Bantaeng menggunakan aplikasi NTSYS dan disajikan dalam bentuk dendogram.

Tabel. 1. Dendogram jeruk keprok selayar (*Citrus reticulata*) menggunakan aplikasi NTSYS



Berdasarkan hasil amplifikasi PCR menggunakan marka SSR, dendogram dari dua lokasi pengambilan sampel Kabupaten Selayar (CrT1, CrT2, CrT3, CrT4, CrT5) dan Kabupaten Bantaeng (CrB1, CrB2, CrB3, CrB4, CrB5) dikonstruksi menggunakan UPGMA pada gambar 2. Struktur dendogram menunjukkan tingkat kemiripan dengan struktur susunan pohon filogenetik [10].

Pada dendogram nilai koefisien semakin mendekati angka 1 maka semakin rendah tingkat keragamannya dan semakin besar nilai similaritas semakin pendek level jarak hal ini menunjukkan banyak kesamaan antar variable [11] hal ini semakin dekat hubungan kekerabatan.

Dendogram pada koefisien 0,81 membagi menjadi dua grup meskipun tingkat keragamannya tidak begitu jauh akan tetapi terlihat tingkat perbedaan dari nilai koefisien. Dari grup pertama dapat dilihat bahwa perbedaan terletak pada lokasi pengambilan Kabupaten Selayar dengan kode CrB1, CrB3 dan CrB5 memiliki variasi yang sedikit berbeda berdasarkan nilai koefisien. Sedangkan sampel yang berasal dari Kabupaten Selayar dengan kode CrB1, CrB2, CrB3, CrB4, CrB5 memiliki kemiripan yang sama persis berdasarkan koefisien yang di peroleh yaitu 1, sedangkan sampel dengan kode CrB2 dan CrB4 memiliki keragaman persis dengan sampel yang berasal dari Kabupaten Selayar. Hal ini dikarenakan kebun budidaya yang ada di Kabupaten Bantaeng berasal dari Kabupaten Selayar namun pada perkebunan di Kabupaten Selayar beberapa pohon Jeruk Keprok selayar memungkinkan adanya mutase gen [12].

Peningkatan keragaman genetic tanaman dapat dilakukan melalui beberapa cara yaitu, inroduksi,



hibridisasi, seleksi bioteknologi dan mutase[13]. Keragaman genetic jeruk keprok dapat ditingkatkan dengan cara mutase[14]. Mutase merupakan perubahan-perubahan yang terjadi pada susunan gen/genom suatu tanaman[15].

Oleh karna itu perlunya peninkatan penelitian selanjutnya untuk mengetahui individu-individu dari sampel berdasarkan dendogram pada gambar 2 terdapat grup yang berbeda yang berasal dari Kabupaten Bantaeng terdapat 3 sample. Hal ini memungkinkan adanya perbedaan pada bagian DNA sampel tersebut.

Kesimpulan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keragaman genetic padajeruk keprok selayar yang berasal dari dua Kabupaten yaitu, Kabupaten Selayar dan Kabupaten Bantaeng. Dimana hasil dari penelitian ini berdasarkan data yang diolah oleh aplikasi NTSYS berupa dendogram menunjukkan nilai Koefisien 80% yang menunjukkan tingkat keragaman yang rendah, dan terlihat pada tiga sampel yang berasal dari Kabupaten Bantaeng Terlihat adanya perbedaan profil DNA.

Ucapan Terima Kasih

- [1] Muhammad H, Armiami, Dewayani W. 2003. Jeruk Keprok Selayar dan Upaya Pelestariannya. Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian. **22**: 87-94.
- [2] Sudirman H, BAsri A. 2013. The social and economic impact in the development of citrus farming keprok selayar (case study in Bontolangkasa Village, Bisappu District, Bantaeng Regency). **9**: 77-89
- [3] Badan Pusat Statistik. 2010. Statistik Indonesia, Jakarta.
- [4] Sumiasi I H, Arzam T S, Poerwanto R, Efendi D, Agusta A, Yuliani S. 2018. Study on the Accumulation of β -Cryptoxanthin Pigment to Induce Orange Color on Citrus Fruits in the Tropic. Journal IPB. **2**: 73-83
- [5] Guo, H.B., K.Y. Huang, T.S. Zhou, Q.H. Wu, Y.J. Zhang, Z.S. Lang. 2009. DNA isolation, optimization of ISSR-PCR system and primers screening of *Scutellaria baicalensis*. J. Med. Plant. Res. **3**: 898-901.
- [6] Santoso PJ, Granitia A, Indriyani NLP, Pancoro A, 2016. Analisis Lokus dan Keragaman Sumberdaya Genetik Durian (*Durio sp.*) Berdasarkan Marka Mikrosatelit. Jurnal Hortikultura. **26**(1):9-20.
- [7] Vanijajiva O, 2012. The Application of ISSR Markers in Genetic Variance Detection Among

Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Cultivars in The Nonthaburi Province. Procedia Engineering. **32**:155-159.

- [8] Zulfahmi, 2013. Penanda DNA Untuk Analisis Genetik Tanaman. Jurnal Agroteknologi. **3**:41-52.
- [9] Elcy G P S, Mahani M C, Park Y J, Noor N M. 2011. Simple Sequence Repeat (SSR) profiling of cultivated Limau Madu (*Citrus reticulata* Blanco) in Malaysia. Original article. **67**: 68-78.
- [10] Sharafi A A, Abkenar A A, Ali S. 2016. Genetic variation assessment of acid lime accessions collected from south of Iran using SSR and ISSR molecular markers. Physiol Mol Biol Plants. **22**: 87-95.
- [11] Wang X, Wang Z, Zhang S, Liu J, Wang X. 2018. Screening citrus SSR molecular marker primers. Advances in Engineering Research. **170**: 1713-1716.
- [12] Husain I, Purwito A, Husni A, Mutaqin HQ, Susanto S. 2016. Evaluation of Genetic Diversity of Putative Mutant MV1 Generation of Mandarine SoE (*Citrus reticulata* Blanco) Based on Morphology and ISSR Markers. **7**: 102-110.
- [13] Karyanti. 2013. Induksi keragaman kalus embriogenik untuk mendapatkan mutan putatif jeruk Keprok, Garut (*Citrus reticulata* L.) melalui iradiasi sinar gamma. [Tesis]. Institut Pertanian Bogor.
- [14] International Atomic Energy Agency. 2016. Induced Mutations and In Vitro Culture Techniques for Improving Crop Plant Resistance to Diseases. Grunbach Germany.
- [15] Medrano S H C, Espinosa M A G, Gonzalez M M R, Serafin C I. 2018. Identification of Mexican lemon hybrids using molecular markers SSR Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. **9**: 11-23.