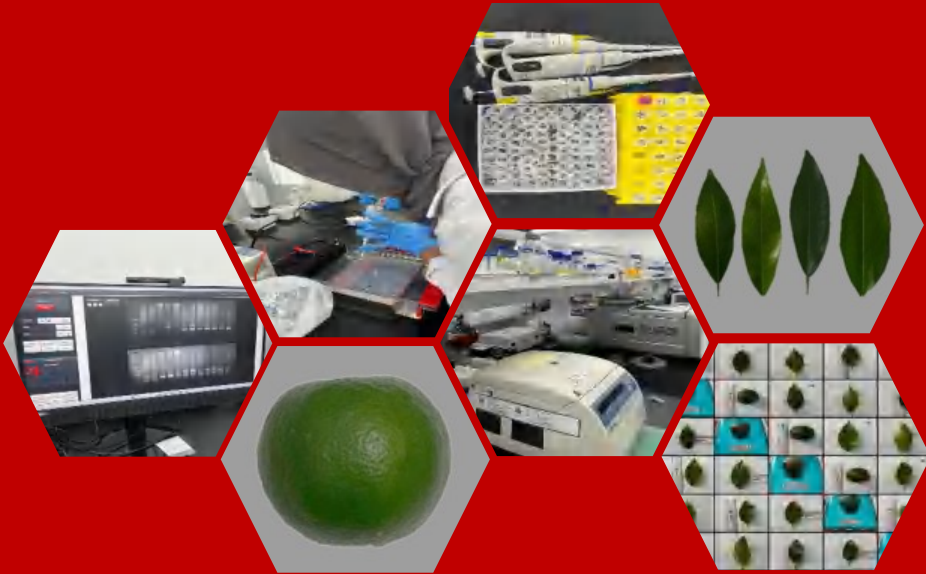


**ANALISIS KEKERABATAN JERUK KEPROK (*Citrus reticulata* L.) PADA 2  
(DUA) KETINGGIAN TEMPAT BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI  
DAN PENANDA MOLEKULER *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)**



**NUR ISLAMIAH ASMITA**

**G011 20 1036**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
DEPARTEMEN BUDIDAYA PERTANIAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2024**



**Optimization Software:  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)**



**ANALISIS KEKERABATAN JERUK KEPROK (*Citrus reticulata* L.) PADA 2  
(DUA) KETINGGIAN TEMPAT BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI  
DAN PENANDA MOLEKULER *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)**

**NUR ISLAMIAH ASMITA**  
**G011 20 1036**



**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
DEPARTEMEN BUDIDAYA PERTANIAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**



**Optimization Software:**  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

**ANALISIS KEKERABATAN JERUK KEPROK (*Citrus reticulata* L.) PADA 2  
(DUA) KETINGGIAN TEMPAT BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI  
DAN PENANDA MOLEKULER *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)**

**NUR ISLAMIAH ASMITA**

**G011 20 1036**



Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Agroteknologi

pada

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
DEPARTEMEN BUDIDAYA PERTANIAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**



Optimization Software:  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

# SKRIPSI

**ANALISIS KEKERABATAN JERUK KEPROK (*Citrus reticulata* L.) PADA 2 (DUA) KETINGGIAN TEMPAT BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI DAN PENANDA MOLEKULER *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)**

**NUR ISLAMIAH ASMITA**  
**G011 20 1036**

**Skripsi,**

**Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana pada Juni 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan**

**pada**

**Program Studi Agroteknologi  
Fakultas Pertanian  
Universitas Hasanuddin  
Makassar**

**Mengesahkan:**

**Pembimbing Utama,**

**Dr. Ir. Ifayanti Ridwan Saleh, SP, MP**  
**NIP.19740907 20121 2 001**

**Pembimbing Pendamping 1,**

**Prof. Dr. Ir. Elkawakib Syam'un, MP**  
**NIP. 19560318 198503 1 001**

**Pembimbing Pendamping 2**

**Yuliana Galih Dyan Anggraheni, MF**  
**NIP. 19850709 201401 2 001**

**Mengetahui**  
**Program Studi Agroteknologi**



**Optimization Software:**  
**[www.balesio.com](http://www.balesio.com)**

**Departemen Budidaya  
Pertanian**  
**Dr. Hari Isworo, SP., M.A**  
**NIP.19760508 200501 1 003**

## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul “Analisis Kekerbatan Jeruk Keprok (*Citrus reticulata* L.) Pada 2 (Dua) Ketinggian Tempat Berdasarkan Karakter Morfologi dan Penanda Molekuler *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)” adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Ir. Ifayanti Ridwan Saleh, SP, MP., Prof. Dr. Ir. Elkawakib Syam'un, MP dan Yuliana Galih Dyan Anggraheni, MP). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka skripsi ini. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 7 Juni 2024



METERAI  
TEMPEL  
AF04CALX188776102

Nur Islamiah Asmita  
NIM G011201036



## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan skripsi ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Ibu **Dr. Ir. Ifayanti Ridwan Saleh, SP, MP** sebagai pembimbing-1, Bapak **Prof. Dr. Ir. Elkawakib Syam'un, MP** sebagai pembimbing-2, dan Ibu **Yuliana Galih Dyan Anggraheni, MP** sebagai pembimbing-3. Saya mengucapkan berlimpah terima kasih kepada mereka atas bimbingannya kepada saya. Penghargaan yang tinggi juga saya sampaikan kepada kepada Ibu Dr. Ratih Asmana Ningrum selaku Kepala satuan kerja pusat riset rekayasa genetika atas kesempatan untuk menggunakan fasilitas dan peralatan di Laboratorium Genomik dan Lingkungan Cibinong. Terima kasih juga saya sampaikan kepada Ibu Astutiningsih di Dinas Pertanian Provinsi Jawa Barat atas bantuan dalam pencarian informasi data statistik.

Kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan RI, saya mengucapkan terima kasih atas beasiswa unggulan yang diberikan selama menempuh program pendidikan sarjana (S1). Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program sarjana serta para dosen yang telah memberikan ilmunya kepada saya.

Akhirnya, kepada kedua orang tua tercinta saya, Bapak **Tallak, S. Pd** dan Ibu **Sitti Fatimah, S. Pd** saya turut mengucapkan banyak terima kasih atas doa-doa yang dilimpahkan kepada saya demi kelancaran dalam menempuh pendidikan sarjana saya. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada seluruh keluarga saya atas motivasi dan dukungan yang diberikan. Terima kasih juga pada teman-teman seperjuangan saya dibangku SMA yaitu **The Genius One** dan juga teman saya semasa kuliah, **Hidrogen20, Bioteknologi 20, UKMB UH, Tayang** dan juga para kakak senior yang telah membantu dan membersamai saya dalam menempuh pendidikan sarjana.

Penulis,

Nur Islamiah Asmita



Optimization Software:  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## ABSTRAK

Nur Islamiah Asmita. **Analisis Kekerabatan Jeruk Keprok (*Citrus reticulata* L.) pada 2 (Dua) Ketinggian Tempat Berdasarkan Karakter Morfologi dan Penanda Molekuler *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)** (dibimbing oleh Ifayanti Ridwan Saleh, Elkawakib Syam'un dan Yuliana Galih Dyan Anggraheni).

**Latar belakang.** Persebaran tanaman jeruk keprok yang ditemukan saat ini dapat tumbuh secara alami atau melalui pembudidayaan, baik didaerah dataran rendah maupun dataran tinggi. Banyaknya spesies jeruk yang tersebar, maka penting untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara spesies jeruk yang ada di Indonesia yang dapat dikonstruksi melalui dendogram berdasarkan karakter morfologi dan penanda molekuler. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter tanaman jeruk keprok pada ketinggian tempat yang berbeda berdasarkan penanda morfologi dan penanda molekuler RAPD. **Metode.** Penelitian ini meliputi pengambilan sampel dari empat daerah dengan ketinggian 106 mdpl, 255 mdpl, 963 mdpl dan 988 mdpl, ekstraksi DNA dan analisis molekuler menggunakan program Ms. Excel serta software PAST dan STAR. **Hasil.** Dendogram berdasarkan karakter morfologi yang terbentuk, membagi sampel kedalam empat kelompok/*cluster* dengan sampel SL05 dan SL01 memiliki nilai similaritas terkecil yakni sebesar 0.01 dan memiliki kekerabatan terjauh dengan sampel lainnya. Sedangkan berdasarkan analisis molekuler sampel dengan kekerabatan terjauh dengan sampel lainnya terdapat pada sampel SM02. **Kesimpulan.** Karakteristik tanaman jeruk keprok berdasarkan karakter morfologi dan molekuler membentuk koefisien kemiripan yang berbeda. Secara morfologi, nilai kekerabatan tertinggi sebesar 0,59 atau 59% sedangkan secara molekuler, nilai kekerabatan tertinggi yakni sebesar 1 atau 100%. Hal ini menunjukkan bahwa kekerabatan jeruk keprok berdasarkan karakter morfologi tergolong sempit, sedangkan berdasarkan karakter molekuler kekerabatan yang terbentuk tergolong luas.

Kata kunci: persebaran; jeruk keprok; morfologi; molekuler; kekerabatan; dendogram





## ABSTRACT


Nur Islamiah Asmita. **Analysis of Tangerine (*Citrus reticulata* L.) Relatedness at 2 (two) Altitudes Based on Morphological Characteristics and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Molecular Markers** (supervised by Ifayanti Ridwan Saleh, Elkawakib Syam'un, and Yuliana Galih Dyan Anggraheni).

**Background.** The distribution of tangerine plants currently found can grow naturally or through cultivation, both in lowland and highland areas. Given the many citrus species that are distributed, it is important to understand the relatedness between the existing citrus species in Indonesia, which can be constructed through a dendrogram based on morphological characteristics and molecular markers. **Aim.** This study aims to determine the characters of tangerine plants at different altitudes based on morphological and RAPD molecular markers. **Methods.** This study includes sampling from four areas with altitudes of 106 masl, 255 masl, 963 masl and 988 masl, DNA extraction, and molecular analysis using Ms. Excel and the software PAST and STAR. **Results.** The dendrogram based on morphological characteristics divides the samples into four groups/clusters, with samples SL05 and SL01 having the smallest similarity value of 0.01 and the furthest relatedness to other samples. Meanwhile, based on molecular analysis, the sample with the furthest relatedness to other samples is SM02. **Conclusion.** The characteristics of tangerine plants based on morphological and molecular characteristics form different similarity coefficients. Morphologically, the highest relatedness value is 0.59 or 59%, while molecularly, the highest relatedness value is 1 or 100%. This indicates that the relatedness of tangerines based on morphological characteristics is relatively narrow, whereas based on molecular characteristics, the relatedness formed is relatively broad.

Keywords: distribution; tangerine; morphology; molecular; relatedness; dendrogram



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGANTAR.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar belakang.....	1
1.2. Landasan teori.....	2
BAB II METODE PENELITIAN.....	4
2.1. Tempat dan waktu.....	4
2.2. Bahan dan alat.....	4
2.3. Metode penelitian.....	4
2.4. Analisis data molekuler.....	7
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	9
3.1. Hasil.....	9
3.2. Pembahasan.....	28
BAB IV KESIMPULAN.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....	33
 .....	39
.....	42

## DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Primer RAPD amplifikasi DNA .....	7
2. Perhitungan PCR KIT .....	8
3. Tanaman jeruk keprok berdasarkan batang bawah.....	12
4. Karakter morfologi tanaman jeruk keprok berdasarkan tipe daun dan intensitas warna helai daun.....	13
5. Karakter morfologi tanaman jeruk keprok berdasarkan bentuk pelekatan daun, bentuk helai daun, bentuk ujung daun dan bentuk tepi daun .....	13
6. Karakter morfologi tanaman jeruk keprok berdasarkan bentuk buah, bentuk pangkal buah dan bentuk ujung buah.....	15
7. Data kualitatif jeruk keprok.....	16
8. Nilai similaritas 20 sampel jeruk keprok berdasarkan karakter morfologi .....	19
9. Hasil uji kualitas DNA jeruk keprokk sebelum purifikasi.....	20
10. Primer yang digunakan dan jumlah pita dna hasil amplifikasi genotipe jeruk keprok .....	22
11. Nilai similaritas 20 tanaman jeruk keprok berdasarkan karakter molekuler .....	29



## DAFTAR GAMBAR

Nomor urut		Halaman
1.	Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel.....	10
2.	Gambar 2. Bentuk daun jeruk keprok berdasarkan lokasi .....	14
3.	Gambar 3. Bentuk buah jeruk keprok berdasarkan lokasi .....	15
4.	Gambar 4. Dendogram kekerabatan 20 tanaman jeruk keprok berdasarkan karakter morfologi .....	18
5.	Gambar 5. Elektroforegram hasil optimasi primer dengan DNA GR06.....	21
6.	Gambar 6. Elektroforegram hasil optimasi primer dengan DNA GR06 .....	21
7.	Gambar 7. Elektroforegram hasil optimasi primer dengan DNA GR02 .....	21
8.	Gambar 8. Elektroforegram hasil optimasi primer dengan DNA GR02 .....	21
9.	Gambar 9 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPG 05.....	22
10.	Gambar 10 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPG 10.....	23
11.	Gambar 11 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPG 14 .....	23
12.	Gambar 12 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPG 17.....	23
13.	Gambar 13 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPAB 09 .....	24
14.	Gambar 14 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPX 01 .....	24
15.	Gambar 15 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPD 20.....	24
16.	Gambar 16 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPG 08.....	25
17.	Gambar 17 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPAB 10 .....	25
18.	Gambar 18 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPO 12.....	25
19.	Gambar 19 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPN 12.....	26
20.	Gambar 20 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPO 06.....	26
21.	Gambar 21 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPG 04.....	26
22.	Gambar 22 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPG 19.....	27
23.	Gambar 23 Elektroforegram amplifikasi DNA dengan primer OPG 03.....	27
24.	Gambar 24 Dendogram Kekerabatan 20 tanaman jeruk keprok berdasarkan er .....	28



**DAFTAR LAMPIRAN**

Nomor urut	Tabel	Halaman
1.	Data kuantitatif jeruk keprok .....	41

Nomor urut	Gambar	Halaman
1.	Dokumentasi pengamatan karakter morfologi jeruk keprok.....	43
2.	Dokumentasi kegiatan laboratorium.....	44





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Jeruk pada umumnya merupakan tanaman yang dapat digunakan dalam pengobatan tradisional. Selain itu, dapat digunakan sebagai bumbu masakan seperti jeruk purut dan lemon. Buah jeruk di Indonesia hingga saat ini masih didominasi oleh jeruk jenis siam yang berkisar antar 50-70%, jeruk jenis keprok 20% dan jeruk jenis lainnya sekitar 10%. Buah ini dapat dibudidayakan pada area dataran tinggi hingga dataran rendah dan merupakan kelompok buah yang banyak digemari oleh masyarakat dari kelompok anak-anak hingga orang tua. Tanaman jeruk dapat dipanen ketika telah berumur 3 tahun setelah tanam. Pengembangan tanaman ini terus dilakukan sehingga mampu menjadikan Indonesia sebagai salah satu produsen jeruk untuk jeruk jenis siam dan juga keprok (Ahmad et al., 2023).

Di Indonesia, banyak jenis jeruk yang dibudidayakan, termasuk jeruk Bali (*Citrus grandis*), jeruk manis (*Citrus sinensis*), jeruk lemon (*Citrus medica*), jeruk nipis (*Citrus aurantium*), jeruk purut (*Citrus hystrix*), dan jeruk keprok (*Citrus reticulata*). Jenis jeruk keprok yang paling umum adalah keprok garut dari Jawa Barat, keprok siompu dari Sulawesi Tenggara, keprok tejakula dari Bali, keprok batu 55 dari Batu, keprok madura dari Jawa Timur, keprok selayar dari Sulawesi Selatan, dan keprok soe dari Nusa Tenggara Timur (Balitjestro, 2012 dalam Hanif dan Zamzami, 2015).

Plasma nutfah jeruk memiliki keragaman genetik yang beragam, sehingga diperlukan peningkatan mutu tanaman jeruk melalui program pemuliaan tanaman. Namun, hingga saat ini koleksi plasma nutfah belum dikarakterisasi secara menyeluruh dan masih menggunakan cara sederhana yakni melalui karakterisasi morfologi dan fenologi. Karakterisasi morfologi merupakan teknik yang mudah dan cepat. Namun, teknik ini memiliki keterbatasan yang dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga akan memberikan hasil yang berbeda-beda tergantung lingkungan tempat tumbuhnya (Suparman, 2012 dalam Mahfudhoh, 2018). Persilangan, heterozigositas dan mutasi juga akan mempengaruhi karakter morfologi, sehingga tidak tepat untuk mendukung program pemuliaan tanaman (Yulianti, 2016).

Secara morfologi, penanda telah digunakan secara luas tetapi umumnya dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga sulit untuk mengamati perbedaan antara spesies yang berkerabat dekat. Oleh karena itu, keterbatasan penanda morfologi dapat diatasi dengan menggunakan teknik molekuler yang berbasis DNA. Salah satu teknik yang dapat digunakan adalah teknik RAPD yang merupakan salah satu teknik molekuler yang dapat digunakan dalam memecahkan permasalahan tersebut (Nikmah et al., 2016). Teknik RAPD tergolong mudah dilakukan, tidak memerlukan pengetahuan tentang latar belakang genom yang dianalisis, dan primer yang diperlukan sudah banyak dikomersialisasikan (Novita, 2013).

Berdasarkan uraian permasalahan di atas, maka perlu dilakukan analisis kekerabatan jeruk keprok (*Citrus reticulata* L.) pada 2 (dua) ketinggian tempat per morfologi dan penanda molekuler *Random Amplified*

**ori**

prok (*C. reticulata*) yang ditemukan saat ini dapat tumbuh baik melalui pembudidayaan yang telah ada sejak puluhan hingga alu. Asal mula penanaman jeruk jenis ini masih belum diketahui banyak orang. Mereka berasumsi bahwa jeruk *C. reticulata* ini bentuk peninggalan dari penduduk Belanda. Namun faktanya,



mereka mendatangkan berbagai jenis jeruk dari berbagai negara seperti Italia, Palestina dan Amerika. Hingga kini, terdapat beberapa jenis jeruk yang populer dikalangan masyarakat, yakni keprok garut, keprok batu dan siem (Martasari dan Arry, 2005).

Jeruk di 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, serta sebagai bumbu masakan seperti jeruk purut. *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 µg/g dan 46,17 µg/g daun kering Yulianti et al., 2016).

Jeruk keprok dataran tinggi maupun dataran rendah masing-masing memiliki manfaat terhadap perekonomian Indonesia dan juga sangat bermanfaat bagi kesehatan. Menurut Rahayu et al., (2020) jeruk keprok dataran rendah merupakan suatu komoditas yang perlu dikembangkan lagi, mengingat bahwa ketersediaan lahan dataran rendah yang lebih luas dibandingkan dataran tinggi. Dengan ketersediaan lahan tersebut memungkinkan pengembangan akan jeruk dataran rendah lebih ditingkatkan. Hal ini dikarenakan jeruk keprok dataran rendah memiliki peluang dalam substitusi jeruk impor di pasar buah nasional. Tanaman jeruk dataran rendah juga memiliki kandungan nutrisi dan bioaktif yang sangat bermanfaat bagi manusia.

Ketinggian tempat memiliki pengaruh terhadap produksi jeruk. Menurut Balitjestro (2019) dalam Nurmegawati et al., (2020) bahwa jeruk dapat berproduksi secara optimal jika ditanam di daerah dataran rendah <500 mdpl. Sedangkan sebagian lainnya dapat bereproduksi secara baik jika di tanam pada daerah dataran tinggi > 700 mdpl seperti jeruk keprok jenis garut. Oleh karena ketinggian tempat yang berbeda, maka secara tidak langsung akan berkaitan dengan suhu. Suhu akan sangat mempengaruhi fase-fase pertumbuhan pada tanaman jeruk dan hasil panen tanaman jeruk (Nurmegawati et al., 2020)

Dikarenakan banyak spesies, kultivar dan klon yang beragam, genus *citrus* adalah kelompok tanaman yang paling menguntungkan (Agisimanto et al., 2007). Beberapa spesies dan varietas jeruk termasuk dalam tiga kategori: jeruk segar karena cita rasanya yang kuat yang kaya akan mineral dan vitamin; jeruk untuk bahan makanan olahan; dan jeruk untuk farmasi, kosmetik, ornamental, dan agrokimia karena kandungan metabolit sekundernya yang tinggi. Jenis jeruk ketiga ini disebut jeruk fungsional karena mengandung bahan aktif yang memiliki manfaat kesehatan secara fisiologis, serta mineral dan vitamin (Yulianti et al., 2016).

Banyaknya spesies jeruk yang tersebar, maka pentingnya mengetahui hubungan kekerabatan antara spesies jeruk yang ada di Indonesia. Hubungan kekerabatan digunakan sebagai dasar untuk mengembangkan genotip yang teridentifikasi diperlukan untuk menentukan hubungan kekerabatan pada. Dengan mengidentifikasi tanaman, seseorang dapat secara akurat mengetahui kekerabatan suatu tanaman berdasarkan kemiripan yang ada (Yulianti et al., 2015).

Hubungan kekerabatan dapat direkonstruksikan melalui dendrogram dengan didasarkan karakter morfologi dan penanda molekuler. Karakter morfologi akan dalam banyak penelitian tentang hubungan kekerabatan.





Namun hasilnya kurang akurat karena perbedaan antar spesies yang berkerabat dekat sulit diamati. Sedangkan karakter secara molekuler telah mengalami perkembangan pesat, bahkan sampai menggunakan software yang memanfaatkan perkembangan teknologi sekuen DNA (Borakaj, 2015 *dalam* Ashan, 2021).

Penanda molekuler merupakan penanda atau marker yang menggunakan informasi genetik melalui DNA yang di peroleh pada bagian-bagian tertentu pada tanaman atau populasi. Penanda molekuler dapat diartikan sebagai upaya untuk membedakan karakteristik tanaman pada tingkat gen. Penanda molekuler memungkinkan untuk melakukan karakterisasi keragaman genetik. Sehingga membantu untuk pemuliaan dan ahli genetika untuk menganalisis genom tanaman. Terdapat berbagai jenis penanda molekuler yang dapat digunakan, misalnya ALFP, SSR, RFLP, SNP, SCAR dan RAPD (Basundari, 2016).

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) merupakan cara untuk menganalisis variabilitas genetik melalui amplifikasi DNA genom suatu tanaman menggunakan primer acak tunggal. Variabilitas genetik tanaman dilihat berdasarkan polimorfisme pita DNA yang berhasil di amplifikasi. Prinsip kerja RAPD adalah berdasarkan perbedaan amplifikasi PCR pada sampel DNA dari sekuen oligonukleotida pendek yang secara genetik merupakan penanda dominan Primer RAPD dengan ukuran panjang biasanya 10 nukleotida. RAPD tidak membutuhkan informasi awal sekuens suatu spesies, oleh sebab itu RAPD dapat diaplikasikan pada hampir semua jenis tanaman (Langga et al, 2012).

Kelebihan metode RAPD yakni, dapat digunakan untuk tanaman yang masih tahap awal karakterisasi ataupun klasifikasi akibat belum tersedianya *whole genom* suatu tanaman, kuantitas DNA yang dibutuhkan sedikit, hemat biaya, mudah dilakukan, cepat memberikan hasil, menghasilkan polimorfisme pita DNA dalam jumlah banyak, tidak memerlukan pengetahuan tentang latar belakang genom yang dianalisis dan primer yang diperlukan sudah banyak dikomersialisasikan sehingga mudah diperoleh. Kelemahan metode RAPD yakni, tingkat reproduksibilitas pola marka dari laboratorium ke laboratorium berbeda dan antara hasil percobaan dalam laboratorium itu sendiri yang sama, sangat sensitif terhadap variasi dalam konsentrasi DNA, dan memerlukan konsentrasi primer siklus suhu yang optimal pada saat pengujian (Novita, 2013).

### 1.3 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang penelitian, maka hipotesis dari penelitian ini yakni:

1. Bagaimana perbandingan morfologi jeruk keprok berdasarkan ketinggian tempat yang berbeda?
2. Bagaimana karakter molekuler jeruk keprok yang terbentuk berdasarkan ketinggian tempat yang berbeda?



#### Kegunaan

penelitian ini, yaitu untuk mengetahui karakter tanaman jeruk an tempat yang berbeda berdasarkan penanda morfologi dan RAPD. Adapun kegunaan penelitian ini yakni sebagai bahan penelitan dan pemulia tanaman terkait genotipe-genotipe jeruk an genetik tanaman.

## BAB II BAHAN DAN METODE

### 2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel penelitian diambil dari beberapa ketinggian tempat yang berbeda yakni dataran rendah meliputi Kabupaten Kepulauan Selayar (255 m dpl) dan Kabupaten Sumedang (106 m dpl) serta dataran tinggi meliputi Kota Batu (988 m dpl) dan Kabupaten Garut (963 m dpl). Analisis molekuler dilaksanakan di Laboratorium Genomik, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Bogor, Jawa Barat. Penelitian berlangsung selama 4 bulan yakni November 2023 hingga Februari 2024.

### 2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gunting, kamera ponsel, tabung mikro steril ukuran 2 mL dan 1,5 mL, pipet mikro (10  $\mu$ l, 100-200  $\mu$ l dan 1000  $\mu$ l), rak tube, gelas ukur, sentrifuse, lemari pendingin/kulkas, tabung PCR (250  $\mu$ l), tip pipet (ukuran 10  $\mu$ l, 100-200  $\mu$ l dan 1000  $\mu$ l), Veriti 96 Cycler Termal, Tissue Lyser II, perlengkapan elektroforesis gel agarose (cetakan dan tangki elektroforesis), wadah plastik untuk pewarnaan DNA, Gel DOC UVITEC Camridge, NanoDrop One/Onec Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, software PAST dan STAR.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 15 primer RAPD, silika gel, nitrogen cair, buffer ekstraksi CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*), PVP (*Polyvinyl pyrrolidone*) 4%, Merchптоetanol 0,5%, Chloro:iso (24:1), isopropanol/etanol, etanol 70% dingin, 3M Natrium asetat, RNase, Gel agarose, TAE 1x, loading dye, Florosafe, 100 bp Ladder DNA, Es, ddH<sub>2</sub>O, Primer, HS Red PCR MIX dan DNA template.

### 2.3 Metode Penelitian

#### 2.3.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel ini dilakukan pada daerah dataran tinggi dan juga dataran rendah dengan umur pohon  $\pm$ 3-10 tahun atau lebih. Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *simple random sampling* yaitu cara pengambilan sampel dimana setiap anggota populasi memiliki peluang yang sama untuk dipilih sebagai sampel.

Pengambilan sampel didokumentasikan menggunakan aplikasi kamera yang telah didukung fitur koordinat. Sampel daun yang diambil dan digunakan adalah daun ketiga hingga daun kelima dari pucuk yang masih muda dan sehat. Daun muda yang telah diambil kemudian disimpan dalam plastik kedap udara yang telah diberi label sampel dan silika gel. Selanjutnya, seluruh sampel tanaman jeruk keprok dilakukan pengamatan karakter morfologi.

#### 2.3.2 Pengamatan Karakter Morfologi

Karakter morfologi dapat dilakukan dengan bantuan deskriptor tanaman (*Descriptors for citrus*) (Mahfudhoh, 2018). Bagian jeruk keprok yang digunakan secara morfologi adalah daun dan buah. Karakter yang diamati meliputi: letak batang bawah, tipe daun, intensitas warna helai daun, bentuk tulang helai daun, bentuk tepi daun, bentuk sayap daun, bentuk buah, bentuk pangkal buah dan bentuk ujung buah. Adapun data yang diambil dari pengamatan panjang helai daun, lebar helai daun, panjang



sayap daun, lebar sayap daun, diameter buah, panjang buah, berat buah dan diameter buah dan diameter batang.

### 2.3.3 Ekstraksi DNA Jeruk

Sampel DNA di ekstraksi menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) dalam Ashan (2021) yang telah di modifikasi. Sampel berasal dari daun muda, dimana terdiri atas tiga tahapan, yakni ekstraksi, presipitasi dan purifikasi. Sampel daun diekstraksi menggunakan nitrogen cair dan dihaluskan menggunakan alat *Tissue Lyser*. Penambahan 1000 µl buffer ekstraksi CTAB atau *Cetyl trimethylammonium bromide* pada sampel daun menggunakan tube berukuran 2 ml. Inkubasi sampel pada suhu 65°C selama 60 menit dan dilakukan *invert* setiap 20 menit agar terjadi homogenisasi. Penambahan 500 µl *chloroform: Isoamylalcohol* (24:1). Sampel disentrifuse pada kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipindahkan pada tabung baru. Penambahan larutan 3M Natrium asetat 60 µl. Sedangkan penambahan larutan isopropanol dingin sebanyak 500 µl. Inkubasi sampel pada suhu -20°C selama 24 jam untuk mengendapkan DNA. Selanjutnya, disentrifuse pada kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit.

Apabila pelet telah terbentuk, selanjutnya supernatan dibuang dan pelet yang tersisa didasar tube di bilas menggunakan 500 µl ethanol 70% dingin. Sampel kemudian di sentrifuse pada 11.000 rpm selama 15 menit. Supernatan kembali dibuang dan pelet yang terbentuk kemudian dikeringkan menggunakan mesin *concentrat*. Penambahan RNase sebanyak 100 µl, sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Sampel DNA selanjutnya dapat diuji kuantitas maupun kualitasnya atau disimpan pada suhu -20°C.

### 2.3.4 Uji Kuantitatif DNA dengan NanoDrop One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer

Nilai kemurnian DNA dapat ditentukan menggunakan perbandingan *Optical Density* (OD) larutan pada berbagai macam gelombang dengan menggunakan spektrofotometer. Tingkat kemurnian DNA dikatakan baik jika nilai rasio *Optical Density* (OD) 260/280 nm yang diperoleh antara 1,8 - 2,0

### 2.3.5 Uji Kualitas DNA dengan Elektroforesis pada Agarose 1%

Penyiapan gel agarose 1% (100 mL), dimana 1/100 gel agarose x 100 mL sehingga didapatkan 1g. Agarose dilarutkan Bersama larutan 100 mL TAE menggunakan microwave. Gel yang telah polimerisasi sempurna dan membeku diletakkan tangki elektroforesis. Penambahan larutan DNA sebanyak 10 µL dan telah dicampurkan loading dye sebanyak 2 µL di atas parafilm atau mikropipet 0,5 – 10 µL. Kontrol standar lambda DNA diinjeksikan pada posisi sumur pertama. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama 35 menit. Pewarnaan DNA menggunakan larutan floresafe selama 20 menit. Selanjutnya, gel diletakkan di atas *Gel Doc* dan visualisasi DNA dengan menggunakan kamera.



### an DNA Jeruk

DNA menggunakan perhitungan:

$$V1. M1 = V2. M2$$

ok yang harus diambil (µL)

A stok (ng/ µL)

V2 = Volume larutan kerja yang akan dibuat ( $\mu\text{L}$ )

M2 = Konsentrasi larutan kerja ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )

### 2.3.7 Amplifikasi DNA Jeruk Dengan Veriti 96 Thermal Cyclers

Sebanyak 48 primer RAPD dicoba dalam reaksi PCR dengan metode RAPD dan selanjutnya dilakukan seleksi primer yang kemudian akan digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA jeruk. Adapun nama primer dan urutan basa disajikan pada tabel 1.

**Tabel 1.** Primer RAPD amplifikasi DNA

No.	Kode Primer	Urutan Basa 5' – 3'	Referensi
01	OPA 01	CAG GCC CTT C	(Abdein et al., 2022)
02	OPA 02	TGC CGA GTC G	(Mutiarasari et al., 2022)
03	OPA 07	GAA ACG GGT G	(Al-Khayri et al., 2022)
04	OPA 08	GTG ACG TAG G	(Abdein et al., 2022)
05	OPA 10	GTG ATC GCA G	(Al-Khayri et al., 2022)
06	OPA 11	CAA TCG CCG T	(Larekeng et al., 2019)
07	OPA 12	TCG GCG ATA G	(Fernih et al., 2018)
08	OPA 13	CAG CAC CCA C	(Wahyudi et al., 2020)
09	OPA 14	TCT GTG CTG G	(Wahyudi et al., 2020)
10	OPA 15	TTC CGA ACC C	(Larekeng et al., 2019)
11	OPA 16	AGC CAG CGA A	(Wahyudi et al., 2020)
12	OPA 17	GAC CGC TTG T	(Wahyudi et al., 2020)
13	OPA 18	AGG TGA CCG T	(Fadly Makmur et al., 2020)
14	OPA 19	CAA ACG TCG G	(Wahyudi et al., 2020)
15	OPG 03	GAG CCC TCC A	(Hamouda et al., 2022)
16	OPG 04	AGC GTG TCT G	(Maleita et al., 2016)
17	OPG 05	CTG AGA CGG A	(Maleita et al., 2016)
18	OPG 08	TCA CGT CCA C	(Tewari et al., 2022)
19	OPG 10	AGG GCC GTC T	(Muhajirah et al., 2021)
20	OPG 11	TGC CCG TCG T	(Tewari et al., 2022)
21	OPG 14	GGA TGA GAC C	(Majumder et al., 2019)
22	OPG 17	ACG ACC GAC A	(Majumder et al., 2019)
23	OPG 19	GTC AGG GCA A	(Fadly Makmur et al., 2020)
24	OPAB 09	GGG CGA CTA C	(Huseynov et al., 2022)
25	OPAB 10	TTC CCT CCC A	(Saclain et al., 2016)
26	OPO 06	CCA CGG GAA G	(Mira et al., 2020)
27	OPO 12	CAG TGC TGT G	(Salem et al., 2021.)
28	OPX 01	CTG GGC ACG A	(Raheem Lateef Al-Awsi et al., 2018)
29	OPX 04	CCG CTA CCG A	(Vasht et al., 2019)
30	OPN 04	ACC AGG GGC A	(Singh & Barkule, 2018)
31	OPN 06	GAG ACG CAC A	(Eid, 2019)
32	OPN 07	TGC CGG CTT G	(Peilouw et al., 2022)
33	OPN 08	ACA ACT GGG G	(Eid, 2019)
34	OPN 09	CAC AGA CAC C	(Peilouw et al., 2022)
35	OPN 10	ACC CGG TCA C	(Larekeng et al., 2019)
36	OPN 11	CTC ACC GTC C	(Bhuiyan et al., 2019)
37	OPN 12	AAA GCT GCG G	(Fadly Makmur et al., 2020)
38	OPN 13	CCT CTC GAC A	(Kahnouji et al., 2017)



39	OPJ 08	CAT ACC GTG G	(Kahnouji et al., 2017)
40	OPJ 09	TGA GCC TCA C	(Mohammed & Mohamed, 2019)
41	OPJ 10	AAG CCC GAG G	(Mamatha et al., 2017)
42	OPJ 11	ACT CCT GCG A	(Kahnouji et al., 2017)
43	OPJ 12	GTC CCG TGG T	(Kahnouji et al., 2017)
44	OPJ 13	CCA CAC TAC C	(Majeed et al., 2018)
45	OPJ 16	CTG CTT AGG G	(Kahnouji et al., 2017)
46	OPJ 17	ACG CCA GTT C	(Narasimhulu et al., 2013)
47	OPJ 18	TGG TCG CAG A	(Mamatha et al., 2017)
48	OPJ 19	GGA GAC CAC T	(Pangestika et al., 2021)

Untuk setiap tabung PCR diperkirakan berisi 10  $\mu$ l. perhitungan pereaksi PCR disajikan pada tabel 2.

**Tabel 2.** Perhitungan PCR KIT

No.	Komponen PCR	Volume ( $\mu$ l)
1.	Hs Red PCR MIX	5 $\mu$ L
2.	Primer	1 $\mu$ L
3.	DNA	1 $\mu$ L
4.	ddH <sub>2</sub> O	3 $\mu$ L

Reaksi PCR dengan menggunakan Veriti 96 Thermal Cycler selama 35 siklus. PraPCR pada suhu 93 °C selama 3 menit, kemudian diikuti oleh 35 siklus yang terdiri atas denaturasi 30 detik pada suhu 92°C, penempelan primer 35 detik pada suhu 35°C, dan 1 menit pemanjangan pada suhu 72°C. Setelah 45 siklus selesai, kemudian diikuti pasca PCR 10 menit pada suhu 72°C dan pendinginan pada suhu 4°C.

### 2.3.9 Uji Kualitas Produk PCR dengan Elektroforesis pada Agarose 1%

Prosedur yang digunakan sama dengan uji kualitas DNA, namun pada produk PCR, diinjeksikan 100bp DNA Ladder pada posisi sumur pertama, tengah dan akhir.

## 2.4 Analisis Data Molekuler

### 2.4.1 Skoring Lokus

Skoring pita DNA dilakukan terhadap *band* yang muncul dengan pemberian skoring 0 dan 1. 0 jika tidak ada *band* yang muncul, sedangkan 1 jika terdapat *band* yang muncul. Skoring data biner dilakukan menggunakan program Ms. Excel 2016.

### 2.4.2 Analisis Kluster dengan Software PAST dan STAR

Data yang diperoleh dari hasil skoring elektroforesis pada RAPD berupa data dilakukan *cluster analysis* dengan teknik berhierarki yang ada di PAST (*Paleontological Statistic*). Ukuran derajat jarak kemiripan yang diamati berdasarkan koefisien kemiripan (*similarity coefficient*) dengan menggunakan metode *Unweight Pairwise* (*UPGMA*). Sedangkan dalam software STAR, analisis dilakukan dengan metode *single linkage* dengan koefisien kemiripan yang menggunakan koefisien Gower.



Estimasi kemiripan genetik diperoleh berdasarkan jumlah pita yang memiliki kesamaan. Pengelompokan data matriks dan pembuatan dendogram dilakukan dengan metode UPGMA. Hasil analisis kekerabatan berdasarkan karakter morfologi dan penanda molekuler disajikan dalam bentuk dendogram.

