

RENCANA PENELITIAN TIM PENELITI (RPTP)

PENGEMBANGAN METODE SELEKSI BERBASIS MARKA MOLEKULER (*MARKER ASSISTED SELECTION*) UNTUK PERCEPATAN PROGRAM PEMULIAAN TANAMAN BUAH TROPIKA



Dr. ELLINA MANSYAH MP

BALAI PENELITIAN TANAMAN BUAH TROPIKA

**PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN HORTIKULTURA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
KEMENTERIAN PERTANIAN
2015**

LEMBAR PENGESAHAN

1. Judul RPTP : Pengembangan metode seleksi berbasis marka molekuler (*Marker Assisted Selection*) untuk percepatan program pemuliaan tanaman buah tropika
2. Unit Kerja : Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika
3. Alamat Unit Kerja : Jl. Raya Solok–Aripan, Km 8, PO Box 5, Solok 27301, Sumatera Barat
4. Sumber Dana : DIPA Tahun 2015
5. Status Penelitian (L/B) : Baru
6. Penanggung Jawab
 - a. Nama : Dr. Ellina Mansyah, MP
 - b. Pangkat/golongan : Pembina / IVa
 - c. Jabatan : Peneliti Madya
7. Lokasi SumateraBarat, Jawa Barat, dan Jawa Timur
8. Agroekosistem : Rendah kering dan rendah basah
9. Tahun dimulai : 2015
10. Tahun selesai : 2017
11. Output tahunan :
 1. Masing-masing satu kandidat gen yang berkaitan dengan ukuran buah dan tahan rontok pada mangga
 2. Dua kandidat gen yang berkaitan dengan rasa sepat dan tidak sepat pada salak
 3. 25 data sekuen fragmen DNA polimorfik pada manggis
 4. Masing-masing satu kandidat gen penanda warna daging buah kuning dan ukuran biji kecil pada durian
 5. Publikasi minimal 25 data sekuen yang diperoleh pada data base genBank
12. Output akhir : Satu paket marka DNA untuk deteksi genotipe mangga tahan rontok dan ukuran buah besar, genotipe durian dengan daging buah kuning dan berbiji kecil, genotipe manggis tanpa getah kuning, genotipe salak sepat dan non sepat sebagai *markerassisted selection* dalam pemuliaan tanaman buah
11. Biaya : Rp.219.000.000,00

Koordinator Program,

Dr. Ir. Ellina Mansyah, MP
NIP. 196304231991032001

Mengetahui,
Kepala Pusat Penelitian dan
Pengembangan Hortikultura

Dr.Ir. M. Prama Yufdy, MSc
NIP. 195910101986031002

Penanggung Jawab RPTP,

Dr. Ir. Ellina Mansyah, MP
NIP. 196304231991032001

Kepala Balai Penelitian
Tanaman Buah Tropika,

Dr. Ir. Mizu Istianto, MP
NIP. 196612301993031003

RINGKASAN

1. Judul : Pengembangan metode seleksi berbasis marka molekuler (*Marker Assisted Selection*) untuk percepatan program pemuliaan tanaman buah tropika
2. Unit Pelaksana : Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika
3. Lokasi : Sumatera Barat, Jawa Barat, Jawa Timur
4. Zona Agroekologi : Dataran rendah basah - kering
5. Status
 - a. Baru : Baru
 - b. Lanjutan (tahun) :
6. Tujuan
 - a. Jangka Pendek :
 1. Mendapatkan minimal masing-masing satu kandidat gen yang berkaitan dengan ukuran buah dan tahan rontok pada mangga
 2. Mendapatkan minimal dua kandidat gen yang berkaitan dengan rasa sepat pada salak
 3. Mendapatkan minimal 25 data sekuen fragmen DNA polimorfik pada manggis
 4. Mendapatkan masing-masing satu kandidat marka molekuler penanda warna daging buah kuning dan ukuran biji kecil pada durian
 5. Publikasi minimal 25 data sekuen yang diperoleh pada data base genBank
 1. Jangka panjang : Mendapatkan satu paket marka DNA untuk deteksi genotipe mangga tahan rontok dan ukuran buah besar, genotipe durian dengan daging buah kuning dan berbiji kecil, genotipe manggis tanpa getah kuning, genotipe salak sepat dan non sepat sebagai *markerassisted selection* dalam pemuliaan tanaman buah
7. Keluaran yang diharapkan
 - a. Jangka Pendek :
 1. Masing-masing satu kandidat gen yang berkaitan dengan ukuran buah dan tahan rontok pada mangga
 2. Dua kandidat marka gen yang berkaitan dengan rasa sepat pada salak
 3. 25 data sekuen fragmen DNA polimorfik pada manggis
 4. Masing-masing satu kandidat marka molekuler penanda warna daging buah kuning dan ukuran biji kecil pada durian
 5. Publikasi minimal 25 data sekuen yang diperoleh pada data base genBank
 - b. Jangka Panjang : Satu paket marka molekuler untuk deteksi genotipe mangga tahan rontok dan ukuran buah besar, genotipe durian dengan daging buah kuning dan

berbiji kecil, genotipe manggis tanpa getah kuning, genotipe salak sepat dan non sepat sebagai *markerassisted selection* dalam pemuliaan tanaman buah

8. Hasil yang diharapkan

a. Manfaat

1. Mempercepat proses seleksi varietas tanaman buah sesuai ideotipe
2. Meningkatkan akurasi kegiatan identifikasi dan seleksi sumberdaya genetik tanaman buah dengan penggunaan marka molekuler spesifik.
3. Menunjang peningkatan kualitas tanaman buah melalui penyediaan marka seleksi varietas
4. Melindungi sumberdaya genetik tanaman buah Indonesia dengan menyediakan data sidik jari DNA
5. Peningkatan jumlah publikasi pada jurnal nasional / internasional

b. Dampak

: Menghemat waktu, biaya, dan tenaga, dalam proses pemuliaan tanaman buah yang berumur panjang

9. Diskripsi metodologi

: Kegiatan 1. Identifikasi marka molekuler untuk seleksi genotipe manggis tahan rontok dan ukuran buah besar.

Sifat tahan rontok diduga berasosiasi dengan aktifitas gen di daerah abscision zone (AZ) dari pedisel (tangkai buah), beberapa diantaranya gen yang mengkode protein polygalacturonase 2 (PG2) dan JOINTLESS. Ukuran buah diduga berasosiasi dengan aktifitas gen FAS (Yabby-like TF) yang pada tomat dapat meningkatkan jumlah lokul sehingga ukuran buah menjadi lebih besar

Kegiatan 2. Isolasi dan karakterisasi fragmen DNA polimorfik dan monomorfik pada plasmanutfah manggis Indonesia (*Garcinia mangostana* L.)

Fragmen DNA yang telah diisolasi selanjutnya dikloning menggunakan kloning kit dan sel kompeten di Laboratorium Molekuler Balitbu Tropika, kemudian dilanjutkan dengan analisis sekuensing di Laboratorium BB-Biogen atau pada institusi yang melayani analisis sekuensing

Kegiatan 3. Identifikasi marka SSR terpaut karakter daging buah warna kuning dan biji kempes pada durian

Menggunakan metode Bulked pseudo-Segregant Analysis-BpSA)

Kegiatan 4. Identifikasi dan karakterisasi marka SNP untuk seleksi varietas unggul salak tanpa rasa sepat

Pendekatan melalui isolasi dan karakterisasi gen LAR dan ANR pada tanaman salak dan kerabatnya, sampai dengan diperolehnya informasi urutan basa nukleotida (sekuen), dan identifikasi situs-situs SNP pada fragmen gen tersebut. Pembuatan marka single nucleotide amplified polymorphism (SNAP), seleksi primer SNAP, pengujian dan validasi marka SNAP akan dilakukan pada kegiatan penelitian TA 2016.

Publikasi data pada geneBank

Menggunakan perangkat lunak Sequin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Sequin/>).

- | | |
|----------------------|-------------------------|
| 10. Jangka Waktu | : 3 tahun |
| 11. Anggaran / tahun | : 219.000.000,00 / 2015 |

SUMMARY

1. Title : Development of Marker Assisted Selection to Accelerate Tropical Fruit Breeding Program
2. Implementation Unit : Indonesian Tropical Fruit Research Institute
Jl. Raya Solok–Aripan, Km 8, Solok, PO Box 5 Solok
27301, West Sumatera
3. Location : West Sumatera, West Java, and East Java.
- A Agro ecological Zone : Wet low land
5. Status
 - a. New : New
 - b. Continue (Year) :
6. Objectives
 - a. Short terms (2015) :
 1. To find out at least one gene candidate associated to the resistency to fruit drop and large fruit size on mango, respectively
 2. To find out at least twogene candidates associated to astringent and non-astringent characters on salacca.
 3. To find out at least 25 sequen data of polymorphic DNA fragments on mngosteen
 4. To find out at least one candidate of molecular marker to detect yellow flesh colour and one for seedless trait on durian
 5. Publication at least 25 sequence data on geneBank database
- D End of the project (2017) : To find out DNAmarkersassociated toresistency to fruit drop andlarge fruit size on mango, yellow flesh and small seeds in durian, non-gamboge onmangosteen, and astringent and non astringent on salacca
7. Expected output
 - a. Short terms (2015) ::
 1. One gene candidate associated to the resistency to fruit drop and large fruit size on mango, respectively
 2. Twogene candidates associated to astringent and non-astringent characters on salacca.
 3. 25 sequence data of polymorphic DNA fragments on mangosteen
 4. One candidate of molecular marker to detect yellow flesh colour and one for seedless trait on durian
 5. Publication at least 25 sequence data on geneBank database
 - b. End of the project (2017) : DevelopspecificDNAmarkersassociated to resistancy to fruit drop andlarge fruit size on mango, yellow flesh and small seeds on durian, non-gamboge disorder on mangosteen, and astringent and non astringent on salaccaasmarkerassisted selectionin fruit breeding.

8. Expected outcome
- a. Potential benefit : 1. Accelerating the selection process in accordance to ideotype of fruit varieties.
 2. Improving accuracy of the identification and selection of fruit genetic resources by using specific molecular markers.
 3. Improving fruit quality by providing markers for variety selection
 4. Protecting Indonesian fruit genetic resources by DNA fingerprint data
 5. Increasing number of publications in national/ International journals
- b. Potential impact : Save time, cost, labour, and space in the process of breeding the long-lived fruit

9. Description of Methodology : **1. Identification of molecular marker for selecting mango variety based on fruit size and resistancy to fruit drop**

Resistancy to fruit drop estimated through the gene in abscission zone (AZ) of pedicel which was associated with protein polygalacturonase 2 (PG2) and JOINTLESS. Fruit size were assessed through gene FAS (Yabby-like TF) in tomato

2. Isolation and characterization of molecular marker on mangosteen (*Garcinia mangostana* L.)

The activities including isolating, cloning, and sequencing of DNA fragment found in 10 mangosteen accessions from different location in Indonesia.

3. Identification of SSR markers for yellow flesh and seedless traits in durian

The research was conducted by using Bulked pseudo-Segregant Analysis-BpSA) on 20 durian accessions different in flesh colour and seed size

4. Identification of molecular markers LAR and ANR gene on salacca species.

The activities including design of marka single nucleotide amplified polymorphism (SNAP), primer selection and validation on 10 salacca genotypes different in astringency trait

The general procedures of this research are:

1. DNA extraction and Purification
2. Primer design
3. Optimization PCR condition
1. DNA Amplification by PCR analysis using specific or degenerate primers
2. Isolation Specific DNA fragments
 - Cutting specific DNA fragments from gel electrophoresis
 - Purification of DNA fragments from electrophoresis
 - Ligase the fragments onto plasmids and cloning
3. Sequencing analysis of specific DNA fragments at ICABIOGRAD (Indonesian Center of Biotechnology and Genetic Resources of Agriculture and Development)
4. Sequence data publication on geneBank using software Sequin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Sequin/>).

10. Duration : 3 years

11. Budget / Fiscal Year : Rp. 219.000.000,- / 2015

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Perakitan varietas secara konvensional pada tanaman tahunan memerlukan waktu yang panjang yaitu sekitar 7 tahun untuk satu generasi. Dengan cara ini seleksi baru dapat dilakukan ketika tanaman telah berbuah, minimal 4 sampai 5 tahun setelah tanam. Salah satu terobosan yang dapat dilakukan adalah dengan memanfaatkan kemajuan dalam bidang genetika molekuler. Penelitian di bidang ini memusatkan perhatian pada DNA yang terdapat dalam inti sel makhluk hidup dan merupakan molekul pembawa informasi genetik. Dengan diketahuinya urutan basa DNA komoditas yang dipelajari, segmen-segmen DNA yang mengkode sifat-sifat unggul akan dapat dipetakan dan digunakan sebagai marka untuk pemandu seleksi atau Marker Assisted Selection (MAS). Teknologi ini dapat mempersingkat waktu pemuliaan melalui seleksi pada fase dini (di pembibitan), menghemat biaya, tenaga, dan ruang.

Salah satu visi dan misi Badan Litbang Pertanian adalah menjadi lembaga penelitian dan pengembangan pertanian berkelas dunia yang menghasilkan dan mengembangkan inovasi teknologi pertanian untuk mewujudkan pertanian industrial unggul berkelanjutan berbasis sumberdaya lokal". Kegiatan ini dapat mempercepat pencapaian visi dan misi tersebut melalui seleksi sumberdaya genetik lokal tanaman buah Indonesia untuk dimanfaatkan dalam memenuhi kebutuhan pangan, dan pembangunan pertanian bioindustri berkelanjutan.

Marka morfologi berdasarkan kepada pengamatan langsung terhadap karakter fenotipik tanaman. Marka ini telah banyak digunakan sebagai dasar studi genetik dan metode praktis untuk pemuliaan tanaman (Tanksley *et al.* 1983). Marka morfologi mudah untuk diamati, tetapi sangat dipengaruhi oleh lingkungan, jumlahnya sangat terbatas dan beberapa diantaranya muncul diakhir pertumbuhan misalnya yang berhubungan dengan karakter bunga dan buah. Hal ini membuat marka morfologi tidak memungkinkan untuk penilaian secara cepat. Selain itu suatu marka morfologi dapat mempengaruhi marka morfologi lain atau sifat yang menjadi target dalam program pemuliaan karena adanya pengaruh aksi gen pleiotropik (Pohlman & Sleper 1995).

Perkembangan biologi molekuler menghasilkan prosedur dasar analisis DNA untuk deteksi polimorfisme. Teknik berdasarkan *polymerase chain reaction* (PCR) atau reaksi polimorfisme berantai telah banyak digunakan untuk identifikasi kultivar, studi filogenetik, studi pedigree, pemetaan gen, dan estimasi kecepatan *outcrossing* (Williams *et al.* 1990; Powell *et al.* 1996). Marka molekuler merupakan alat tambahan untuk deskripsi varietas, tidak dipengaruhi oleh lingkungan serta memberikan informasi langsung dari genom setiap individu (Lefebvre *et al.* 2001). Castillo *et al.* (1994) menyatakan bahwa PCR sangat potensial untuk marka genetik tanaman yang berumur panjang.

Pengetahuan tentang basis genetik sifat unggul komoditas pertanian memungkinkan dilakukannya percepatan program pemuliaan dan perakitan varietas baru dengan akurasi dan efisiensi yang lebih tinggi, baik melalui seleksi berbasis marka DNA maupun perakitan tanaman transgenik. Saat ini MAS (*marker-assisted selection*) telah menjadi alat yang rutin digunakan dalam pemuliaan tanaman seperti dalam menentukan profil genetik suatu galur atau varietas. Penggunaan MAS memberikan kemudahan kepada peneliti untuk mengidentifikasi dan menyeleksi individu dengan sifat yang diinginkan secara cepat. Penurunan sifat secara rinci hanya dalam satu generasi. Dengan menggunakan teknologi berbasis marka DNA, seleksi dapat dilakukan pada umur yang lebih dini.

Dalam upaya untuk memacu proses pemuliaan tanaman buah, mangga, durian, manggis dan salak pada penelitian ini digunakan pendekatan menggunakan marka berbasis sequence sebagai *marker assisted selection* (MAS). Sifat target untuk komoditas mangga adalah tahan rontok dan berukuran besar, untuk durian daging buah tebal dan kuning, berbiji kecil, bebas getah kuning pada manggis, dan tanpa rasa sepat pada salak.

Rasa sepat merupakan salah satu kriteria utama yang mempengaruhi daya saing buah salak. Terdapat berbagai varietas salak yang memiliki rasa manis tetapi masih bercampur dengan sepat. Salak dengan rasa manis tanpa sepat merupakan jenis yang paling disukai. Oleh sebab itu upaya perbaikan kualitas buah salak diarahkan untuk mendapatkan varietas yang sesuai dengan ideotipe yaitu mempunyai rasa manis dan tidak bercampur dengan sepat. Untuk komoditas mangga komersial masalah utamanya adalah buah rontok dan ukuran buah. Untuk mempercepat perolehan varietas yang tahan rontok dan ukuran

buah sesuai dengan yang dikehendaki dapat dilakukan melalui program pemuliaan. Pada komoditas durianideotipnya adalah daging buah tebal dan berwarna kuning tembaga, dan berbiji kecil, serta bebas getah kuning pada buah manggis. Pada penelitian ini MAS digunakan untuk mempercepat pencapaian perolehan varietas tanaman buah tersebut sesuai dengan sifat target masing-masing.

1.2. Dasar Pertimbangan

Pengetahuan di bidang genetika dan biologi molekuler merupakan salah satu faktor pendukung dalam pengembangan komoditas pertanian yang unggul dan berdaya bersaing. Program-program pemuliaan secara konvensional telah memberikan banyak hasil yang terbukti mampu meningkatkan kualitas tanaman. Akan tetapi metode konvensional ini memiliki banyak kekuarangan diantaranya membutuhkan waktu yang lama terutama untuk tanaman buah, dan evaluasi karakternya sangat dipengaruhi oleh lingkungan.

Untuk mempercepat program pemuliaan tanaman buah yang berumur panjang diperlukan metode yang mampu mempersingkat proses seleksi dan mengeliminasi pengaruh faktor lingkungan dan pertumbuhan tanaman.. Pada penelitian ini akan digunakan pendekatan yang lebih rasional yaitu dengan mengintegrasikan pendekatan konvensional berupa marka morfologi dengan bioteknologi modern berupa marka molekuler berbasis DNA sequence sebagai *Marker Assited Selection* dalam program pemuliaan tanaman buah. Untuk meningkatkan kualitas output penelitian kegiatan ini dilaksanakan melalui sinergi sumberdaya manusia, sarana dan prasarana lintas unit kerja didalam dan di luar badan litbang pertanian.

1.3. Tujuan

Jangka Pendek :

1. Mendapatkan minimal masing-masing satu kandidat gen yang berkaitan dengan ukuran buah dan tahan rontok pada mangga
2. Mendapatkan minimal dua kandidatgen yang berkaitan dengan rasa sepat pada salak
3. Mendapatkan minimal 25 data sekuen fragmen DNA polimorfik pada manggis

4. Masing-masing satu kandidat marka molekuler penanda warna daging buah kuning dan ukuran biji kecil pada durian
5. Publikasi minimal 25 data sekuen yang diperoleh pada data base genBank

Jangka Panjang

Mendapatkan teknologi untuk seleksi cepat genotipe mangga tahan rontok dan ukuran buah besar, genotipe durian dengan daging buah kuning dan berbiji kecil, genotipe manggis tanpa getah kuning, genotipe salak sepat dan non sepat sebagai *markerassisted selection* dalam pemuliaan tanaman buah

1.4 Keluaran yang diharapkan

Jangka Pendek :

1. Masing-masing satu kandidat gen yang berkaitan dengan ukuran buah dan tahan rontok pada mangga
2. Dua kandidat gen yang berkaitan dengan rasa sepat pada salak
3. 25 data sekuen fragmen DNA polimorfik pada manggis
4. Masing-masing satu kandidat marka molekuler penanda warna daging buah kuning dan ukuran biji kecil pada durian
5. Publikasi minimal 25 data sekuen yang diperoleh pada data base genBank

Jangka Panjang

Satu paket teknologi untuk seleksi cepat genotipe mangga tahan rontok dan ukuran buah besar, genotipe durian dengan daging buah kuning dan berbiji kecil, genotipe manggis tanpa getah kuning, dan genotipe salak sepat dan non sepat sebagai *markerassisted selection* dalam pemuliaan tanaman buah

1.5. Perkiraan Manfaat dan Dampak

Manfaat

1. Efisiensi waktu, biaya, dan tenaga, dalam proses pemuliaan tanaman buah yang berumur panjang
2. Meningkatkan akurasi kegiatan identifikasi dan seleksi sumberdaya genetik tanaman buah
3. Menunjang peningkatan kualitas tanaman buah melalui penyediaan marka seleksi varietas
4. Melindungi sumberdaya genetik tanaman buah Indonesia dengan menyediakan data sidik jari DNA
5. Pengembangan iptek dari tradisional ke modern
6. Meningkatkan jumlah publikasi pada jurnal nasional / internasional

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kerangka Teoritis

Upaya mempercepat program pemuliaan memerlukan metode yang mampu mempersingkat proses seleksi dan mengeliminasi pengaruh faktor lingkungan. Perkembangan biologi molekuler telah menghasilkan alternatif prosedur dasar analisis DNA untuk deteksi polimorfisme. Marka molekuler merupakan alat tambahan untuk deskripsi varietas dan mempunyai keuntungan karena tidak dipengaruhi oleh lingkungan serta memberikan informasi langsung dari genom setiap individu (Lefebvre *et al.* 2001). Castillo *et al.* (1994) menyatakan bahwa teknik berdasarkan *polymerase chain reaction* (PCR) sangat potensial untuk marka genetik tanaman yang berumur panjang. PCR telah banyak digunakan untuk identifikasi kultivar, studi filogenetik, studi pedigree, pemetaan gen, dan estimasi kecepatan *outcrossing* (Williams *et al.* 1990; Powell *et al.* 1996).

Aplikasi dari marka molekuler merupakan strategi dasar untuk karakterisasi dan dapat membantu memaksimalkan diversitas genetik material pemuliaan. Marka molekuler memberikan dasar karakterisasi berdasarkan gen, genotipe, dan genome yang lebih akurat dan detail daripada data klasik secara fenotipik. Identifikasi karakter tanaman merupakan salah satu upaya untuk mendapatkan informasi mengenai keragaman genetik. Pengetahuan tentang keragaman genetika menjadi modal dasar dalam pemuliaan tanaman dan genetika populasi dalam perbaikan genetika dan pengembangan kualitas tanaman. Analisis molekuler dapat membedakan genotipa individu di dalam spesies secara tepat. Pendugaan tingkat keragaman genetik merupakan langkah penting dalam usaha menduga tingkat kemajuan genetika yang berpotensi (*potential genetic gain*) dalam program pemuliaan tanaman dan pengujian hipotesis genetika populasi (Darmono, 1996).

Marker-assisted selection (MAS) sangat berguna dalam pemuliaan tanaman khususnya pada tanaman pohon yang berumur panjang (Bernatzky and Mulcahy, 1992). Saat ini marka molekuler yang terpaut dengan dengan beberapa sifat penting pada pohon buah-buahan telah diidentifikasi seperti yang berasosiasi dengan resistensi scab pada apel (Gardiner *et al.*, 1996; Yang *et al.* 1997), sifat tanpa biji pada anggur (*Vitis vinifera* L.) (Striem *et al.*, 1996), Marka

molekuler yang dikembangkan dari *sequence characterized amplified region* (SCAR) marker melalui desain primer spesifik pada daerah konservasi (conserved region) sangat berguna dalam studi genetika untuk gen yang mengontrol sifat tertentu. Teknik ini telah berhasil digunakan untuk identifikasi tanaman jantan dan betina *Piper longum* pada stadium dini (Manoj et al, 2005), membedakan sex pada pepaya (Sobir et al, 2005), dan deteksi *seasonal flowering locus* (SFL) pada *Fragaria vesca* (Albani et al, 2004).

Keragaman rasa salak antara lain manis, masam, manis masam, manis masam agak sepat sampai sepat, serta masam agak sepat. Rasa sepat yang tinggi menandakan tingginya kandungan tanin di dalamnya. Hasil penelitian Purnomo (1994) menunjukkan bahwa kultivar salak yang tidak sepat seperti salak Pondoh, salak Gula Pasir mempunyai kandungan tanin yang lebih rendah dibandingkan kultivar salak yang sepat (kultivar Gondok, Nangka). Rasa sepat mempengaruhi kesehatan dan dapat menghambat buang air besar. Dalam dunia farmasi, kandungan zat tanin ini biasanya digunakan sebagai bahan pembuat obat anti diare. Salak dengan rasa manis tanpa rasa sepat merupakan jenis yang paling disukai untuk konsumsi segar. Oleh sebab itu upaya perbaikan kualitas buah salak ditujukan untuk memperoleh varietas sesuai ideotipe diantaranya mempunyai rasa manis tanpa rasa sepat.

Karakter rasa sepat pada salak sangat dipengaruhi oleh bagian tanaman dan fase pertumbuhan tanaman atau tingkat ketuaan buah. Pada tanaman *Lespedeza capitata*, kandungan tanin antar bagian tanaman, seperti daun, batang, dan bunga bervariasi. Demikian juga antar fase pertumbuhan juga berbeda (Springer et al., 2002). Pada tanaman calliandra dan *Lotus spp.*, kandungan tanin di daun lebih tinggi daripada di bagian batang (Salawn, et al., 1997 dan Gebrehiwot et al., 2002) dan pada tanaman kapas, jaringan yang lebih muda mempunyai konsentrasi tanin yang lebih tinggi dibanding jaringan tua (Lege et al., 1993). Kondisi ini dapat mempersulit proses seleksi dan evaluasinya.

Target utama dalam pemuliaan durian adalah untuk mendapatkan varietas dengan daging buah kuning dan berbiji sedikit. Pada tahap awal perlu dilakukan identifikasi marka SSR yang terpaut dengan karakter tersebut. Selanjutnya marka ini dapat digunakan untuk menyeleksi progeni-progeni pada generasi selanjutnya. Masalah yang dihadapi dalam proses seleksi tanaman F1 dalam pemuliaan salak adalah panjangnya waktu yang diperlukan karena harus

menunggu tanaman memasuki masa reproduksi yaitu sekitar 4 tahun. Sampai saat ini informasi tentang studi genetik untuk deteksi rasa sepat pada salak, warna daging buah dan ukuran biji kecil pada durian, kerontokan pada buah mangga masih terbatas.

Untuk mendapatkan marka molekuler sebagai penanda rasa sepat pada salak terlebih dahulu perlu diketahui mekanisme terjadinya rasa sepat tersebut. Salah satu mekanisme terjadinya rasa sepat berkaitan dengan proses fisiologis yaitu terjadinya akumulasi tanin yang merupakan sifat yang diturunkan secara genetik. Secara umum tanin penyebab rasa sepat pada tanaman adalah *proanthocyanidin* yang disimpan dalam vakuola sel-sel tanin (Yakushiji & Nakatsuka, 2007), atau yang disebut *condensed tannins*, yang terbentuk dari *catechin (2,3-trans-flavan-3-ol)* dari leucoanthocyanidins, yang diatur oleh gen *leucoanthocyanidin reductase (LAR)* (Tanner *et al.*, 2003), dan *epicatechin (2,3-cis-flavan-3-ol)* dari anthocyanidins yang diatur oleh gen *anthocyanidin reductase (ANR)* (Xie *et al.*, 2004). Berdasarkan studi pada kesemek diketahui bahwa sifat alami non sepat diwariskan secara kualitatif oleh alel resesif (Yonemori, 2000).

2.2. Hasil penelitian terkait

Hasil penelitian penggunaan marka molekuler pada manggis telah berhasil membedakan variasi genetik pada manggis. Diperoleh beberapa primer dan fragmen DNA yang polimorfik namun belum diketahui urutan DNA dari fragmen-fragmen tersebut serta fungsinya dalam mekanisme terjadinya variasi genetik pada manggis. Pada penelitian ini akan dilakukan analisis sekuensing dari fragmen DNA polimorfik yang telah diperoleh diantaranya pita-pita DNA spesifik diantaranya OPH-12 1400 bp, OPH-13/2400 bp, 950 bp dan OPH-18/1800 bp, 950 bp dan 850 bp, PKBT-3/1000 bp, PKBT-7/775 bp, dan PKBT-2 1900 bp yang berasosiasi dengan beberapa individu populasi Tembilihan (Mansyah, 2012)

Penelitian perakitan varietas salak unggul tanpa rasa sepat telah dimulai melalui eksplorasi, koleksi plasma nutfah indigenous dan persilangan antara beberapa varietas unggul lokal. Hasil penelitian yang telah diperoleh antara lain karakterisasi morfologi 228 aksesori salak. Disamping itu juga sudah diperoleh materi pemuliaan berupa koleksi plasma nutfah indigenous /lokal dan hibrid F1 yang berasal dari hasil persilangan tetua unggul lokal dengan tetua Pondoh, Sidempuan Merah dan Putih, Sanjung, Mawar, dan beberapa salak Jawa (Hadiati,

2013). Tahapan selanjutnya adalah evaluasi dan seleksi tanaman F₁ untuk memperoleh varietas unggul baru tanpa rasa sepat. Unruk keperluan seleksi ini diperlukan marka molekuler yang mampu mendeteksi genotipe salak yang sepat dan non sepat pada fase dini. Hasil awal tahun 2013 menunjukkan bahwa primer AST9 dan AST 12 berpotensi untuk digunakan sebagai alat untuk deteksi genotipe salak dengan rasa sepat dan tidak sepat. Fragmen DNA AST 12 pada posisi 1500 bp, 1000 p, dan 800 bp diduga sebagai penanda genotipe sepat dan sebaliknya fragmen AST9-900 bp, AST12-1450 bp, 900 bp dan 700 bp sebagai penanda genotipe tidak sepat. Untuk mengetahui urutan DNA serta karakter yang disandi oleh fragmen DNA tersebut perlu diidentifikasi lebih lanjut melalui analisis sekuensing.

Penelitian molekuler pada duriantelah menghasilkan 79 marka SSR yang diisolasi dari genom durian varietas Matahari (Tabel 1). Marka ini dipilih dari 366 fragmen DNA yang mengandung motif mikrosatelit. Dari sampling terhadap 11 marka diketahui bahwa marka-marka tersebut memiliki PIC yang sedang sampai tinggi, yang menunjukkan potensinya untuk digunakan sebagai marka sidik jari DNA pada durian dan kerabatnya (Santoso, unpublsh data)

Tabel 1. Motif dan primer mikrosatelit pada durian

No	Nama Lokus	Product size	Primer forward			Primer reverse		
			sekuens 5'-3'	GC	TM	sekuens 5'-3'	GC	TM
1	mDz1G3	151	TAC GCG TGG ACT ACT CAC AA	50	58.76	GTT AGT TCG TCG TTT CGG CT	50	58.59
2	mDz3D11	163	CAG CCC TGA CAT ATC CTG GT	55	58.86	GCT TAC GCG TGG ACT AGA CT	55	59.55
3	mDz03H9	171	AGC CTC CGT ATC TTT ACA TCG T	45.45	59.04	CAT TCG ATGCTA CCA CAC CG	55	59.07
4	mDz78B2	157	GCG TGG ACT AAC AAG TGG TA	50	57.56	ATA TCA AGG GCA GTC TCG TG	50	57.1
5	mDz6A11	151	GCA CAA CCA TAG CAC CAC TC	55	59.2	TGT TAT TCT CGT GCC AAG CG	50	58.92
6	mDz2E2	150	ACA CTC TTC GTC CGA TAA CAG ATA T	40	59.47	CTC CAA TCC TCC ACT TAT CAG TAG A	44	59.16
7	mDz1D1	144	GCT TAC GCG TGG ACT ACT AC	55	58.18	GGT CCT CCA AAT TCC CTT GAG	52.38	58.27
8	mDz4F9	150	TCT CTG CAT CAA TTG GCA CG	50	58.91	GCT TAC GCG TGG ACT ACT AA	50	57.45
9	mDz03C22	196	AGC GGT ATC AGC TCA CTC AA	50	58.85	GTT TCG CCA CCT CTG ACT TG	55	59.13
10	mDz1C42	166	GCG GTA TCA GCT CAC TCA AA	50	57.99	TTT TGT GAT GCT CGT CAG GG	50	58.48
11	mDz6H10	158	CTA CTC AGC CGG CCA GAG	66.67	59.19	CAC CTG CTT GTT TCG TCA GT	50	58.7
12	mDz03A31	280	TGT GGA GTC TTG TTC GGG AA	50	58.88	AGC AAC AAA CAG AAC CAC CG	50	59.26
13	mDz3G731	222	CCC TTC TCC CCC ACC TTA T	57.89	60.13	AGT GGG AGA GCG CAA TGT AT	50	59.72
14	mDz03D2	195	GCA CCC ATC GCA CAT CAT G	57.89	59.64	TCA TTC CCA GTC TAA GAT CCG A	45.45	58.09

15	mDz4A7	162	CAG GTT CTG GAC TGA GTT GT	50	57.08	GAC TAC TTT GGC CAG TCC CT	55	59.02
16	mDz1F2	230	CTA CGC CAA CCC ACG AAA T	52.63	58.15	ACG CGT GGA CTA GAC TTA GG	55	58.91
17	mDz1G1	169	CAC CCA TCG GAC ATC ATG TG	55	58.7	CGA CAG AGG GTT TCG ACA GA	55	59.4
18	mDz4A10	125	CCC AAT GCC TCC GGT CAG	66.67	60.12	AGA TCG GAC CAA ATC GAG GG	55	59.25
19	mDz03A1	205	CGT GGA CTA CTT TTA TTG CAG AGG	45.83	59.67	CAA GTC CAT TCG TAT TGC CAT TTA G	40	58.8
20	mDz2G7	184	GCT TAC GCG TGG ACT ACT TT	50	58.29	ATG AGA CCC ATC CCT TCG C	57.89	59.17
21	mDz03C6	209	CGC GTG GAC TAA CAG ATG AA	50	58.01	GCT TAC GCG TGG ACT ACT TC	55	58.73
22	mDz3G72	214	AGT TAA GGG TTG GAG CCG AT	50	58.71	TAC GTG TGA GGT CAA GCT GT	50	58.96
23	mDz3G73	200	CAC CCC TCC CCT ACA CAA AA	55	59.23	CCG GCT GGT ATG TTG TGT G	57.89	58.83
24	mDz1G102	151	GTG CAA GAT CAT CCC AAA TAC CA	43.48	59.05	CAG TCG GTG ATT CTT CGA AGT	47.62	58.05
25	mDz1H32	266	AGC ACC ACT CAT ATG CCC AT	50	59.15	TTG GCC GAT TCC TCT TGC TT	50	59.96
26	mDz4H8	204	ACC CAC CCG ATC GAT TAC TC	55	58.96	CAT CGT CCT CTT GCT TAC GC	55	59.08
27	mDz1C12	197	CGT TGT TGC CTG TCG GAT	55.56	58.03	CAC AAC CAT AGC ACC ACT CA	50	57.82
28	mDz1E12	141	TGT TAT TCT CGT GCC AAG CG	50	58.92	AGC ACC ACT CAT ATG CCC AT	50	59.15
29	mDz03H2	174	TAC AAA CCT CTT CCC TCG CC	55	59.39	AAC CCG ACA ACA GGC TTA GT	50	59.24
30	mDz2F8	201	ACG CGT GGA CTA AAC TAC CA	50	59.04	GTG GAC TAC TGT TCC GGG AT	55	58.81
31	mDz03F10	184	GGA CTA GAC AAC CAA GCA GAG	52.38	58.03	GCG TGG ACT ACT TCA AAC CC	55	58.85
32	mDz2B5	172	CGT GGA CTA GAC AAC CAA GC	55	58.57	AAC CCG ATC TTC ACC GTT CA	50	59
33	mDz03A4	227	TAC TCA CGC ACG GCA TAA GA	50	59.19	TCG TAT CAT CCA TGG CGA GT	50	58.67
34	mDz2G112	151	TGT CTT TGA TGA TGG TGG TTG A	40.91	57.9	ACT TAA CCA CTC GAC TCC CA	50	57.99
35	mDz3F5	205	CGC GTG GAC TAC TAC AAC CT	55	59.48	GCG TGG ACT ACT GAG CAT CT	55	59.54
36	mDz4B2	197	AAG CCA AGG TAG TGT AGC CT	50	58.34	CAC CAC CCA CAA TAG ACC CT	55	59.01
37	mDz43G7	151	GCG TGA TTG GCG ACT AGT AA	50	58.08	ATA CTG GCT CCA TCG TCA GC	55	59.61
38	mDz03C31	188	ACT CAC ACA CGG CAG TAA GA	50	58.96	TCC CCA AGC CAT TCT AT	50	58.77
39	mDz6F092	200	ACC CGG TAA GAC ACG ACT TA	50	58.09	TTT GCC GGC TCA AGA GCT AC	50	57.98
40	mDz2E3	173	TTC GTT TTG TGG GTT GGC TT	45	58.81	GTT TCG CCA CCT CTG ACT TG	55	59.13
41	mDz3E9	196	GTG GAC TAA CGG TAG CAA CT	50	57.26	GCT TAC GCG TGG ACT ACT TC	55	58.73
42	mDz1C41	155	TGG ACT AGA CAC CCA GGC	61.11	57.87	GGA GTA CAC GCT GGA ATA CC	55	57.78
43	mDz2A71	116	GTA TCG CAC CGT TGT TGC C	57.89	59.87	GAG CGA GCG GAG GAA ACG	66.67	60.88
44	mDz2G1	164	GGA TCG AAA TAC AGC GGG TT	50	58.05	ATG ATC GAT AAC AAC CGC CC	50	58.12
45	mDz3D1	209	GTG CAG AGT TCT TTG GCC AA	50	58.97	AAT GCC CTA GGA AAG CAG GA	50	58.7
46	mDz3H12	100	CTT ACG CGT GGA CCA AAA CA	50	59.06	TTC TCC TCC TTT CCC TCT CTC	52.38	57.89
47	mDz2C4	202	GGC TGT AGG ATC ATG CAC AA	50	57.96	GAC TAC TTG TAT GCC AGG CC	55	58.05
48	mDz2A72	198	CGT TGT TGC CTG TCG GAG	61.11	58.76	GCA CAA CCA TAG CAC CAC TC	55	59.2
49	mDz2F9	144	GTA TCG CAC CGT TGT TGC C	57.89	59.87	CTT CCG GCT CGT ATG TTG TG	55	59
50	mDz1E6	151	TGT TAT TCT CGT GCC AAG CG	50	58.92	GCA CAA CCA TAG CAC CAC TC	55	59.2
51	mDz6D08	220	TGT TAT TCT CGT GCC AAG CG	50	58.92	GCA CGA GGG GAG ATT GAA GA	55	59.46
52	mDz4D4	192	ATT CCC TTC TCC GAG AGC AC	55	59.17	TCC TTT TCT ATC CCG GTC GC	55	59.54

53	mDz1F1	163	ACG CGT GGA CTA ACA TAT ACA G	45.45	58.08	CAA AAG GAC TGC AGT GGT TGA	47.62	58.98
54	mDz6F06	208	GGT TAC AAC TTG CCC CAC TG	55	59.04	GAC CAC CAA CAC AAA CGG AA	50	58.9
55	mDz2F2	219	CAG GTG CTA GTG AGT GGT GT	55	59.32	TTG AGT GAG CTG ATA CCG CT	50	58.81
56	mDz3A9	196	GGA CTA ACC CTT CAG CCA CT	55	59.02	GCT TAC GCG TGG ACT ACT C	57.89	58.06
57	mDz1C3	172	CAA AGA TGA CGG AGG ACC CT	55	59.09	TTA CGC GTG GAC TAC TCA CT	50	58.47
58	mDz1G101	152	TCT TTT GTG TGT GTG CGT GT	45	58.84	GCA TCC AAA GTG TTC TCG TGT	47.62	59.13
59	mDz6A01	120	TAA CTT CTG CCT GCT CGT GA	50	59.03	CTC TTG CAA AGG ATC CAA GAG G	50	58.98
60	mDz5G04	247	CAC AAC ATA CGA GCC GGA AG	55	59	TTG AGT GAG CTG ATA CCG CT	50	58.81
61	mDz3E3	201	CGC GTG GAC TAA CTG GTA CT	55	59.48	GCT TAC GCG TGG ACT ACT AA	50	57.45
62	mDz4H10	190	ACT AAC CAG CAC CCA TCA CA	50	58.94	AAG ATC TAA CCG GAC CGA GG	55	58.6
63	mDz3A3	183	ACT AAC CAG CAC CCA TCA CA	50	58.94	TCA TAC TGG ACC GAG TGC TG	55	59.18
64	mDz1F5b	187	GTG GAC TAC TCG CGC GTG	66.67	60.87	ACA ACC CAC CCG ATC GAT	55.56	58.28
65	mDz53H51	154	ACT AGC ATA AAG GGC CAG CA	50	59.08	GCT TAC GCG TGG ACT ACT TAG	52.38	58.55
66	mDz6A09	240	GAT GGT GGA ATT GGT GGT GG	55	58.81	CCA CCT ACA CCT CCA CCT T T	55	58.94
67	mDz3B71	211	GAT GGT GGA ATT GGT GGT GG	55	58.81	ATC GGC TCC AAC CCT TAA CT	50	58.71
68	mDz2G111	213	ACA ATA GCA TAG AGG ATT GGC T	40.91	57.01	ACC ACT CGA CTC CCA TTC AA		
69	mDz03D1	153	GGG TGG CCG TGT GTA ATT TT	50	59.04	CAC GGG GCT AAT TGT CAT CG	55	59.06
70	mDz3B1	160	GAC TAG ACA CTC TTC GTC CGA	52.38	58.66	ACT CCT CCA ATC CTC CAC TT	50	57.65
71	mDz03D7	150	ATC AAC ACC TGG CTT GAT CC	50	57.87	AGA GAA GTT CGT TTA GGA GCC A	45.45	59.1
72	mDz6F093	224	AGA GTT CTT GAA GTG GTG GC	50	57.74	CGT CAG ACC CCG TAG AAA AG	55	58.01
73	mDz2A5	170	GAA CAA TTG ATG ATA AAG CGC G	40.91	57.08	AGA CTA CAA CTC ACT CGG CT	50	58.09
74	mDz4A6	150	AGA GAA GTT CGT TTA GGA GCC A	45.45	59.1	ATC AAC ACC TGG CTT GAT CC	50	57.87
75	mDz13E1	228	AAC CCG CTT TAT TGA CCC TG	50	58.17	CCA ACA ATG AAG GCC AGT CC	55	59.11
76	mDz3B72	245	TGA ACG TTC TCC ACC CCT C	57.89	58.94	GAA GTT GGT TCC TTG CGG TT	50	58.97
77	mDz6F094	245	GTT GCC GGG AAG CTA AAG TA	50	57.9	GGT TGC CCA TAC CCA TAG TG	55	58.02
78	mDz2C32	198	AAG ATA GGG TCG AGC ATG TG	50	57.1	GGG TGT GAG TTC TCA AGG TT	50	57.36
79	mDz2C31	155	CAG CAC AAG ATA GGG TCG AG	55	57.78	CCA AGT ATG AGC ACC CAT CG	55	58.41

III. METODOLOGI

3.1. Kegiatan 1. Identifikasi marka molekuler untuk seleksi genotipe mangga tahan rontok dan ukuran buah besar.

3.1.1. Pendekatan

Pendekatan yang digunakan adalah perpaduan antara teknik konvensional berupa persilangan dengan pengamatan morfologi dengan bioteknologi melalui pemanfaatan marker assisted selection (MAS)

3.1.2. Ruang Lingkup Kegiatan

Lingkup kegiatan adalah isolasi dan karakterisasi kandidat gen yang berasosiasi dengan sifat tahan rontok dan ukuran buah besar pada mangga, sampai dengan diperolehnya informasi urutan basa nukleotida (sekuen).

3.1.3 Bahan dan Metode Pelaksanaan Kegiatan

3.1.3.1 Bahan

Bahan tanaman yang digunakan dalam kegiatan ini adalah 18 aksesori F1 mangga hasil persilangan antara mangga komersial berukuran buah kecil (Gedong Gincu) dengan mangga yang berukuran buah besar (Garifta Orange, Delima dan Ken layung), 25 aksesori F1 mangga hasil persilangan antara mangga komersial yang tidak tahan rontok (Garifta Merah dan Gedong Gincu) dengan mangga yang toleran terhadap curah hujan tinggi/tahan rontok (Durih, Bangaloor, Malgova dan Garifta Kuning), dan tanaman tetuanya. Varietas yang digunakan dicantumkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Varietas mangga berdasarkan ukuran buah yang digunakan dalam penelitian

No.	Varietas	Karakter utama
1	Gedong Gincu	ukuran buah kecil
2	Garifta Merah	Ukuran buah kecil
3	Garifta Orange	Ukuran buah besar
4	Delima	Ukuran buah besar
5	Ken Layung	Ukuran buah besar

Tabel 3. Varietas mangga berdasarkan ketahanan terhadap rontok

No.	Varietas	Karakter utama
1	Gedong Gincu	tidak tahan rontok
2	Garifta Merah	tidak tahan rontok
3	Durih	Tahan rontok
4	Bangaloor	Tahan rontok
5	Malgova	Tahan rontok
6	Garifta Kuning	Tahan rontok

3.1.3.2 Metode Pelaksanaan

a. Waktu

Penelitian akan dilakukan mulai bulan Januari – Desember 2014

b. Tempat

Penelitian dilaksanakan di KP. Aripa, KP Cukur Gondang, KP Subang, Laboratorium Pemuliaan Tanaman Balitbu Tropika dan Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen.

c. Pelaksanaan :

c.1.1. Ekstraksi, Purifikasi dan Penentuan Kuantitas DNA

Isolasi DNA dilakukan berdasarkan Doyle & Doyle (1987) yang telah dimodifikasi oleh Sobir (2000). Sebanyak 0.15 mg daun digerus pada mortar yang diberi 0.6-0.8 ml *buffer* ekstraksi (10% CATB; 0.5 M EDTA (pH8,0); 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 5 M NaCl; 1% β -mercaptoethanol) dan kemudian divorteks agar homogen. Campuran selanjutnya diinkubasi di dalam *waterbath* pada suhu 65 °C selama 1 jam. Pemurnian DNA dilakukan dengan penambahan 0.6-0.7 ml *buffer* purifikasi/*buffer* CIA (Chloroform : Isoamil Alkohol = 24:1 v/v). Pemisahan fraksi dalam campuran dilakukan dengan sentrifugasi 11.000 rpm selama 10 menit. *Supernatan* yang diperoleh dipindahkan ke microtube steril yang baru. Tahapan ini dapat diulang 2–3 kali tergantung kualitas DNA yang dihasilkan. Selanjutnya ditambah dengan 500-600 μ l 2-propanol dingin, diinkubasi pada freezer selama 1 malam. Fase cair dibuang dan fase padat/pelet dikeringkan anginkan maksimal 1 malam. Selanjutnya pelet dilarutkan dalam 50-100 μ l TE (1 M Tris-HCl pH 8.0; 0.5 M EDTA pH 8.0; dan Aquades).

Pengujian kuantitas dan kualitas DNA dilakukan menggunakan metode elektroforesis. Sebanyak 5 μ l DNA hasil ekstraksi ditambah dengan 1 μ l *loading dye* dimasukkan pada sumur gel. Perkiraan kuantitas DNA ditentukan dengan

membandingkan ketebalan pita DNA dengan lambda DNA pada gel agarose 1,2% yang dielektroforesis selama 45 menit pada tegangan 50 volt. Hasil elektroforesis diwarnai dengan ethidium bromida 1% dan dibilas aquades, selanjutnya pita DNA hasil elektroforesis dilihat dan divisualisasi melalui UV transiluminator. DNA yang diperoleh siap digunakan untuk reaksi PCR dengan diencerkan terlebih dahulu sesuai dengan konsentrasi DNA yang diperoleh.

c.1.2. Desain Primer *Degenerate*

Metode yang digunakan adalah analisis bioinformatik melalui ONLINE ANALYSIS TOOLS. Pada penelitian ini digunakan sifat kerontokan dan ukuran buah sebagai objek pencarian data sekuen menggunakan analisis bioinformatik pada NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sifat tahan rontok diduga berasosiasi dengan aktifitas gen di daerah *abscision zone* (AZ) dari pedisel (tangkai buah), beberapa diantaranya gen yang mengkode protein polygalacturonase 2 (PG2) dan JOINTLESS. Ukuran buah diduga berasosiasi dengan aktifitas gen *FAS* (*Yabby-like TF*) yang pada tomat dapat meningkatkan jumlah lokul sehingga ukuran buah menjadi lebih besar (Clevenger, 2013). Desain primer *degenerate* berdasarkan sekuen gen *PG2* dan *JOINTLESS* dan *FAS* menggunakan perangkat lunak berbasis webGenefisher 2 (<http://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/genefisher2>). Sintesis primer selanjutnya dilakukan pada laboratorium yang melayani pemesanan primer.

c.1.3. Amplifikasi DNA

Setelah primer didesain dilanjutkan dengan optimasi kondisi PCR untuk menghasilkan amplifikasi spesifik pada masing-masing primer, terutama untuk suhu annealingnya. PCR dilakukan dengan volume reaksi volume 25 μ l terdiri dari 2.0 μ l DNA genom (20 ng), 1.0 μ l masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) dengan konsentrasi 10 μ M, 12.5 μ l KAPA2GTMFast Readymix (Kapa Biosystems Inc., USA) dan 8.5 μ l ddH₂O. Siklus pertama adalah 95°C selama 3 menit, diikuti oleh 35 siklus pada 95°C selama 15 detik, dan annealing temperature pada suhu 55-80°C selama 15 detik dan 72°C selama 5 detik. Tahap perpanjangan selama 10 menit pada 72°C ditambahkan setelah 35 siklus.

Setelah reaksi amplifikasi berakhir produk amplifikasi diberi 2 μ l *loading dye*, dielektroforesis pada 1.4% gel agarosa dengan voltase konstan 50 Volt

selama lebih kurang satu jam di dalam bak elektroforesis yang berisi buffer TAE 1 X. Hasil elektroforesis divisualisasikan di atas ultra violet *transiluminator* dan didokumentasikan dengan gel doc.

c.1.4. Purifikasi dan kloning produk PCR yang diduga berasosiasi dengan karakter tahan rontok dan ukuran buah besar

Sebelum dilakukan kloning, produk PCR terlebih dahulu dipurifikasi menggunakan Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) dengan prosedur standar dari perusahaan tersebut. Sebelum dilakukan proses kloning, terlebih dahulu harus disiapkan sel kompeten dari *E. coli* strain DH5 α . Pembuatan sel kompeten mengadopsi metode modifikasi buffer CaCl₂ yang dikembangkan oleh Li *et al.* (2010). Produk PCR dikloning ke dalam vektor pGEM-T[®] EasyVector (Promega, Madison, WI, USA), dengan protokol standar sesuai dengan petunjuk perusahaan.

c.1.5. Seleksi dan konfirmasi insersi fragmen DNA target

Koloni bakteri transforman dipilih yang berwarna putih dan disubkultur ke tabung Falcon yang berisi media LB cair yang ditambah ampisilin (100 mg l⁻¹) sebanyak 4 sampai 5 ml, diinkubasi pada suhu kamar dan digoyang (*shaker*) selama satu malam. Sebelum dikirim ke perusahaan jasa layanan *sequencing*, plasmid dipurifikasi menggunakan High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan). Untuk konfirmasi adanya insersi fragmen DNA target, dilakukan PCR menggunakan primer degenerate untuk masing-masing gen.

c.1.6. Analisis data sekuensing

Untuk mengetahui identitas fragmen DNA hasil sekuensing dianalisis menggunakan algoritma BLASTn dan BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pada NCBI. Translasi sekuen DNA menjadi asam amino menggunakan perangkat lunak DNAMAN ver. 4.03 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada). Analisis pensejajaran sekuen basa nukleotida dan prediksi asam amino produk PCR menggunakan perangkat lunak GeneDoc ver. 2.7 (Nicholas *et al.* 1997). Pohon filogenetik didisain berdasarkan metode Neighbor-Joining menggunakan perangkat lunak MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

c.1.8. Publikasi data sekuen pada genbank

Data sekuen yang diperoleh dapat langsung dikirimkan untuk dipublikasikan pada GenBank, setelah dimasukkan menggunakan perangkat lunak Sequin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Sequin/>).

3.2. Kegiatan 2. Isolasi dan karakterisasi fragmen DNA polimorfik dan monomorfik pada plasma nutfah manggis Indonesia (*Garcinia mangostana* L.)

3.2.1. Pendekatan

Pendekatan yang digunakan adalah perpaduan antara teknik konvensional berupa pengamatan morfologi dengan bioteknologi melalui pemanfaatan marker assisted selection (MAS)

3.2.2. Ruang Lingkup Kegiatan

Lingkup kegiatan adalah isolasi dan karakterisasi marka molekuler polimorfik dan monomorfik pada manggis, sampai dengan diperolehnya informasi urutan basa nukleotida (sekuen).

3.2.3 Bahan dan Metode Pelaksanaan Kegiatan

3.2.3.1 Bahan

Materi yang digunakan adalah 52 fragmen DNA polimorfik dan monomorfik produk amplifikasi DNA manggis Leuwiliang, Purwakarta, Kerinci, Sumbar, Tembilahan, dan Bulukumba telah diperoleh pada penelitian sebelumnya (Mansyah et al. 2012). Daftar fragmen DNA yang akan digunakan dicantumkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Fragmen DNA dan primer yang digunakan untuk karakterisasi molekular manggis

No	Produk Amplifikasi	Perkiraan Ukuran fragmen (bp)	Keterangan
1	PRIMER RAPD OPH13 (CACGCCACAC)	2400	Polymorfik
2		1700	Polymorfik
3		1000	Polymorfik
4		700	Polymorfik
5		400	Polymorfik
6	PRIMER RAPD OPH12 (ACGCGCATGT)	1200	Monomorfik
7		750	Monomorfik
8		550	Monomorfik

9	PRIMER RAPD OPH18 (GAATCGGCCA)	1800	Polymorfik
10		1200	Polymorfik
11		950	Polymorfik
12		850	Polymorfik
13	PRIMER RAPD SB13 (AGTCAGCCAC)	1475	Polymorfik
14		1300	Polymorfik
15	PRIMER RAPD SB19 (CAGCACCCAC)	1300	Polymorfik
16		700	Monomorfik
17		450	M Monomorfik
18	PRIMER ISSR PKBT7 (GA)9-A	1250	Polymorfik
19		1100	Polymorfik
20		700	Polymorfik
21		500	Polymorfik
22		400	Monomorfik
23		300	Monomorfik
24	PRIMER RAPD P3 (GTAGACCCGT)	1300	Monomorfik
25		1100	Polymorfik
26		750	Monomorfik
27	PRIMER RAPD P5 (AACGCGCAAC)	1200	Monomorfik
28		1000	Polymorfik
29		450	Monomorfik
30		350	Polymorfik
31	PRIMER ISSR PKBT10 (GT)9-A	1100	Monomorfik
32		875	Polymorfik
33		600	Monomorfik
34	PRIMER ISISR PKBT11 (GT)9-C	1500	Polymorfik
35		1150	Polymorfik
36		1000	Monomorfik
37		850	Polymorfik
38		750	Polymorfik
29		500	Monomorfik
40	PRIMER ISSR PKBT2 (AC)8TT	1900	Polymorfik
41		1350	Polymorfik
43		900	Monomorfik
44		500	Polymorfik
45	PRIMER ISSR PKBT3 (AG)8T	1400	Polymorfik
46		1100	Polymorfik
47		750	Polymorfik
48	PRIMER RAPD P1 (GGTGCGGGAA)	1700	Polymorfik
49		1600	Polymorfik
50		750	Polymorfik
51		500	Polymorfik
52	MCWS R: TCAGACCACTCATCGG F: TTGGTGGTAACAGCA	1200 1000	Kandidat fragmen DNA untuk deteksi genotipe manggis bergetah kuning

3.2.3.2 Metode Pelaksanaan

a. Waktu

Penelitian akan dilakukan mulai bulan Januari – Desember 2015

b. Tempat

Penelitian dilaksanakan di KP Aripan, Laboratorium Pemuliaan Tanaman Balitbu Tropika dan Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen.

c. Pelaksanaan

c.1.1. Penyiapan fragmen DNA target

Ekstraksi, Purifikasi dan Penentuan Kuantitas DNA

Isolasi DNA dilakukan berdasarkan metode Doyle & Doyle (1987) seperti yang dilakukan untuk mangga.

c.1.2. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan primer pada Tabel 4. dengan volume reaksi 25 μ l, terdiri dari 2 μ l (20ng) DNA template, 1 μ l primer (10 pmol), 12.5 μ l Go Taq Green Master Mix (Promega M7122), dan 9.5 μ l air bebas ion pada termocycler Applied Biosystems 2720. Program PCR diatur sebagai berikut: 94°C selama 4 menit, diikuti oleh 35 siklus pada 94°C selama 45 detik, dan annealing temperatur pada suhu 55-80°C (tergantung primer yang digunakan) selama 30 detik dan 72°C selama 20 detik dan tahap perpanjangan selama 10 menit pada 72°C. Produk amplifikasi diberi 2 μ l *loading dye*, dielektroforesis pada 1.4% gel agarosa dengan voltase konstan 50 Volt selama lebih kurang satu jam di dalam bak elektroforesis yang berisi buffer TAE 1 X. Hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan UV *transiluminator* dan didokumentasikan dengan gel doc.

c.1.3. Isolasi fragmen DNA target untuk marka SCAR

Produk PCR pada gel elektroforesis diamati dan dipilih fragmen DNA polimorfik dan monomorfik seperti tercantum pada Tabel 4 diatas. Fragmen DNA ini diisolasi dari gel dengan cara memotong diatas UV transiluminator dan dimasukkan kedalam tabung microcolumn untuk dipurifikasi dari gel. Pemurnian dilakukan dengan cara sentrifugasi sebagai berikut:

- a. Tambah dengan 100 µl air dan 100100 µ Chloroform Isoamil alkohol (CIAA)
- b. Sentrifus 10 menit 11.000 rpm, ambil cairan bagian atas masukkan kedalam tabung baru.
- c. Tambah Na-Acetate 10 µl dan Ethanol absolut 250 µl dan simpan di freezer satu malam
- d. Sentrifus 11.000 rpm 10 menit dan buang cairannya
- e. Tambah ethanol 70%, sentrifus 11.000 rpm 10 menit dan buang cairan alkohol
- f. Keringkan DNA dan tambah dengan 25 µl air bebas ion
- g. Siap digunakan untuk PCR

c.1.4. Kloning dan Sekuensing fragmen DNA target

Fragmen DNA yang telah diisolasi selanjutnya dikloning menggunakan kloning kit dan sel kompeten di Laboratorium Molekuler Balitbu Tropika, kemudian dilanjutkan dengan analisis sekuensing di Laboratorium BB-Biogen atau pada institusi yang melayani analisis sekuensing.

c.1.5. Analisis data sekuensing

Untuk mengetahui identitas fragmen DNA hasil sekuensing dianalisis menggunakan algoritma BLASTn dan BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pada NCBI. Translasi sekuen DNA menjadi asam amino menggunakan perangkat lunak DNAMAN ver. 4.03 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada). Analisis pensejajaran sekuen basa nukleotida dan prediksi asam amino produk PCR menggunakan perangkat lunak GeneDoc ver. 2.7 (Nicholas *et al.* 1997). Pohon filogenetik didisain berdasarkan metode Neighbor-Joining menggunakan perangkat lunak MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

c.1.6. Publikasi data sekuen pada genbank

Data sekuen yang diperoleh dapat langsung dikirimkan untuk dipublikasikan pada GenBank, setelah dimasukkan menggunakan perangkat lunak Sequin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Sequin/>).

3.3. Kegiatan 3. Identifikasi marka SSR terpaut karakter daging buah warna kuning dan biji kempes pada durian

3.3.1. Pendekatan

Pendekatan yang digunakan adalah perpaduan antara teknik konvensional berupa pengamatan morfologi dengan bioteknologi melalui pemanfaatan marker assisted selection (MAS)

3.3.2. Ruang Lingkup Kegiatan

Ruang lingkup kegiatan berupa isolasi DNA genom, amplifikasi dan genescaning, identifikasi lokus/allele terpaut warna daging buah kuning dan biji kecil .

3.3.3 Bahan dan Metode Pelaksanaan Kegiatan

3.3.3.1 Bahan

Karakter penting pada durian antara lain daging buah kuning dan berbiji kecil (kempes). Bahan tanaman yang digunakan adalah 35 aksesori plasma nutfah durian koleksi balitbu Tropika dengan warna daging buah dan ukuran biji yang beragam (Tabel 5 dan 6)

Tabel 5. Aksesori durian yang digunakan untuk sifat warna daging buah

No	Varietas / aksesori	Karakter warna daging buah
1	Lai mas	Daging Kuning
2	Kunyit	Daging Kuning
3	Musang king	Daging Kuning
4	Chanee	Daging Kuning
5	Mentega	Daging Kuning
6	Kunir	Daging Kuning
7	Raja udang	Daging Kuning
8	Undang/otak undang	Daging Kuning
9	Susu	Daging putih
10	Hortimat	Daging putih
11	Rancamaya	Daging putih
12	Bokor	Daging putih
13	Sinapel	Daging putih
14	Aseupan	Daging putih
15	Keceng	Daging putih
16	Bakul	Daging putih
17	Durian pelangi	Daging merah
18	Songgon	Daging merah
19	Kemiren	Daging merah
20	Dubang	Daging merah
21	D. Graveolens	Daging merah

Tabel 6. Aksesori durian yang digunakan untuk sifat ukuran biji

No	Varietas /aksesi	Karakter biji
1	Sari Kampih	biji kecil/kempes
2	PKT 2-1	Biji kecil/kempes
3	Sukun	Biji kecil/kempes
4	Durian sumber	Biji kecil/kempes
5	Musang king	Biji kecil/kempes
6	Turhadi	Biji kecil/kempes
7	Nanga	Biji kempes
8	Montong	Biji kempes
9	Cirik Kudo 1	biji besar
10	Cirik kudo 2	biji besar
11	Hortimat	biji besar
12	Kirik	biji besar
13	Mas	biji besar
14	Bokor	biji besar

3.3.3.2. Metode Pelaksanaan

a. Waktu

Penelitian akan dilakukan mulai bulan Januari – Desember 2015

b. Tempat

Penelitian dilaksanakan di P. Aripan, KP Subang, Laboratorium Pemuliaan Tanaman Balitbu Tropika dan Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen.

c. Pelaksanaan

c.1. Isolasi DNA genom 20 aksesori durian

DNA diisolasi dari pucuk daun durian menggunakan metode berdasarkan kit isolasi. Dis.

c.2. Amplifikasi dan genescaning

Setiap pasang primer mikrosatelit digunakan untuk mengamplifikasi DNA durian yang berasal dari tanaman yang berdaging buah tebal, kuning, dan berbiji kecil. Amplifikasi menggunakan metode PCR berlabel fluorescence FAM/HEX. Sebanyak 20 µL campuran reaksi disiapkan dengan komponen terdiri atas: 1xbuffer reaksi, 1-4 µM MgCl₂, 1 µM dNTPs *Mix*, 0,5 - 1 µM Primer Forward, 1 µM Primer Reverse, 1 µM FAM/HEX, 1,25 u Taq *Polymerase*, 50 ng/µl DNA Template. PCR diawali dengan pre-denaturasi pada suhu 94 °C selama 3 menit, dilanjutkan siklus awal PCR sebanyak dua kali dengan denaturasi pada suhu 94

°C selama 30 detik, diikuti *annealing* pada suhu 56 °C selama 30 detik, dan diakhiri elongasi pada suhu 72 °C selama 30 detik. Selanjutnya penempelan FAM yang dilakukan sebanyak 32 kali siklus yaitu denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik diikuti proses *annealing* FAM pada suhu 53 °C selama 45 detik, dan elongasi pada suhu 72 °C selama 45 detik. Reaksi PCR kemudian diakhiri dengan elongasi terakhir pada suhu 72 °C selama 10 menit dan diakhiri pada suhu 4 °C. Produk amplifikasi yang sudah berlabel 6-FAM kemudian dikirim ke pihak ketiga untuk analisa fragmen (genescan). Hasil scan berupa elektroferogram yang memperlihatkan grafik dari puncak pancaran penanda fluoresens 6-FAM/HEX berwarna biru/hijau yang dapat membedakan panjang sekuens DNA yang teramplifikasi.

c.3. Identifikasi lokus/allele terpaut warna daging buah kuning dan biji kecil

Alel-alel yang muncul disesuaikan dengan sifat morfologi materi genetik yang digunakan. Alel yang muncul bersamaan pada tanaman yang memiliki daging buah kuning, biji kempes buah tebal diduga sebagai marka yang terpaut sifat tersebut.

3.4. Kegiatan 4.Identifikasi dan karakterisasi marka SNP untuk seleksi varietas unggul salak tanpa rasa sepat

3.4.1. Pendekatan

Pendekatan yang digunakan adalah perpaduan antara teknik konvensional berupa persilangan dan pengamatan morfologi dengan bioteknologi melalui pemanfaatan marker assisted selection (MAS)

3.4.2. Ruang Lingkup Kegiatan

Lingkup kegiatan yang dilakukan pada TA 2015 adalah isolasi dan karakterisasi gen *LAR* dan *ANR* pada tanaman salak dan kerabatnya, sampai dengan diperolehnya informasi urutan basa nukleotida (sekuen), dan identifikasi situs-situs SNP pada fragmen gen tersebut. Pembuatan marka *single nucleotide amplified polymorphism* (SNAP), seleksi primer SNAP, pengujian dan validasi marka SNAP akan dilakukan pada kegiatan penelitian TA 2016.

3.4.3 Bahan dan Metode Pelaksanaan Kegiatan

3.4.3.1 Bahan

Bahan tanaman yang digunakan adalah sampel daun 10 aksesori salak dan kerabatnya yang mewakili rasa sepat dan tidak sepat asal koleksi plasma nutfah salak Balai Penelitian Tanaman Buah Solok. Ekstraksi DNA genom menggunakan metode Doyle & Doyle (1987). DNA yang diperoleh disimpan dalam freezer -20 °C. Aksesori atau kultivar salak dan kerabatnya dicantumkan pada tabel 7.

Tabel 7. Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian

No.	Genotipe	Keterangan	No.	Genotipe	Keterangan
1	Salak Sidempuan	Sepat	6	Salak Pondoh	Tidak sepat
2	Salak Swaru	Sepat	7	Salak Bali Gula Pasir	Tidak sepat
3	<i>Afinis2</i>	Sepat	8	<i>Magnifera</i>	Tidak sepat
4	<i>Walliciana</i>	Sepat	9	Salak Mawar	Tidak sepat
5	<i>Glabrescens-4</i>	Sepat	10	23-3 (SBGP)	Tidak sepat

3.4.3.2. Metode Pelaksanaan

a. Waktu

Penelitian akan dilakukan mulai bulan Januari – Desember 2015

b. Tempat

Penelitian dilaksanakan di KP. Aripan, KP Sumani, Laboratorium Pemuliaan Tanaman Balitbu Tropika dan Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen.

c. Pelaksanaan

C.1. Isolasi dan karakterisasi gen *leucoanthocianidin reductase (LAR)* dan *anthocianidin reductase (ANR)* pada beberapa aksesori salak dan kerabatnya

C.1.1. Disain primer

Primer didisain menggunakan perangkat lunak Primer3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Primer untuk mengisolasi gen *leucoanthocianidin reductase* didisain berdasarkan sekuen gen *LAR1* yang berasal dari tanaman kedelai (JF433916) dan anggur

(NM_001280958) yang terdeposit di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sedangkan untuk gen *anthocianidin reductase* didisain berdasarkan sekuen gen *ANR* yang berasal dari *Arabidopsis thaliana* (NM_104854), kakao (GU324347) dan anggur (DQ129684). Urutan nukleotida primer secara detail ditampilkan pada Tabel 8.

C.1.2. Amplifikasi PCR

Reaksi PCR dilaksanakan dengan volume 25 µl menggunakan KAPA2G™ PCR Kit (Kapa Biosystems Inc., USA), yang komposisinya terdiri atas 5.0 µl 5 X buffer PCR (di dalamnya terkandung 1.5 mM Mg²⁺), 0.5 µl MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl dNTPs 10 mM, 1.0 µl masing-masing primer dengan konsentrasi 10 µM (primer *forward* dan *reverse*), 30 ng DNA genom, 0.1 µl Taq DNA polymerase (5 U µl⁻¹) dan 15.4 µl ddH₂O. Denaturasi cetakan DNA pada awal reaksi pada suhu 95°C selama 3 menit, diikuti dengan 35 kali siklus 95°C selama 10 detik, 45-57 °C (tergantung pada primer) selama 10 detik dan 72°C selama 3 detik, dan diakhiri dengan satu siklus 72°C selama 10 menit. Produk PCR dipisahkan berdasarkan ukuran dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 1% pada mesin elektroforesis dengan tegangan 80 V selama 25 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan gel menggunakan ethidium bromide dan visualisasi menggunakan transluminator UV. Produk PCR yang menghasilkan pita tunggal dan jelas dikirim ke 1stBASE (Malaysia) untuk proses perunutan basa nukleotida (*sequencing*).

Tabel 8. Urutan nukleotida primer untuk mengamplifikasi *LAR* dan *ANR*

No.	Kode Primer	Urutan nukleotida ('5..... '3)	Tm (°C)	Jumlah Basa (bp)	Produk (bp)
1	ANR1-F	GTGTCATTGGTGGCACGGGA	63.02	20	763
2	ANR1-R	GCACAGCAAATGTAGCGACCAGA	63.80	23	
3	ANR2-F	TGTGTCGTAGGTGGCACCGGA	65.79	21	765
4	ANR2-R	AGCACAGCATATATATCGGCCGGA	63.76	24	
5	ANR3-F	TGTGTCGTCGGCGGCACC	65.60	18	763
6	ANR3-R	CACAGCAGATGTATCGGCCAGA	62.43	22	
7	LAR1-F	GGAGCAACAGGTTTCATAGGC	59.25	21	791
8	LAR1-R	CCTTTGATGAATATGTCATGAGTG	55.90	24	
9	LAR2-F	GGAGCAACCGGTTTCATTGGT	61.43	21	785
10	LAR2-R	ATGAAAATGTCGTGCGTGAA	56.66	20	
11	ANR1-m-R	ACAGCAGCAGCTGAAGATG	58.14	19	367
12	ANR2-m-R	CACAGCTGCGGCTGAAGAAGT	63.48	21	369
13	ANR3-m-R	ACAGCAGCTGCAGAGGATG	60.08	19	368
14	ANR1-m-F	AAGATCCCAGAAAAGACATGATCAAG	60.91	26	514
15	ANR2-m-F	AAGATCCTGAGAATGACATGATCAAA	58.66	26	515

16	ANR3-m-F	AAGATCCAGAGAATGACATGATCAAG	59.01	26	513
17	LAR1-m-R	CATTGTGAACTTTCCAATATC	50.85	23	572
18	LAR2-m-R	TTCATCGTGAATTTCCGATATC	55.23	21	570
19	LAR1-m-F	GTCAAAGCTTACTTTGTTGATGGC	59.32	24	269
20	LAR2-m-F	CAAAGCTTACTTTGTTGCAGGC	59.20	20	261

c.2. Analisis sekuen produk PCR

Untuk mengetahui identitas fragmen DNA hasil amplifikasi PCR, dilakukan analisis dengan cara membandingkan sekuen DNA dan prediksi asam amino dengan aksesori yang terdeposit pada pangkalan data GenBank NCBI menggunakan algoritma BLASTn dan BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Translasi sekuen DNA menjadi asam amino menggunakan perangkat lunak DNAMAN ver. 4.03 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada). Analisis pensejajaran sekuen basa nukleotida dan prediksi asam amino produk PCR menggunakan perangkat lunak GeneDoc ver. 2.7 (Nicholas *et al.* 1997). Pohon filogenetik didisain berdasarkan metode Neighbor-Joining menggunakan perangkat lunak MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

C.3. Identifikasi situs *single nucleotide polymorphism* (SNP) gen *leucoanthocianidin reductase* (LAR) dan *anthocianidin reductase* (ANR) yang berasal dari tanaman salak dan kerabatnya

Analisis SNP dan identifikasi situs SNP yang *non-synonymous*

Untuk mengetahui situs-situs SNP, masing-masing fragmen LAR dan ANR yang diperoleh disejajarkan menggunakan perangkat lunak Geneious ver. 5.6.6 versi percobaan (Biomatters, USA). Situs yang digunakan untuk marka seleksi adalah situs yang dapat merubah asam amino atau disebut SNP yang *non synonymous*, yang biasanya basa nukleotida tersebut terletak pada urutan pertama atau kedua dari kodon. SNP yang *synonymous* adalah situs yang tidak merubah asam amino dan biasanya terletak pada urutan basa nukleotida ketiga dalam kodon.

Pembuatan marka *single nucleotide amplified polymorphism* (SNAP) berdasarkan SNP non-synonymous pada fragmen gen LAR dan ANR akan dilanjutkan pada kegiatan penelitian berikutnya.

C.4.Publikasi data sekuen pada GenBank

Data sekuen yang diperoleh dapat langsung dikirimkan untuk dipublikasikan pada GenBank, setelah dimasukkan menggunakan perangkat lunak Sequin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Sequin/>).

IV. ANALISIS RISIKO

Identifikasi Resiko	Deskripsi resiko	Penyebab	Akibat	Penanganan Resiko
Waktu pelaksanaan: Ketidaktepatan waktu pelaksanaan	Terlambat memulai kegiatan penelitian	<ul style="list-style-type: none"> • Keterlambatan pencairan dana • Legalisasi proposal terlambat • Persyaratan administrasi keuangan belum lengkap • Komunikasi antar sektorkurang lancer • Keterlambatan penyediaan bahan penelitian 	Keterlambatan pelaksanaan kegiatan	<ul style="list-style-type: none"> • Percepatan legalisasi proposal • Meningkatkan koordinasi dengan pihak terkait
Pelaksanaan kegiatan: Permasalahan pelaksanaan analisis PCR	Sumberdaya manusia terbatas Alat yang diperlukan bermasalah	Kurangnya tenaga trampil untuk analisis PCR Terdapat kerusakan pada alat	Memperlambat perolehan data Tidak dapat beraktifitas	<ul style="list-style-type: none"> • Melaksanakan Lembur hari Sabtu dan Minggu • Penambahan tenaga trampil • Kerjasama dengan Perguruan Tinggi • Tenaga outsourcing • Servis alat • Kalibrasi alat
Pelaporan : Hasil akhir belum lengkap		Data masih dalam proses pengumpulan	Laporan belum menginformasikan hasil akhir	Mempercepat perolehan data dan tetap membuat laporan semaksimal mungkin

V. TENAGA DAN ORGANISASI PELAKSANAAN

5.1. Tenaga yang terlibat dalam kegiatan

Susunan tenaga berdasarkan disiplin, pendidikan, jabatan fungsional, alokasi waktu, disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Tenaga yang terlibat dalam kegiatan

No	Nama /NIP	Jabatan Fungsional / Bid Keahlian	Jabatan dalam Kegiatan	Uraian Tugas	Alokasi waktu (jam/mgg)
1	Dr. Ellina Mansyah, MP19630423 199103 2001	PMDY/Pemuliaan	Penanggung jawab RPTP dan ROPP Manggis	Mengkoordinir kegiatan sejak perencanaan, pelaksanaan, pelaporan RPTP dan ROPP manggis	10
2	Dr. Agus Sutanto MSc 19670803199303 1 003	PMD/Pemuliaan	Penanggungjawab ROPP Salak	Mengkoordinir ROPP salak, Pelaksaan kloning, sekuensing	10
3	P Jarot Santosa SP. MSc 19700321 199903 1 002	PMD/Pemuliaan	Anggota	Analisis PCR, Pelaksaan kloning, sekuensing dan analisis data	25
4	Ir. Karsinah MSi 196201061989032002	PMDY/Pemuliaan	Penanggungjawab ROPP mangga	Mengkoordinir ROPP mangga	25
5	Ir. Sri Hadiati, MP196402271989032001	PMDY/Pemuliaan	Anggota	Penanganan materi penelitian salak dan data morfologi	15
6	Ir. NLP Indriyani MP 1965012 6 1989032 001	PMDY/Pemuliaan	Anggota	Penanganan materi penelitian durian dan data morfologi	10
7	Makful, SP. MSi. 19730528 200003 1 001	PMD/Pemuliaan	Penanggungjawab ROPP durian	Mengkoordinir ROPP durian, pelaporan	10
8	Ir. Rebin 19780916 200812 2 003	PMDY/Pemuliaan	Anggota	Hibridisasi mangga	10
9	Riry Prihatini, SP, Msi 198210022005012001	PP/Pemuliaan	Anggota	Isolasi fragmen DNA, Analisis PCR, analisis data	25
10	Ir. Tasliah Msi 196909042001122001	Pemuliaan/BB-Biogen	Anggota	Analisis PCR mangga	10
11	Dwi Wahyuni Ardiana 197602252007012001	Litkayasa	Teknisi	Pelaksanaan analisis PCR	10
12.	Kusrini Setiowati 197008201995032003	-	Teknisi	Pengumpulan data morfologi mangga	10
13.	Abu Masnhur 196506021988031001	-	Teknisi	Pengumpulan data morfologi mangga	10

3.5. Jangka Waktu Kegiatan

Tabel 10. Jadwal Palang Rencana Kegiatan

No	Kegiatan	Bulan Kegiatan											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Persiapan	x	x	x									
2	Ekstraksi DNA	x	x	x	x	x	X						
3	Analisis PCR				x	x	X	x	X	X	x	X	x
4	Isolasi fragmen DNA				x	x	X	x	X	X	x	X	
5	Kloning dan Analisis sekuensing					x	X	x	X	X	x	X	
6	Publikasi pada genBank												x
7	Pelaporan											X	x
	Persentase fisik	15	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10	10
	Persentase Kumulatif	15	20	25	30	35	40	50	60	70	80	90	100

3.6. Pembiayaan

Tabel 11. Biaya Penelitian

No	Jenis Pengeluaran	Jumlah (Rp. 000)
1	Belanja Barang Untuk Persediaan Barang Konsumsi	139.000.000
2	Belanja Barang Non Operasional Lainnya	44.000.000
3	Belanja Perjalanan Biasa	36.000.000
	Jumlah	219.000.000

Tabel 12. Matriks Biaya

No	Jenis Pengeluaran	Volume	Satuan Ukur	Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Rp)
1	2	3	4	5	6
1	Belanja Barang Untuk Persediaan Barang Konsumsi				139.000.000
A	Pengadaan Bahan Kimia				104.602.500
	Primer	2489	Basa	10.000	24890.000
	KAPA2GFast ReadyMix PCR Kit @ 25 ml, KK5130	6	Kit	2500.000	15000.000
	Gel-red Biotium	2	Kit	2500.000	5000.000
	DNA ladder 100 bp Genaid (0,5 ml/vial), DL004	2	Vial	1500.000	3000.000
	Alkohol 96 % Bracto	21	Liter	38.500	808.500
	Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid), DF100	2	Kit	2500.000	5000.000
	High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid), PD100	2	Kit	2000.000	4000.000
	pGEM®-T Easy Vector System II (Promega), A1380	2	Kit	5500.000	11000.000
	IPTG, 1g/btl	1	Btl	600.000	600.000
	X-Gal 100 mg/btl	1	Btl	750.000	750.000
	Tryptone 500 g/btl	1	Btl	1250.000	1250.000
	Yeast Extract 500 g/btl	2	Btl	750.000	1500.000
	Glucose 1 kg/btl	2	Btl	1000.000	2000.000
	Ampicilin 5 g/btl	2	Btl	1750.000	3500.000
	DNA isolation KIT, 100 reaksi	3	Box	2650.000	7950.000
	PCR mix 2000 reaksi	1	tube (200 reaksi)	2250.000	2250.000
	DMSO, 100 ml	2	100 ml	300.000	600.000
	Agarose, 100 gr	1	Botol	1560.000	1560.000
	Fluorescent Probe, TAMRA	1	Tube	750.000	750.000
	Fluorescent Probe, Cy5	1	Tube	1450.000	1450.000
	Fluorescent Probe, FAM	1	Tube	750.000	750.000
	Fluorescent Probe, HEX	1	Tube	750.000	750.000
	Generuler 100bp DNA Ladder	1	Tube	1144.000	1144.000
	DNA isolation KIT, 100 reaksi	2	Box	2650.000	5300.000
	TAE buffer 50x, 1 liter	4	Botol	850.000	3400.000
	Aquabidest	2	Liter	45.000	90.000
	Aquadest	10	Liter	5.000	50.000

B	Pengadaan Bahan Penunjang				32371.500
	Micro volume tip 0.5-10 ul Gilson type (1000/pak)	15	Pak	300.000	4500.000
	PCR tube 0,2 ml, flat cap (1000/pak)	15	Pak	800.000	12000.000
	Microtube rack + lid 80 X 1,5/2,0 ml	4	Bh	200.000	800.000
	PCR tube rack + lid 96 X 0,2 ml	8	Bh	150.000	1200.000
	Aquabides Kimia Farma 500 ml/btl	2	Btl	25.000	50.000
	Sarung tangan karet ukuran M sensi glove	4	Ktk	75.000	300.000
	Falcon Steril Plastic Petridish 100 X 15mm (500 pcs/box)	2	Box	1500.000	3000.000
	Aquabides Kimia Farma 500 ml/btl	4	Btl	25.000	100.000
	PCR plate, 10 pc	2	Plate	450.000	900.000
	1ml bulk, Non-sterile, RNase & DNase Free, Blue, 1,000 Tips/Bag	3	Bag	229.000	687.000
	200µl bulk, Non-sterile, RNase & DNase Free, Yellow, 1,000 Tips/Bag	7	Bag	125.000	875.000
	10µl bulk, Non-sterile, RNase & DNase Free, Clear, 1,000 Tips/Bag	7	Bag	125.000	875.000
	0.2ml, Flat caps, PP, RNase & DNase Free, Clear 1,000 Tubes/Pack	4	Bag	400.000	1600.000
	1.5ml, Clear, RNase & DNase Free, 500 Tubes/bag	2	Bag	160.000	320.000
	PCR plate, 0.2 mL 96 well , no skirt, sterile, RNase and DNase free, 5pcs/bag	6	Paket	200.000	1200.000
	8-stripe flat cap, sterile, RNase and DNase free, 120/pack	3	Paket	432.000	1296.000
	Tisu gulung	10	Gulung	10.000	100.000
	Cryobox	20	Buah	125.000	2500.000
	Kanebo	1	Buah	68.500	68.500
C	Pengadaan Bahan ATK				2026.000
	Kertas A4 80g	4	rim	40.000	160.000
	Refil tinta printer Data Scan Hitam for Canon	4	btl	30.000	120.000
	Refil tinta printer Data Scan Kuning for Canon	2	btl	30.000	60.000
	Refil tinta printer Data Scan Merah for Canon	2	btl	30.000	60.000
	Refil tinta printer Data Scan Biru for Canon	2	btl	30.000	60.000
	Fotokopi	1000	lbr	150	150.000
	Jilid hardcover	5	expl	20.000	100.000
	Catridge Canon Colour CL-811	2	bh	220.000	440.000
	Catridge Canon Black PG-810	2	bh	278.000	556.000
	Pena trasnparan 4 warna	2	kotak	60.000	120.000
	Tisu gulung	20	gulung	10.000	200.000

2	Belanja Barang Non Operasional Lainnya				44000.000
	Membantu kegiatan lab (isolasi DNA, PCR, elektroforesis)	396	HOK	50.000	19800.000
	Sequencing	70	sampel	260.000	18200.000
	gene scanning	2	paket	3000.000	6000.000
5	BELANJA PERJALANAN BIASA				36000.000
	Koordinasi Dengan Biogen (ROPP Salak)				
	- Lunsum	4	HOK	430.000	1720.000
	- Transportasi (pp)	1	paket	2100.000	2100.000
	- Penginapan	3	malam	460.000	1380.000
	Koodinasi dengan BB Biogen,Cukur gondang Bogor Bogor				
	Lumpsum	4	HOK	430.000	1720.000
	- Transportasi (pp)	1	paket	2000.000	2000.000
	- Penginapan	3	malam	460.000	1380.000
	Cukur Gondang-Solok				
	- Lunsum	4	HOK	380.000	1520.000
	- Transportasi (pp)	1	paket	4000.000	4000.000
	- Penginapan	3	malam	460.000	1380.000
	Solok-Subang				
	Transportasi PP	2	paket	2000.000	4000.000
	Lunsum	8	HOK	430.000	3440.000
	Penginapan	6	malam	300.000	1800.000
	Solok-Bogor				
	Transportasi PP	1	kali	2000.000	2000.000
	Transportasi Lokal	1	paket	600.000	600.000
	Lunsum	3	HOK	430.000	1290.000
	Penginapan	2	malam	300.000	600.000
	Solok-Jakarta				
	Transportasi PP	1	kali	2200.000	2200.000
	Transport lokal	1	paket	600.000	600.000
	Lumpsum	3	HOK	500.000	1500.000
	penginapan	2	malam	385.000	770.000
	TOTAL BIAYA				219.000.000

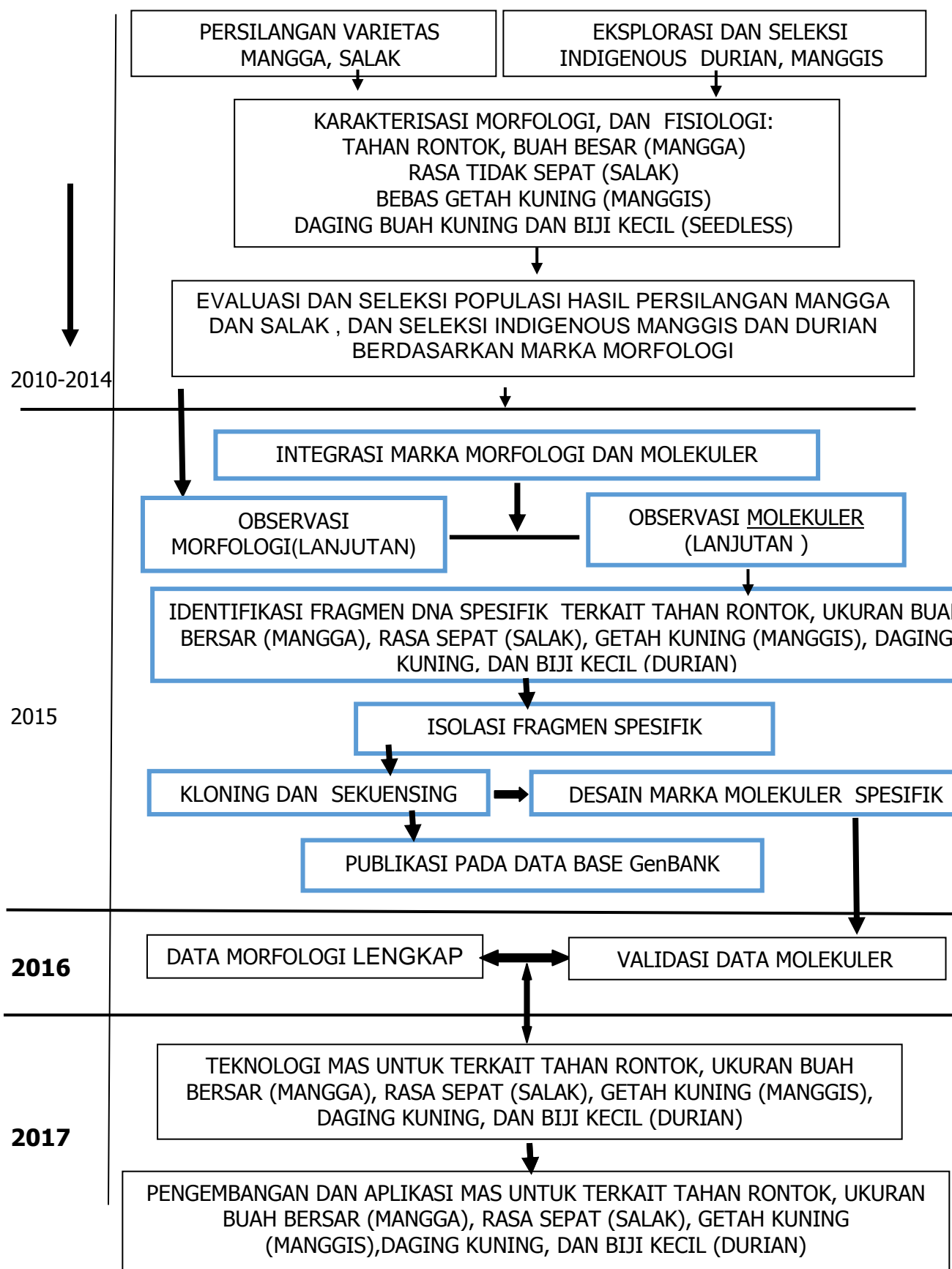
DAFTAR PUSTAKA

- Albani ,MC, Battey NH, Wilkinson MJ. 2004. The development of ISSR-derived SCAR markers around the SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL) in *Fragaria vesca*. *Theor Appl Genet.* 2004 Aug;109(3):571-9. Epub 2004 Jun 26
- Bernatzky, R. and D.L. Mulcahy. 1992. Marker-aided selection in a backcross breeding program for resistance to chestnut blight in the American chestnut. *Can. J. For. Res.* 22:1031–1035
- Castillo, C. O., K.J. Chalmers, R. Waugh, W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 934–940
- Darmono, T.W. 1996. Ulas Balik, Analisis Keragaman Tanaman dengan Teknik Molekuler (Analysis of Plant Genetic Variation with Molecular Technique). *Hayati*, 3 (1) : 7-11.
- Doyle, J.F. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Tissue. *Phytochem. Bull.* 12:13-15.
- Gardiner, S.E., H.C.M. Bassett, D.A.M. Noiton, V.G. Bus, M.E. Hofstee, and A.G. White. 1996. A detailed linkage map around an apple scab resistance gene demonstrates that two disease resistance classes both carry the *Vf* gene. *Theor. Appl. Genet.* 93:485–493.
- Gebrehiwot, L., P.R. Beuselinck, and C.A. Roberts. 2002. Seasonal variation in condensed tannin concentration of three *Lotus* Species. *Agronomy Journal*, 94: 1059 – 1065.
- Hadiati, S., C. Hermanto, E.Mansyah, Edison Hs, Fitriana Nasution, N.L.P. Indriyani. *Pengelolaan Plasma Nutfah Tanaman Buah Tropika. Laporan Hasil Penelitian Balitbu Tropika.* 2013.
- Lege, K.E., Smith C.W., and Cothren J.T. 1993. Planting date and plant density effects on condensed tannin concentration of cotton. *Crop Science*, 33(2) : 320 – 324.
- Levebvre, V., B. Goffinet, J.C. Chauvet, B. Caromel, P. Signoret, R. Brand, and A. Palloix. 2001. Evaluation of genetic distance between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: Comparison of AFLP, RAPD, and phenotypic data. *Theor Appl Genet* 102:741–750.
- Manoj, P, Banerjee, NS, Ravichandran, P. 2005. 'Development of sex specific molecular markers in dioecious *Piper longum* plants by differential display'. *Journal of Theoretical and Applied Information Technology* © 2005 - 2008 JATIT. All rights reserved. www.jatit.org459-465.
- Mansyah, E. 2012. Struktur genetik manggis (*Garcinia mangostana* L.) berbasis marka morfologi dan molekuler. Disertasi. Sekolah Pasca Sarjana Institut . Pertanian bogor. 137 hal
- Nicholas KB, Nicholas HB Jr, Deerfield DW II. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EmbNet News* 4:1–4.
- Poehlman JM, Sleper D.A. 1995. *Breeding Field Crops*, Iowa State University Press

- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225–238
- Purnomo, S. 1994. Kaitan aktivitas beberapa enzim dengan sifat buah dan pola pewarisannya pada persilangan dialil salak Bali dan Pondoh. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Rozen, S. and H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.
- Salawn, MB., Acamovic T., Stewart C.S., and Maasdorp, B.V. 1977. Assesment of the nutritive value of calliandra calothyrsus : its chemical composition, and the influence of tannins, pipe colic acid and polyethylene glycol on in vitro organic matter. *Animal Feed Science and Technology*, 69(1/3) : 207 – 217.
- Santoso, PJ. 2013. Marka SSR pada durian matahari (unpublished data)
- Sobir, Sriani Sujiprihati¹, and Evalina C. Pandia. Development SCAR Marker for Detection Sex Expression in Papaya (*Carica papaya* L.) from Several Genetics Backgrounds Diterima 23 April 2008/Disetujui 10 September 2008
- Springer, T.I., R.L. McGraw and G.E. Aiken. 2002. Variation of Condensed Tannins in Roudhead Lespedeza Germplasm. *Crop Science* , 42 : 2157 – 2160.
- Striem, M.J., H.G. Ben, and P. Spiegel-Roy. 1996. Identifying molecular genetic markers associated with seedlessness in grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:758–763.
- Tanksley SD. 1983. Molecular marker in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1(1):3-5.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
- Tanner GJ, Francki KT, Abrahams S, Watson JM, Larkin PJ, Ashton AR. 2003. Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *J Biol Chem*, 278:31647–31656.
- 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 Acid Research* 18(22):6531-6535
- Yakushiji, H., Nakatsuka, A. 2007. Recent persimmon research in Japan. *Japanese Journal of Plant Science*. 1(2): 42-62.
- Yonemori, K., Yamada, M. and Sugiura, A. (2000). Persimmon genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 19:191-225.

Xie, D-Y, Sharma, SB., Dixon, RA. 2004. Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 422: 91–102

ROAD MAP KEGIATAN PENELITIAN



Lampiran 2. MATRIK KERANGKA LOGIS T.A. 2015

LOGIKA INTERVENSI	TOLOK UKUR	ALAT VERIFIKASI	ASUMSI/ RESIKO
<p>Sasaran :</p> <p>Terpublikasikannya data sekuen genome mangga, salak, durian, dan manggis pada data genBank</p> <p>Diperoleh masing-masing satu kandidat marka molekuler penanda ukuran buah dan tahan rontok pada manga, dua kandidat marka molekuler penanda rasa sepat pada salak, satu kandidat marka molekuler penanda warna daging buah kuning dan ukuran biji kecil pada durian</p>	<p>Diperoleh 25 data analisis sekuen mangga, salak, durian, dan manggis</p> <p>Diperoleh masing-masing satu kandidat marka molekuler penanda ukuran buah dan tahan rontok pada manga, dua kandidat marka molekuler penanda rasa sepat pada salak, satu kandidat marka molekuler penanda warna daging buah kuning dan ukuran biji kecil pada durian</p>	<p>Print Screen Publikasi online 25 data analisis sekuensing genome tanaman buah tropika pada database genBank</p> <p>Laporan Hasil Penelitian Balitbu</p>	
<p>Manfaat:</p> <p>Efisiensi waktu, biaya, dan tenaga, dalam proses pemuliaan tanaman buah yang berumur panjang</p> <p>Melindungi sumberdaya genetik tanaman buah Indonesia dengan</p> <p>Meningkatkan jumlah publikasi pada jurnal nasional / internasional</p>	<p>Lebih pendeknya proses pemuliaan tanaman buah setelah diemukannya marka telah ditemukan</p> <p>tersedia data sidik jari DNA dan data sekuensingnya sampel tanaman yang digunakan sebagai penciri genetiknya</p> <p>Tepublikasinya 25 data hasil analisis sekuen pada database genBank</p>	<p>Data produk PCR dan data sekuensing materi plasmanutfah yang digunakan.</p> <p>Print Screen Publikasi online 25 data analisis sekuensing genome tanaman buah tropika pada database genBank</p>	<p>Dana dan prasarana mendukung Kebijakan Balai dan Puslitbang-horti mendukung Keamanan data terjamin</p>

