



## TINJAUAN PUSTAKA SISTEMATIS: KARAKTERISASI KEANEKARAGAMAN GENETIK SPESIES JERUK (*Citrus* sp.) MENGGUNAKAN PENANDA SIMPLE SEQUENCE REPEAT (SSR)

Eryka Oktaviana<sup>1\*</sup>, Ning Setiati<sup>1</sup>, Yustinus Ulung Anggraito<sup>1</sup>

Program Studi Magister Pendidikan Ilmu Pengetahuan Alam, FMIPA, Universitas Negeri Semarang

Corresponding: eryka\_oktaviana@students.unnes.ac.id

### Abstract

**Background:** The biodiversity of citrus plants is very abundant and many are cultivated, creating various types. However, the high demand makes orange farmers feel overwhelmed. This is what causes some orange cultivars to become rare. Characterization of the genetic diversity of citrus germplasm at the molecular level is an important and crucial step that can assist in the breeding and conservation process. The aim of this literature review is to provide information regarding molecular markers regarding the application of SSR molecular markers to analyze the genetic diversity of citrus.

**Method:** The method used is a systematic literature review with the literature sources used coming from articles taken from national journals and international journals indexed by Scopus.

**Results:** The application of molecular markers using the SSR method is useful for identifying and characterizing the genetic diversity of citrus germplasm so that it can assist in breeding and conservation actions. SSR has many advantages both in terms of its use and the results obtained.

**Conclusion:** One application of molecular markers is to analyze plant genetic diversity. Simple Sequence Repeat (SSR) molecular markers can help to analyze the characteristics and genetic diversity of oranges so that they can assist in plant breeding and conservation purposes.

**Keywords:** Plant Genetic Diversity, Molecular Markers, SSR, *Citrus* sp.

### Abstrak

**Latar Belakang:** Keanekaragaman hayati tumbuhan jeruk sangat melimpah dan banyak dibudidayakan sehingga menciptakan berbagai jenis. Namun, tingginya permintaan membuat para petani jeruk merasa kewalahan. Hal inilah yang menyebabkan beberapa kultivar jeruk mulai jarang ditemukan. Karakterisasi keanekaragaman genetik plasma nutfah jeruk pada tingkat molekuler merupakan langkah penting dan krusial yang dapat membantu dalam proses pemuliaan dan konservasi. Tujuan dari tinjauan pustaka ini adalah untuk memberikan informasi mengenai penanda molekuler mengenai aplikasi penanda molekuler SSR untuk menganalisis keanekaragaman genetik jeruk.

**Metode:** Metode yang digunakan yaitu tinjauan pustaka sistematis dengan sumber pustaka yang digunakan berasal dari artikel-artikel yang diambil dari jurnal nasional dan jurnal internasional yang terindeks Scopus.

**Hasil:** Aplikasi penanda molekuler dengan metode SSR berguna untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi keanekaragaman genetik plasma nutfah jeruk sehingga dapat membantu dalam tindakan pemuliaan dan konservasi. SSR memiliki banyak keunggulan baik secara penggunaannya maupun hasil yang diperoleh.

**Kesimpulan:** Aplikasi penanda molekuler salah satunya adalah untuk menganalisis keanekaragaman genetik tumbuhan. Penanda molekuler Simple Sequence Repeat (SSR) dapat membantu untuk menganalisis karakteristik dan keanekaragaman genetik jeruk sehingga dapat membantu dalam tujuan pemuliaan tanaman dan konservasi.

**Kata Kunci:** Keanekaragaman Genetik Tumbuhan, Penanda Molekuler, SSR, *Citrus* sp.



## **PENDAHULUAN**

Pemanfaatan keanekaragaman hayati dan non-hayati tidak boleh digunakan secara berlebihan dan harus memperhatikan kondisi populasinya agar dapat memperoleh pemanfaatan secara berkelanjutan (Mudaningrat et al., 2023). Dalam upaya menjaga sumber daya alam serta biodiversitas perlu diadakannya langkah konservasi agar pemanfaatan sumber daya alam dan biodiversitas senantiasa terjaga untuk kesejahteraan masyarakat (Guntur & Slamet, 2019). Menurut WWF (2012), alasan paling utama dari hilangnya biodiversitas adalah: rusaknya habitat, adanya perubahan iklim karena pemanasan global, eksploitasi yang berlebihan, adanya pencemaran lingkungan, ketidaksengajaan atau kecelakaan dan datangnya spesies asing. Apabila penyebab tersebut tidak ditangani dengan serius maka dapat menyebabkan kepunahan satwa baik flora dan fauna yang diantaranya mungkin terancam punah sehingga dapat mempengaruhi kelangsungan hidup makhluk hidup.

Jeruk adalah genus keluarga Rutaceae yang penting secara komersial dan tanaman buah-buahan yang dibudidayakan secara luas di dunia dimana yang dibudidayakan kemungkinan berasal dari tiga spesies leluhur yaitu *Citrus reticulata*, *C. grandis* dan *C. medica* (Biswas et al., 2011). Jeruk (*Rutaceae*) merupakan salah satu budidaya kuno yang paling penting di dunia dengan produksi tahunan sekitar 1,02 ratus juta ton (Ben Romdhane et al., 2016). Meskipun misteri sejarah dan asal usulnya masih belum terpecahkan, budidaya di seluruh dunia dan produksi buah jeruk dengan permintaan tinggi (genus *Citrus* dalam keluarga *Rutaceae*) membuatnya menonjol di antara tanaman buah-buahan (Liu et al., 2012).

Buah jeruk dikonsumsi dan dinikmati di seluruh dunia karena rasanya yang segar dan juiciness (Matheyambath et al., 2016). Jeruk memiliki banyak kandungan didalamnya, sehingga banyak orang menyukai buah satu ini. Mereka terkenal dengan kandungan vitamin C, asam folat, dan karotenoidnya. Selain vitamin dan mineral penting, buah jeruk juga kaya akan banyak senyawa fitokimia bioaktif seperti limonoid dan flavonoid (Matheyambath et al., 2016). Namun,

tingginya permintaan akan produksi jeruk membuat para petani jeruk merasa kewalahan. Hal inilah yang menyebabkan beberapa kultivar jeruk mulai jarang ditemukan. Oleh karena itu, karakterisasi keanekaragaman genetik plasma nutfah jeruk pada tingkat molekuler merupakan langkah penting dan krusial dalam pemanfaatannya dalam pemuliaan dan konservasi (Munankarmi et al., 2023).

Dalam beberapa dekade terakhir, data biokimia elektroforesis protein, dan isozim (Biswas et al., 2011), Mikrosatelit (SSR) (Amar et al., 2011), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Nicolosi et al., 2000), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Pang et al., 2014), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) (Kumar et al., 2010), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) (Biswas et al., 2010), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Abkenar et al., 2004), dan analisis genom organel (Cheng et al., 2003), telah digunakan untuk menguji hubungan antara taksa jeruk. SSAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism) dan SAMPL (Selectively Amplified Microsatellite Polymorphic Loci) telah banyak digunakan untuk mempelajari hubungan genetik dan konstruksi peta keterkaitan pada beberapa spesies tanaman (Biswas et al., 2011). Berbagai penanda molekuler seperti Amplifikasi Acak DNA Polimorfik (RAPD), Polimorfisme Teramplifikasi Terkait Sekuens (SRAP), Polimorfisme Panjang Fragmen Teramplifikasi (AFLP), Pengulangan Sekuens Sederhana (SSR), Polimorfisme Nukleotida Tunggal (SNP), ISSR dan lainnya telah digunakan untuk membuat peta keterkaitan genetik (Amiteye, 2021; Yue et al., 2022).

Pilihan teknik penanda mana yang akan diterapkan sangat bergantung pada pemahaman tentang tujuan yang ditetapkan, tingkat antisipasi variasi genetik dan data yang akan dihasilkan dari sampel penelitian, ukuran sampel yang akan digunakan, aksesibilitas probe atau set primer, ketersediaan pengetahuan teknis dan fasilitas yang sesuai, pertimbangan waktu dan keuangan (Anne, 2006). Ciri-ciri penanda DNA yang baik dan sangat berguna adalah penanda tersebut terdapat di berbagai tempat dan tersebar merata di seluruh genom, mudah untuk diuji,

hemat biaya, multipleks dan dapat diotomatisasi (Amiteye, 2021). Karakteristik tambahan dari penanda DNA molekuler yang sangat baik adalah bahwa penanda tersebut tidak menimbulkan efek merugikan pada fenotip, bersifat spesifik genom, dan multifungsi (Kordrostami & Rahimi, 2015). Masalah biasanya muncul adalah ketika memilih penanda DNA yang paling tepat di antara sekian banyak pendekatan penanda yang berbeda. Secara umum, pilihan teknik penanda molekuler harus merupakan kompromi antara keandalan dan kemudahan analisis, kekuatan statistik, dan keyakinan dalam mengungkap polimorfisme (Agarwal et al., 2008).

Mikrosatelit atau yang dikenal dengan penanda SSR adalah bentangan yang mengandung pengulangan unit nukleotida pendek atau dikenal pengulangan tandem pendek (STR) (Cmejlova et al., 2021; Zhang & Min, 2005). Penanda SSR telah banyak digunakan dalam penelitian genetika tanaman. SSR dianggap sebagai penanda molekuler yang ideal dalam penelitian pemuliaan genetik dan banyak digunakan untuk mempelajari keanekaragaman genetik tanaman, asal usul dan analisis hubungan plasma nutfah yang dibudidayakan, identifikasi plasma nutfah keturunan hibrida dan studi stabilitas genetik (Zhu et al., 2023).

SSR dikembangkan berdasarkan data transkriptome terutama berfokus pada gen fungsional (Zhu et al., 2023). Dengan menggunakan serangkaian penanda SSR yang sangat informatif, kemungkinan kesesuaian antara dua individu yang dipilih secara acak dapat diminimalkan, dan keluaran genotipe SSR umumnya dianggap cukup konklusif (Cmejlova et al., 2021). Penanda SSR memiliki kandungan informasi polimorfik (PIC) yang tinggi dengan urutan yang sangat kekal karena reproduktifitasnya yang tinggi, sifatnya yang multi alel sehingga mereka berguna untuk mengintegrasikan peta fisik berbasis urutan pada spesies tanaman dan telah membuka jalan bagi pemula dan ahli genetika dengan alat yang efisien untuk menghubungkan variasi fenotipik dan genotipik (Sabreena et al., 2021; Zhu et al., 2023).

Berdasarkan uraian tersebut, maka diperlukan tinjauan yang lebih mendalam

mengenai aplikasi penanda molekuler khususnya pada penggunaan metode Simple Sequence Repeat (SSR) untuk menganalisis keanekaragaman genetik dari spesies jeruk. Tujuan dari analisis tinjauan pustaka sistematis ini adalah untuk menganalisis aplikasi penanda molekuler SSR yang digunakan untuk menganalisis karakterisasi keanekaragaman genetik spesies jeruk. Dengan adanya tulisan ini, diharapkan dapat memberikan informasi mengenai penanda molekuler dengan metode SSR untuk menganalisis keanekaragaman genetik jeruk sehingga dapat membantu dalam tujuan pemuliaan tanaman dan konservasi.

## **MATERI DAN METODE**

Kajian studi literatur ini dilakukan pada bulan September sampai Desember 2023. Sumber pustaka yang digunakan berasal dari artikel yang diambil dari jurnal nasional serta jurnal internasional yang terindeks Scopus. Pencarian artikel menggunakan mesin pencarian Google Scholar, Sciencedirect dan Springer. Penyusunan tinjauan pustaka sistematis diawali dengan memilih topik yang akan direview dan melakukan pelacakan atau pemilihan artikel yang cocok atau relevan dengan topik. Tahap berikutnya melakukan analisis dan mengorganisasikan artikel. Data yang diperoleh akan dianalisis secara deskriptif dan dibahas berdasarkan hasil riset/penelitian dari berbagai sumber yang memiliki hubungan dengan judul tinjauan pustaka (Ningsih et al., 2022).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Deskripsi ringkasan data dari studi yang disertakan

Nama dan Tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
Ben Romdhane et al., (2016)	Patterns of genetic structure and evidence of gene flow among Tunisian Citrus species based on informative nSSR markers	Sample 40 aksesi dari 8 spesies jeruk diekstraksi DNA melalui tahap isolasi DNA. Kemudian tahap analisis SSR menggunakan 15 pasangan primer SSR. Selanjutnya tahap PCR menggunakan primer SSR forward dan reverse (TAA15, TAA41, CAC23, ATC09). Pemisahan produk hasil PCR dengan elektroforesis pada gel agarosa 2,6%. Ukuran fragmen yang diamplifikasi dengan DNA ladder 100 base pair. Kemudian data dianalisis menggunakan perangkat lunak GENETIX 4.02, GENETOP, dan DARwin.	Studi ini menyelidiki sejauh mana keragaman genetik, hubungan filogenetik, dan jumlah aliran gen di antara spesies Jeruk Tunisia berdasarkan serangkaian 15 penanda molekuler SSR nuklir yang informatif. Data genotipe menyoroti kekayaan alel di antara spesies Jeruk Tunisia dan telah memungkinkan deteksi 168 alel di antaranya 104,19 efektif. Pembagian keanekaragaman genetik total ( $HT = 0,832$ ) menunjukkan bahwa jumlah variasi tertinggi pada spesies Jeruk adalah $HS = 0,550$ , sedangkan jumlah relatif GST keanekaragaman genetik antar spesies tidak melebihi 0,338. Pola struktur genetik tersebut didukung oleh nilai FST berpasangan rendah hingga sedang dan adanya aliran gen ( $Nm$ ) di antara delapan spesies Jeruk. Diferensiasi genetik terendah terjadi antara spesies <i>Citrus sinensis</i> dan <i>Citrus insitorum</i> ( $FST = 0,111$ , $Nm = 1,99$ ), sedangkan diferensiasi genetik tertinggi tercatat antara spesies <i>Citrus aurantifolia</i> dan <i>Citrus paradisi</i> ( $FST = 0,367$ , $Nm = 0,43$ ). Analisis Neighbor Joining yang telah dilakukan menunjukkan bahwa semua genotipe tersebar secara luas dan dikelompokkan secara jelas berdasarkan spesies asal mereka, dengan sedikit pengecualian.
Munankarmi et al., (2023)	Characterization of the genetic diversity of Citrus species of Nepal using simple sequence repeat (SSR) markers	Total 45 sampel daun Citrus spp berbeda. dan DNA diekstraksi sesuai dengan metode ekstraksi CTAB. Sebanyak 60 alel putatif diamplifikasi pada 12 lokus SSR pada 45 aksesi, dengan rata-rata 5 alel per lokus. Ukuran alel yang diperkuat berkisar antara 80 - 270 bp.	Dalam penyelidikan ini, kami bertujuan untuk menggunakan 12 penanda SSR untuk mengkarakterisasi keragaman genetik dari empat puluh lima aksesi Jeruk. Ke-12 pasangan primer SSR yang digunakan dalam penelitian ini berhasil mengamplifikasi seluruh Citrus spp. sampel dan menunjukkan polimorfisme 100%, yaitu, tidak ada pita monomorfik yang diamati untuk semua 12 pasangan primer SSR. Sebanyak 60 alel putatif diamplifikasi pada 12 lokus SSR dengan rata-rata 5 alel per lokus. Nilai PIC berkisar antara 0,497 dengan primer TAA 27 hingga 0,802 dengan primer TAA 41 dengan nilai rata-rata 0,662. Probabilitas identitas (PI) berkisar antara 0,075 hingga 0,383 dengan nilai rata-rata sebesar 0,143. Heterozigositas yang diamati ( $H_o$ ) berkisar antara 0,460 hingga 0,794 dan Heterozigositas yang diharapkan ( $H_e$ ) berkisar antara 0,460 hingga 0,794. Indeks Informasi (I) Shannon berkisar antara 0,677 hingga 1,678. Analisis koordinat utama (PCO) menunjukkan sumbu koordinat utama pertama menyumbang 20,35% dan sumbu kedua menyumbang 11,43% dari total variasi. Pengklasteran UPGMA menggunakan koefisien kemiripan Jaccard mengelompokkan 45 aksesi ke dalam empat klaster. Pasangan marka yang digunakan berhasil mengamplifikasi seluruh Citrus spp.

Nama dan Tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
Samarina et al., (2021)	Genetic diversity and phylogenetic relationships among citrus germplasm in the Western Caucasus assessed with SSR and organelle DNA markers	Dalam penelitian kami, 130 aksesi jeruk yang berbeda termasuk 24 spesies atau interspesifik diselidiki secara genetis menggunakan 13 penanda biparental (ncSSR) dan 13 uniparental (orgDNA). Setelah analisis struktur, aksesi tunggal dialokasikan ke delapan kelompok genetik dan hubungan mereka dijelaskan. Hubungan filogenetik dikonfirmasi dengan analisis koordinat utama (PCoA) dan analisis ketidaksamaan menggunakan DARwin.	Kekerabatan filogenetik Jeruk dan kerabatnya berhasil diidentifikasi pada plasma nutfah jeruk berdasarkan penanda ncSSR dan orgDNA dan aksesi-aksesi tersebut dikelompokkan dalam 8 cluster genetik yang berbeda. Keanekaragaman genetik berdasarkan penanda DNA organel sangat rendah. Semua 19 haplotipe yang terdeteksi bersifat pribadi. Dalam empat cluster genetik (cluster 1, 3, 4 dan 7) hanya satu haplotipe yang diamati. Hal ini menimbulkan asumsi bahwa semua spesies dalam kelompok tersebut merupakan keturunan dari satu spesies nenek moyang yang sama. Keanekaragaman genetik yang tinggi diamati berdasarkan penanda ncSSR nuklir, sementara deteksi 19 haplotipe berbeda memungkinkan diferensiasi aksesi yang berbeda dalam koleksi kami. Kami mengidentifikasi dua puluh aksesi sebagai salah klasifikasi dan memindahkannya ke spesies yang benar. Penelitian kami menunjukkan bahwa kombinasi ncSSR dan orgDNA adalah alat yang efisien untuk memperkirakan keanekaragaman genetik, struktur genetik dan filogeni dalam koleksi plasma nutfah jeruk FRC SSC RAS. Hasil yang diperoleh sangat berharga untuk pengelolaan koleksi di masa depan dan penggunaan aksesi individu sebagai sumber daya genetik untuk budidaya jeruk dan pemuliaan batang bawah, terutama di daerah yang lebih dingin.
Golein et al., (2012)	Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (Citrus sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers	Sembilan belas aksesi jeruk yang terdiri dari 'Bakraee' dan beberapa varietas yang penting secara komersial menjadi sasaran analisis SSR dan PCR-RFLP. Dari setiap aksesi diambil empat helai daun muda dan diekstraksi total DNA genomnya. Daun digiling menjadi bubuk halus dalam nitrogen cair dan diresuspensi dalam buffer ekstraksi CTAB. Untuk amplifikasi DNA, 18 primer SSR awalnya disaring dan akhirnya 17 primer yang menghasilkan pita polimorfik yang dapat dicetak digunakan untuk analisis lebih lanjut. Data dianalisis dengan paket perangkat lunak NTSYS versi 2.02. Analisis cluster dilakukan dengan metode rata-rata aritmatika	Kekerabatan filogenetik tanaman jeruk dievaluasi menggunakan 19 aksesi dengan primer SSR. Ukuran fragmen yang diamplifikasi berkisar antara 80 hingga 263 bp. Sebanyak 103 alel terdeteksi oleh 17 marka SSR dengan rata-rata 6 alel per lokus. Jumlah alel terendah terdapat pada lokus TAA52 sebanyak 2 alel dan jumlah alel tertinggi terdapat pada lokus TC26 sebanyak 11 alel. Amplifikasi PCR pada daerah rbcL-ORF 106, trnD-trnT dan trnH-trnK menghasilkan pita monomorfik masing-masing 3100, 1600 dan 1900 bp. Dari tujuh enzim restriksi (RE) yang digunakan untuk pencernaan restriksi amplicon PCR, hanya lima (HinfI, MspI, TaqI, BspRI dan ScrFI) yang mampu menghasilkan polimorfisme. Hubungan filogenetik antar genotipe dengan paket software NTSYS versi 2.02. Data SSR membuktikan bahwa 'Bakraee' mempunyai kekerabatan genetik lebih banyak dengan jeruk nipis kasar (0,87) dan jeruk nipis manis (0,65) dibandingkan aksesi lainnya. Mengingat kesamaan ini, ada kemungkinan besar bahwa 'Bakraee' berasal dari <i>C. jambhiri</i> × <i>C. limettioides</i> . Untuk menguji probabilitas dan penentuan keturunan Bakraee, kami menggunakan analisis cpDNA pada genotipe yang diteliti menggunakan PCR-RFLP yang dendrogramnya.

Nama dan Tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
		kelompok berpasangan tidak tertimbang (UPGMA).	
Chai et al., (2013)	Transferability, polymorphism and effectiveness for genetic mapping of the Pummelo ( <i>Citrus grandis</i> Osbeck) EST-SSR markers	Sebanyak 212 CgEMS ( <i>Citrus grandis</i> EST MicroSatellite) dikembangkan dari urutan pummelo EST dalam penelitian kami sebelumnya (Biswas et al., 2012) (Tambahan CgEST_seq). Dalam penelitian ini kami menguji transferabilitas in silico dan polimorfisme penanda CgEMS dengan menerapkan strategi e-PCR, di mana pasangan sekuens primer dari <i>C. grandis</i> dipetakan ke sekuens kromosom semu <i>C. sinensis</i> yang dirangkai, perancah sekuens genom <i>C. clementina</i> , <i>C. reticulata</i> dan urutan EST <i>Poncirus trifoliata</i> . Hasil temuan selanjutnya divalidasi secara eksperimental dan hasilnya mengungkapkan bahwa 136 penanda memperkuat pita PCR yang diharapkan pada 8 aksesi pamel.	Dalam penelitian ini, kami mengevaluasi 212 penanda SSR turunan Pummelo EST (CgEMS) untuk kemampuan transfernya antar genera, polimorfisme, kemampuan pemetaan, dan kegunaannya untuk analisis keanekaragaman genetik. Di antara penanda ini, 136 merupakan pita yang diperkuat, 99 dapat ditransfer ke seluruh genera. Daya transfer CgEMS ke <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus reticulata</i> , <i>Citrus lemon</i> , <i>Fortunella</i> spp. dan <i>Poncirus</i> sp masing-masing sebesar 76%, 76%, 75%, 74% dan 73%. Sebaliknya, 52 (53%) penanda ditemukan bersifat polimorfik dan terpisah dalam populasi pemetaan. Pemisahan penanda dapat dikategorikan menjadi empat kelompok: informatif penuh (8%), informatif laki-laki (15%), informatif perempuan (19%) dan informatif sebagian (59%). Hubungan filogenetik antara jeruk dan kerabatnya yang diperoleh dengan CgEMS sesuai dengan taksonomi dan filogeni jeruk yang sudah ada. CgEMS berpotensi berfungsi sebagai penanda sempurna untuk menentukan variasi fenotip, sidik jari, pemetaan dan studi keragaman genetik pada <i>C. grandis</i> . Tingkat transferabilitas lintas genera yang tinggi terhadap penanda CgEMS telah memungkinkan inferensi filogenetik dalam Rutaceae.
Chen et al., (2011)	Genetic background of the citrus landrace 'Huarongdao Zhoupigan' revealed by simple sequence repeat marker and genomic analyses	Dua puluh aksesi genotipe jeruk yang terdiversifikasi dari genera berbeda digunakan, termasuk jeruk mandarin, jeruk manis, jeruk asam, pomelo, citron, Ichang papada, jeruk trifoliata dan kumkuat. Daun muda segar dikumpulkan, dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan pada suhu -80 ° C untuk ekstraksi DNA genom selanjutnya. Penelitian ini menggunakan penanda SSR (Simple Sequence Repeat) untuk menganalisis genetika 'Huarongdao	Pengamatan morfologi menunjukkan bahwa 'Huarongdao Zhoupigan' memiliki bentuk daun yang mirip jeruk mandarin, daging buah, kulit buahnya mudah dikupas dan kulit buahnya kusut, menyiratkan bahwa varietas ini kemungkinan merupakan hasil persilangan jeruk dan mandarin. Untuk mengungkap latar belakang genetik 'Huarongdao Zhoupigan', 21 aksesi jeruk dievaluasi menggunakan penanda SSR nuklir dan kloroplas serta informasi SNP seluruh genom. 'Huarongdao Zhoupigan' dikelompokkan dengan jeruk mandarin dan dikelompokkan erat dengan 'Yuanjiang Nanju' dalam analisis SSR nuklir dan dikelompokkan dengan jeruk asam 'Goutou', jeruk manis 'Dahong' dan jeruk pular 'Newhall' dalam analisis SSR kloroplas. Tingkat kesamaan urutan genom 'Huarongdao Zhoupigan' dengan bahasa mandarin sebesar 36,09%, dengan heterozigositas mandarin sebesar 46,50%; perbandingan kasar kedua bagian utama hampir 1:1, kecuali bagian yang tidak diketahui (19,11%) dan pummelo (1,46%). Dengan demikian, 'Huarongdao Zhoupigan' mungkin merupakan hibrida alami dengan jeruk asam

Nama dan Tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
		<p>Zhoupigan'. Analisis genom dilakukan untuk menggali hubungan filogenetik dan struktur genetik antar spesies jeruk. Analisis genom membantu dalam memahami hubungan genetik antar spesies jeruk dan cara mereka berkembang.</p>	<p>(hibrida seksual pamelon dan mandarin) sebagai induk benih dan mandarin sebagai induk serbuk sari.</p>
<p>Kawano et al., (2021)</p>	<p>Production of doubled-haploid (DH) selfed-progenies in 'Banpeiyu' pummelo [Citrus maxima (Burm.) Merr.] and its genetic analysis with simple sequence repeat markers</p>	<p>Penelitian ini menggunakan 'Banpeiyu' pummelo [Citrus maxima (Burm.) Merr.] lima buah pummelo haploid, yaitu BX1-BX5, dan BX1-DH digunakan untuk penelitian kami. BX1 diperoleh dari biji kecil melalui persilangan antara BP dan jeruk bali 'Ruby Red'. BX1-DH diinduksi dengan pengobatan kolkisin pada tunas aksila BX1. BX2 diperoleh dari benih yang belum berkembang melalui BP yang melakukan penyerbukan terbuka. Analisis genetik lima tanaman haploid (BX1-BX5) 'Banpeiyu' pummelo (BP), [Citrus maxima (Burm.) Merr.] menggunakan 32 marka simple sequence repeat (SSR) yang dilakukan dengan tujuan untuk memastikan asal usul gino genetik dan perbedaan genetik.</p>	<p>Hasilnya, semua tanaman haploid hanya memiliki salah satu alel BP, yang menegaskan bahwa tanaman tersebut berasal dari ginogenetik. Kami juga mengkonfirmasi bahwa BX1 dan haploid gandanya (BX1-DH) memiliki alel SSR yang persis sama. Menariknya, kelima haploid memiliki alel yang sama pada kelompok linkage (LG) 6 dalam kasus tiga penanda. Kemudian, kami melakukan penyerbukan sendiri pada tanaman DH dan persilangan timbal balik antara DH dan BP, yang memiliki ketidakcocokan diri yang kuat. Benih hasil persilangan ini berkecambah secara normal secara in vitro atau ex vitro dan berkembang menjadi bibit diploid, kecuali satu bibit tetraploid. Analisis genetik bibit ini dengan 32 penanda SSR mengungkapkan bahwa rasio segregasi dari 32 lokus pada keturunan 30 BP, 30 BP x DH dan 30 DH x BP sebagian besar sesuai dengan rasio yang diharapkan. Namun, rasio segregasi yang terdistorsi secara signifikan ditemukan pada satu, lima dan tiga penanda SSR untuk keturunan BP, BP x DH dan DH x BP. Semua dari 30 keturunan bawaan DH menunjukkan alel SSR yang persis sama dengan DH asli. Ini adalah contoh pertama di mana keturunan DH persilangan sendiri dan belakang pada tanaman buah-buahan dianalisis secara genetik menggunakan penanda SSR. Tingkat pembuahan pada BP selfing, BP x DH, DH x BP, dan DH selfing berturut-turut adalah 80,0, 30,0, 40,0, dan 30,0 %. Pada BP selfing, DH x BP, dan DH selfing, rata-rata jumlah benih yang berkembang per buah masing-masing adalah 48,8, 48,7, dan 18,2, sedangkan jumlah benih yang belum berkembang per buah masing-masing adalah 98,0, 51,0, dan 26,6. Dengan demikian, DH selfing menunjukkan produksi benih yang dikembangkan dan belum dikembangkan secara signifikan lebih sedikit dibandingkan dengan BP selfing dan DH x BP.</p>
<p>Ramadugu et al., (2015)</p>	<p>Genetic analysis of citron (Citrus medica L.) using simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms</p>	<p>Sebanyak 47 jeruk bersama dengan 7 kontrol non-sitron (masing-masing 2 jeruk pomelo dan papada, masing-masing 1 jeruk, mandarin, dan kumquat) dilibatkan dalam penelitian ini dan taksanya adalah CM1 – CM58. DNA genom</p>	<p>Total 161 alel diduga terdeteksi dalam dataset, dengan rata-rata 7 alel per lokus. Jumlah alel unik yang tercatat adalah 49 untuk semua taksa dan 6 untuk sitron saja (3 pada aksesori sitron hibrida diduga). Lokus mikrosatelit CF-AT13 dan CF-TA03 masing-masing memiliki maksimal 13 alel; lokus CF-ACA01 memiliki 3 alel, jumlah terendah yang tercatat untuk kumpulan data ini. Pengujian awal primer SSR dalam analisis qPCR berguna dalam memilih penanda untuk analisis sitron dan menentukan suhu optimal untuk amplifikasi. Cluster</p>

Nama dan Tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
		<p>diekstraksi menggunakan protokol setil trimetil amonium bromida (CTAB). Produk dari PCR MDH dan CF-AT13 di elektroforesis pada gel agarosa, amplikon dimurnikan menggunakan kit QiaEX II (Qiagen Inc., Valencia, CA), diklon ke vektor pCR4 Topo (Invitrogen, Carlsbad, CA) dan diurutkan menggunakan vektor-primer berbasis atau internal. Urutannya diselaraskan menggunakan Clustal W dan ditampilkan menggunakan perangkat lunak GeneDoc. Pengulangan urutan sederhana (SSR) atau mikrosatelit diamplifikasi menggunakan primer. Suhu annealing untuk PCR bervariasi dari 45 hingga 58 °C, tergantung pada primernya. Analisis kuantitatif real-time PCR (qPCR) dilakukan menggunakan sampel jeruk yang representatif dalam sistem ABI ViiA 7 qPCR (Applied Biosystems). Data yang dihasilkan untuk 47 aksesori (citron dan hibrida citron) dari 23 penanda mikrosatelit nuklir yang membedakan digunakan untuk melakukan analisis struktur populasi menggunakan Software Struktur 2.3. Untuk analisis gen kloroplas rps16, pohon MP dibuat menggunakan MEGA 6.0 dengan 54 sekuens yang dihasilkan dalam penelitian ini bersama dengan 14 sekuens rps16 lainnya. Amplikon yang dihasilkan</p>	<p>1 terdiri dari banyak citron liar Cina dan hibrida alami tertentu. Semua citron berjeri dan citron Cina tertentu yang tidak berjeri dikelompokkan dalam cluster 2. Sebagian besar citron lain yang dianggap berasal dari cekungan Mediterania dikelompokkan bersama dalam cluster 3. Jarak rata-rata antar individu di setiap cluster adalah: 0,5349 (cluster 1), 0,2192 (cluster 2) dan 0,3178 (klaster 3). Nilai rata-rata Fst (indeks fiksasi) untuk ketiga cluster adalah: 0,0012 (cluster 1), 0,4990 (cluster 2) dan 0,4864 (cluster 3). Pohon konsensus tetangga yang bergabung (NJ) dihasilkan dari data SSR. Semua aksesori dengan keturunan sitron, termasuk hibrida 'Suanmaliu' dan hibrida lemon 'India', membentuk clade yang berbeda dengan nilai bootstrap sebesar 84%. Namun, sebagian besar sub-kelas citron tidak memiliki dukungan bootstrap yang baik. Citron dari Tiongkok membentuk dua clade dan citron jenis etrog membentuk clade terpisah. Heterozigositas yang diamati dengan data mikrosatelit di semua taksa yang termasuk dalam penelitian berkisar antara 0 hingga 86,96%. Secara umum, jeruk sitrun memiliki tingkat heterozigositas yang lebih rendah dibandingkan jeruk papeda, mandarin, atau kumkuat. Pada jeruk sitrun, heterozigositas berkisar antara 0 hingga 52%. Panjang rangkaian MDH pada 54 taksa yang diteliti adalah sekitar 1615 bp. Delapan aksesori non-sitron mempunyai satu atau kedua haplotipe dengan deleksi 10 bp pada daerah intron fragmen gen MDH. Semua citron memiliki produk PCR CF-AT13 yang diperkirakan sekitar 361–379 pasangan basa nukleotida berdasarkan mobilitas pada gel LI-COR. Semua non-sitron yang dimasukkan dalam analisis menghasilkan produk PCR yang diperkirakan sekitar 201–221 bp dan tidak memiliki pita UM yang lebih tinggi (~370 bp). Terdapat 43 lokus dengan basis polimorfik, 20 diantaranya hanya terdapat pada aksesori non-sitron. Analisis gen cp rps16 mengidentifikasi 43 posisi nukleotida dengan basa variabel. Ada 83 alel dalam limau; 42 pada citron Cina (15 pada citron murni dan 27 pada citron hibrida) dan 41 pada citron asal Mediterania. Untuk membangun pohon MP dengan sitron dan sejumlah besar aksesori non-sitron, kami menggunakan 68 rangkaian rps16 yang dihasilkan dari semua aksesori. jarak udara antara sekuens rps16 dari 68 aksesori dihitung menggunakan perangkat lunak MEGA 6.0. Perbedaan antara aksesori non-citron dan aksesori citron dalam kumpulan data (tidak termasuk 'Assads') adalah antara 0,006 hingga 2,1%. Perbedaan antara aksesori limau dan 'Assad' adalah sekitar 1,2%. Divergensi antara berbagai aksesori jeruk (tidak termasuk 'Assad') berkisar antara 0 hingga 0,6%. Kebanyakan citron tidak memiliki perbedaan satu sama lain dalam urutan rps16.</p>



Nama dan Tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
		menggunakan primer CF-AT13 dimurnikan, dan diklon ke vektor kloning pCR4-TOPO.	

Berdasarkan deskripsi artikel pada Tabel 1., diketahui bahwa semua genotipe jeruk tersebar secara luas. Penanda SSR berhasil mengkarakterisasi keragaman genetik dari beberapa aksesori jeruk. Kekerabatan filogenetik jeruk dan kerabatnya berhasil diidentifikasi pada plasma nutfah jeruk berdasarkan penanda SSR dan aksesori tersebut dikelompokkan dalam kluster genetik yang berbeda. Hubungan kekerabatan filogenetik tanaman jeruk dievaluasi dan melalui tahap amplifikasi yang menggunakan bantuan Enzim Restriksi (RE) untuk proses restriksi ampikon PCR. Penanda SSR memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi. Hasil yang diperoleh sangat berharga dan penting untuk pengelolaan koleksi di masa depan dan penggunaan aksesori individu sebagai sumber daya genetik untuk budidaya jeruk dan pemuliaan tanaman jeruk. Penanda SSR adalah memiliki beberapa keunggulan, termasuk pewarisan kodominan, tingkat polimorfisme yang tinggi, reproduktifitas dan kemudahan identifikasi homozigositas dan heterozigositas (Zhao et al., 2017). Penanda SSR menunjukkan banyak manfaat karena distribusi kontennya yang kaya, polimorfisme yang melimpah, netralitas yang dapat diandalkan, pengulangan yang tinggi, dan kodominan (Li et al., 2021). Kerugiannya, analisis SSR adalah proses yang mahal dan memakan waktu sehingga bagi kebanyakan tanaman, membuat peta keterkaitan resolusi tinggi hanya dengan menggunakan penanda SSR memerlukan biaya yang besar, namun biasanya lebih masuk akal jika menggabungkan analisis SSR dan AFLP (Uddin & Cheng, 2015).

## SIMPULAN

Salah satu aplikasi penanda molekuler yaitu penggunaannya untuk menganalisis keanekaragaman genetik tumbuhan. Penanda molekuler Simple Sequence Repeat (SSR) dapat membantu untuk menganalisis karakteristik dan keanekaragaman genetik jeruk sehingga dapat membantu dalam tujuan pemuliaan tanaman dan konservasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abkenar, A. A., Isshiki, S., & Tashiro, Y. (2004). Phylogenetic Relationships in the "True Citrus Fruit Trees" Revealed by PCR-RFLP Analysis of cpDNA. *Scientia Horticulturae*, 102(2), 233–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.01.003>
- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in Molecular Marker Techniques and Their Applications in Plant Sciences. *Plant Cell Rep*, 27, 617–631. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z>
- Amar, M. H., Biswas, M. K., Zhang, Z., & Guo, W.-W. (2011). Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP Markers for Genetic Diversity of Citrus Germplasm Collection. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 220–227.
- Amiteye, S. (2021). Basic Concepts And Methodologies Of DNA Marker Systems In Plant Molecular Breeding. *Heliyon*, 7(10), e08093. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08093>
- Anne, C. (2006). Choosing The Right Molecular Genetic Markers for Studying Biodiversity: From Molecular Evolution to Practical Aspects. *Genetica*, 127(1–3), 101–120. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-2485-1>
- Ben Romdhane, M., Riahi, L., Selmi, A., & Zoghlami, N. (2016). Patterns of genetic structure and evidence of gene flow among Tunisian Citrus species based on informative nSSR markers. *Comptes Rendus - Biologies*, 339(9–10), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.06.005>
- Biswas, M. K., Baig, M. N. R., Cheng, Y.-J., & Deng, X.-X. (2010). Retro-Transposon Based Genetic Similarity Within the Genus Citrus and Its Relatives. *Genet Resour Crop Evol*, 57, 963–972. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10722-010-9533-0>
- Biswas, M. K., Chai, L., Amar, M. H., Zhang,

- X., & Deng, X. (2011). Comparative Analysis of Genetic Diversity in Citrus Germplasm Collection using AFLP, SSAP, SAMPL and SSR Markers. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 798–803.
- Chai, L., Biswas, M. K., Yi, H., Guo, W., & Deng, X. (2013). Transferability, polymorphism and effectiveness for genetic mapping of the Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) EST-SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 155, 85–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.024>
- Chen, P., Liu, J., Wang, L., Liu, X., Guo, L., Li, F., Li, D., Chai, L., Xu, Q., Li, X., & Deng, Z. (2011). Genetic background of the citrus landrace ‘Huarongdao Zhoupigan’ revealed by simple sequence repeat marker and genomic analyses. *Scientia Horticulturae*, 289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110456>
- Cheng, Y.-J., Guo, W.-W., Yi, H.-L., Pang, X.-M., & Deng, X. (2003). An Efficient Protocol for Genomic DNA Extraction From Citrus Species. *Plant Mol Biol Rep*, 21, 177–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02774246>
- Cmejlova, J., Rejlova, M., Paprstein, F., & Cmejla, R. (2021). A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Science*, 303, 110768. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110768>
- Golein, B., Bigonah, M., Azadvar, M., & Golmohammadi, M. (2012). Analysis of genetic relationship between “Bakraee” (*Citrus* sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. *Scientia Horticulturae*, 148, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.10.012>
- Guntur, W. S., & Slamet, S. (2019). Kajian Kriminologi Perdagangan Ilegal Satwa Liar. *Recidive*, 8(2), 176–186.
- Kawano, M., Yahata, M., Shimizu, T., Honsho, C., Hirano, T., & Kunitake, H. (2021). Production of doubled-haploid(DH) selfed-progenies in ‘Banpeiyu’ pummelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] and its genetic analysis with simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*, 277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109782>
- Kordrostami, M., & Rahimi, M. (2015). Molecular markers in plants: Concepts and applications. *Genetics in the Third Millennium*, 13(2), 4024–4031.
- Kumar, S., Jena, S. N., & Nair, N. K. (2010). ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. *Scientia Horticulturae*, 123(3), 350–359. <https://doi.org/DOI:10.1016/j.scienta.2009.10.008>
- Li, H., Ma, Y., Pei, F., Zhang, H., Liu, J., & Jiang, M. (2021). Large-scale advances in SSR markers with high-throughput sequencing in *Euphorbia fischeriana* Steud. *Electronic Journal of Biotechnology*, 49, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.11.004>
- Liu, Y., Heying, E., & Tanumihardjo, S. A. (2012). Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530–545. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00201.x>
- Matheyambath, A. C., Padmanabhan, P., & Paliyath, G. (2016). Citrus Fruits. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 136–140). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00165-3>
- Mudaningrat, A., Umayana, F., Ayu, F., & Syahriza, A. (2023). *Literature Review: Aplikasi Penanda Molekuler untuk Analisis Keanekaragaman Genetik Hewan*. 10, 11–25.
- Munankarmi, N. N., Rana, N., Joshi, B. K., Bhattarai, T., Chaudhary, S., Baral, B., & Shrestha, S. (2023). Characterization of the Genetic Diversity of Citrus Species of Nepal using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *South African Journal of Botany*, 156, 192–201.
- Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., Malfa, S. La, Continella, G., & Tribulato, E. (2000). Citrus Phylogeny and Genetic Origin of Important Species as Investigated by Molecular Markers. *Theor Appl Genet*, 100, 1155–1166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s001220051419>

- Ningsih, O. S., Detha, A. I. R., & Wuri, D. A. (2022). Studi Literatur Metode Diagnosis Anisakiasis. *Jurnal Veteriner Nusantara*, 5(26), 1–11.
- Pang, Y. X., Wang, W. Q., Zhang, Y. B., Yuan, Y., Yu, J. B., Zhu, M., & Chen, Y. Y. (2014). Genetic Diversity of the Chinese Traditional Herb *Blumea Balsamifera* (Asteraceae) Based on AFLP Markers. *Genetic and Molecular Research*, 13(2), 2718–2726.
- Ramadugu, C., Keremane, M. L., Hu, X., Karp, D., Federici, C. T., Kahn, T., Roose, M. L., & Lee, R. F. (2015). Genetic analysis of citron (*Citrus medica* L.) using simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms. *Scientia Horticulturae*, 195, 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.004>
- Sabreena, Nazir, M., Mahajan, R., Hashim, M. J., Iqbal, J., Alyemeni, M. N., Ganai, B. A., & Zargar, S. M. (2021). Deciphering allelic variability and population structure in buckwheat: An analogy between the efficiency of ISSR and SSR markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(11), 6050–6056. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.061>
- Samarina, L. S., Kulyan, R. V., Koninskaya, N. G., Gorshkov, V. M., Ryndin, A. V., Hanke, M. V., Flachowsky, H., & Reim, S. (2021). Genetic diversity and phylogenetic relationships among citrus germplasm in the Western Caucasus assessed with SSR and organelle DNA markers. *Scientia Horticulturae*, 288(April), 110355. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.11.0355>
- Uddin, M. S., & Cheng, Q. (2015). 12 - Recent Application of Biotechniques for the Improvement of Mango Research. In Y. H. Palmiro Poltronieri (Ed.), *Applied Plant Genomics and Biotechnology* (pp. 195–212). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100068-7.00012-4>
- Yue, Y., Wei, A., Jian-hua, Z., Yan-long, L., Yun-fang, F., Jin-huan, C., You-long, C., & Xiang-qiang, Z. (2022). Constructing the wolfberry (*Lycium* spp.) genetic linkage map using AFLP and SSR markers. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(21\)63610-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(21)63610-9)
- Zhang, P., & Min, X. J. (2005). 2 - EST Data Mining and Applications in Fungal Genomics. In R. M. B. Dilip K. Arora (Ed.), *Applied Mycology and Biotechnology* (pp. 33–70). Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(05\)80004-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1874-5334(05)80004-8)
- Zhao, X., Zhang, J., Zhang, Z., Wang, Y., & Xie, W. (2017). Hybrid identification and genetic variation of *Elymus sibiricus* hybrid populations using EST-SSR markers. *Hereditas*, 154, 15. <https://doi.org/10.1186/s41065-017-0053-1>
- Zhu, X., Wu, Y., Zhou, J., Lin, J., & Chen, X. (2023). Morphological, palynological and transcriptomic-based SSR assessment of peony varieties adaptive in the Jiangnan region. *Scientia Horticulturae*, 310(December 2022), 111771. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.11.1771>