



IDENTIFIKASI MOLEKULER JERUK NIPIS TEGAL BERDASARKAN FRAGMEN GEN 18S RIBOSOMAL RNA

Molecular Identification of Tegal's Lime Based on 18S Ribosomal RNA Fragment

Yumna Rahmadias Hanifa¹, Sri Pujiyanto², Rejeki Siti Ferniah², Hermin Pancasakti Kusumaningrum^{2*}

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Sudarto, SH Tembalang Telp. / Fax. (024) 7474698 Semarang – 50275

²Program Studi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Sudarto, SH Tembalang Telp. / Fax. (024) 7474698 Semarang – 50275

Email: herminpk@live.undip.ac.id

ABSTRACT

*Tegal's lime is a lime that grows in the coastal areas with high salinity, and research on the molecular identification of Tegal's lime has never been done before. This study aims to determine the molecular identity and its phylogenetic relationship with other oranges in GenBank. DNA isolation was carried out using CTAB. The best DNA purity was 1.883 while the highest DNA concentration was 464.83 ng/μL. DNA amplification was carried out using the PCR method which consisted of denaturation, annealing, and extension steps. DNA was electrophoresed with agarose gel. The DNA band size was 572 bp. The fragment of 18S rRNA of Tegal's lime has a greatest similarity of 99,64% with *Citrus sinensis*, while based on phylogenetic tree it has a closest relationship with *C. aurantium* (bootstrap value 33%). The alignment of Tegal's lime against the *C. aurantium* sample showed that there were 2 gaps and 4 base changes, while the alignment with other oranges and *C. medica* as an ancestral showed that there were transition and transversion at the 130th and 560th nucleotide respectively.*

Keywords: 18S rRNA, CTAB method, DNA isolation, PCR method, Tegal's lime

ABSTRAK

Jeruk nipis Tegal merupakan jeruk nipis yang tumbuh pada daerah pesisir yang memiliki salinitas cukup tinggi dan penelitian tentang identitas jeruk nipis Tegal masih belum pernah dilakukan sebelumnya. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui identitas jeruk nipis Tegal secara molekuler dan mengetahui hubungan kekerabatannya dengan jeruk lainnya pada GenBank. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan CTAB. Kemurnian DNA terbaik yaitu 1,883 sedangkan konsentrasi DNA tertinggi adalah 464,83 ng/μL. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode PCR yang terdiri dari tahap denaturasi, anealing, dan ekstensi. DNA dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa. Ukuran pita DNA yang didapatkan yaitu 572 pb. Fragmen gen 18S rRNA jeruk nipis Tegal memiliki kesamaan yang paling tinggi dengan *Citrus sinensis* sebesar 99,64% sedangkan berdasarkan analisis filogenetik, memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat dengan *C. aurantium* (nilai *bootstrap* sebesar 33%). Hasil pensejajaran jeruk nipis Tegal terhadap sampel *C. aurantium* menunjukkan adanya 2 *gap* dan 4 perubahan basa sedangkan pensejajaran yang dilakukan antara jeruk nipis Tegal dengan jeruk lain dan jeruk nenek moyang *C. medica* menunjukkan adanya 1 transisi pada basa ke-130 dan 1 transversasi pada basa ke-560.

Kata Kunci: 18S rRNA, isolasi DNA, jeruk nipis Tegal, metode CTAB, metode PCR

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keanekaragaman yang tinggi untuk produk pertanian. Salah satu tanaman tahunan yang berasal dari Asia, khususnya Indonesia, adalah jeruk. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balijestro) yang berlokasi di Batu, Jawa Timur telah memiliki koleksi aksesori jeruk sebanyak 213 secara *ex situ* dengan 130 varietas jeruk merupakan hasil eksplorasi dari sejumlah daerah di Indonesia (Yulianti et al. 2016). Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian (2015) menyatakan bahwa produktivitas jeruk di Jawa pada tahun 2014 mencapai 34,89 Ton/Ha sedangkan di Luar Jawa mencapai 33,47 Ton/Ha. Sedangkan berdasarkan Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian tahun 2016, menyatakan bahwa produktivitas jeruk di Jawa pada tahun 2015 sebesar 30,67 Ton/Ha sedangkan di Luar Jawa sebesar 34,50 Ton/Ha. Berdasarkan Survei Sosial Ekonomi Nasional (SUSENAS) pada tahun 1995–2015, tingkat konsumsi jeruk sebagai kebutuhan rumah tangga di Indonesia pada tahun 1995–2014 cenderung meningkat dan memiliki rata-rata pertumbuhan 12,15% per tahunnya dan berdasarkan SUSENAS tahun 2016, konsumsi jeruk oleh rumah tangga di Indonesia mencapai 3,41 kg/kapita/tahun atau sebesar 882,689 Ton. Jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) merupakan jenis jeruk yang banyak dimanfaatkan sebagai bahan masakan maupun bahan obat di berbagai negara di dunia seperti Indonesia, Cina, Jepang, dan negara-negara lainnya (Lv et al. 2015). Jeruk nipis memiliki sumber vitamin C dan kandungan metabolit sekunder yang tinggi seperti flavonoid, terpenoid, dan kumarin yang tinggi, sehingga digunakan dalam berbagai bidang kesehatan, pengobatan tradisional, bahkan industri kosmetik (Al-Aamri et al. 2018).

Jeruk nipis termasuk dalam famili Rutaceae dan merupakan tanaman yang berasal dari Benua Asia. Jeruk nipis tumbuh pada daerah tropis (Prastiwi dan Ferdiansyah 2017). Jeruk nipis yang tumbuh di Kota Tegal memiliki kemampuan untuk tumbuh pada daerah yang terindikasi intrusi air laut. Intrusi air laut yang terjadi pada Kota Tegal

menyebabkan terjadinya perubahan karakteristik air tanah yang pada awalnya tawar dengan salinitas berkisar antara 0,5–3,0 ppt (*parts per thousand*) menjadi asin dengan salinitas berkisar antara 3,0–30 ppt. Luas wilayah pada Kota Tegal yang terdampak intrusi air laut diperkirakan seluas 1.964 Ha. Salah satu wilayah yang terdampak intrusi air laut adalah Kelurahan Kalinyamat Kulon, Kecamatan Margadana, Kota Tegal. Kelurahan Kalinyamat Kulon ini mengalami intrusi air laut yang mengakibatkan terjadinya peningkatan salinitas menjadi 16,0 ppt dan termasuk ke dalam kategori daerah payau (BP4D 2017). Penelitian mengenai jeruk yang memiliki habitat pesisir telah dilakukan oleh Kusumaningrum et al. (2018) pada jeruk yang berasal dari Pulau Parang Karimunjawa dan menunjukkan kandungan vitamin C sebesar 38,35 mg/100 g BDD (data berat bahan yang bisa dimakan) dan protein sebesar 0,25 g/100 g BDD. Jumlah kandungan ini, diketahui lebih tinggi jika dibandingkan dengan jeruk lain. Hal ini menjadi sebuah tantangan dalam peningkatan keunggulan jeruk nipis Tegal dalam bidang industri. Jeruk nipis Tegal dapat hidup di daerah yang memiliki tingkat salinitas yang tinggi seperti halnya jeruk nipis yang ditemukan hidup pada Pulau Parang Karimunjawa.

Identifikasi secara molekuler merupakan salah satu solusi yang dapat dilakukan untuk mendukung penentuan hubungan kekerabatan pada jeruk nipis. Penggunaan penanda molekuler memiliki beberapa keuntungan yaitu merupakan sumber informasi genetik yang potensial dan akurat pada suatu makhluk hidup, dapat ditemukan pada setiap bagian tanaman dan tidak terpaku pada umur tanaman, serta tidak terpengaruh oleh faktor luar. Namun, identifikasi molekuler membutuhkan biaya yang cukup besar dan teknik yang digunakan cukup rumit (Nuraida 2012). Identifikasi molekuler merupakan suatu langkah yang dilakukan dalam upaya pemuliaan tanaman (Syahputra et al. 2017), biologi konservasi, dan aspek ilmu tumbuhan lainnya.

Gen 18S rRNA merupakan salah satu gen referensi yang berada pada organisme eukariot, gen ini banyak digunakan sebagai kontrol internal pada proses analisis ekspresi gen. Gen 18S rRNA memiliki ukuran 1800 pb dan terletak pada genom inti (Andariyusti dan Roslim 2021). Gen 18S rRNA ini memiliki

ekspresi gen yang stabil dan tidak diinduksi oleh perlakuan dari luar (Roslim et al. 2018). Menurut Nikbakht et al. (2016), gen yang mengkode ribosomal RNA memiliki sifat yang tidak berubah selama proses evolusi jika dibandingkan dengan gen kromosom lainnya. Identifikasi secara molekuler akan memberikan informasi yang dapat digunakan untuk melengkapi data identifikasi secara morfologi. Identifikasi secara molekuler dapat membantu dalam mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies jeruk dan mengetahui tingkatan evolusinya. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui identitas jeruk nipis Tegal secara molekuler dan mengetahui hubungan kekerabatannya dengan jeruk lainnya pada GenBank berdasarkan gen 18S rRNA.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Sains dan Matematika dan Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang. Kegiatan penelitian dilaksanakan dari bulan September hingga November tahun 2020.

Bahan

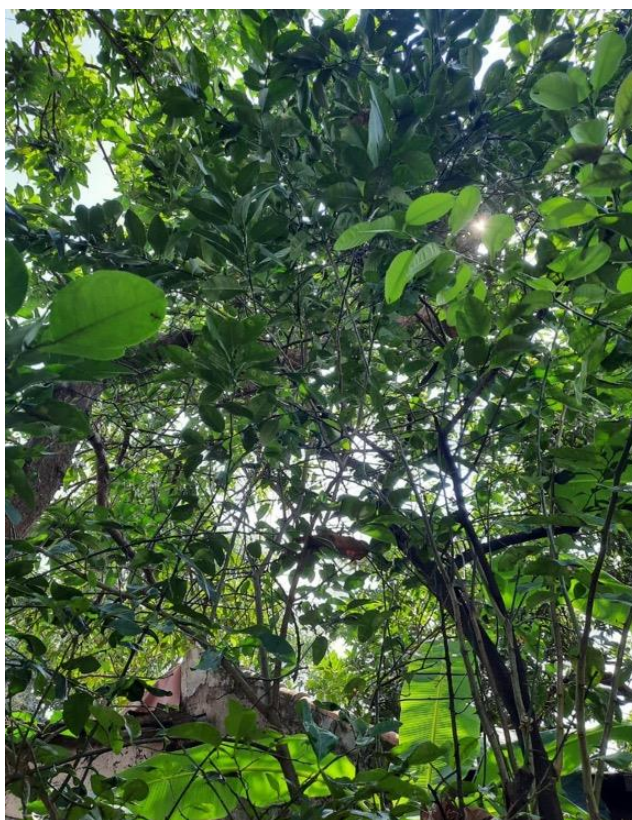
Daun jeruk nipis sebanyak 700 mg yang berasal dari dua pohon jeruk nipis Kalinyamat Kota Tegal, Jawa Tengah (Gambar 1), alkohol 70%, etanol 70%, sodium asetat, *gel ice*, Buffer ekstraksi CTAB, *chloroform isoamil alcohol* (CIA), isopropanol dingin, Buffer Tris-HCL EDTA (TE), agarosa, tris acetate EDTA (TAE), primer *forward* 18S dan primer *reverse* 18S, MyTaq HS *Red Mix*, DNA *loading dye*, DNA *ladder* 1 kb, dan *florosave*.

Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan adalah sampel daun jeruk nipis yang berasal dari Jl. Ki Hajar Dewantara 209 Kalinyamat Kulon, Kota Tegal Jawa Tengah yang memiliki posisi geografis 6° 53' 22.9" S; 109° 06' 10.1" E. Pembuatan peta lokasi pengambilan sampel jeruk nipis Tegal dilakukan dengan menggunakan aplikasi ArcGIS (Gambar 2).

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1987). Sebanyak 700 mg daun jeruk nipis yang telah dibersihkan menggunakan alkohol 70%, dihaluskan dengan menggunakan



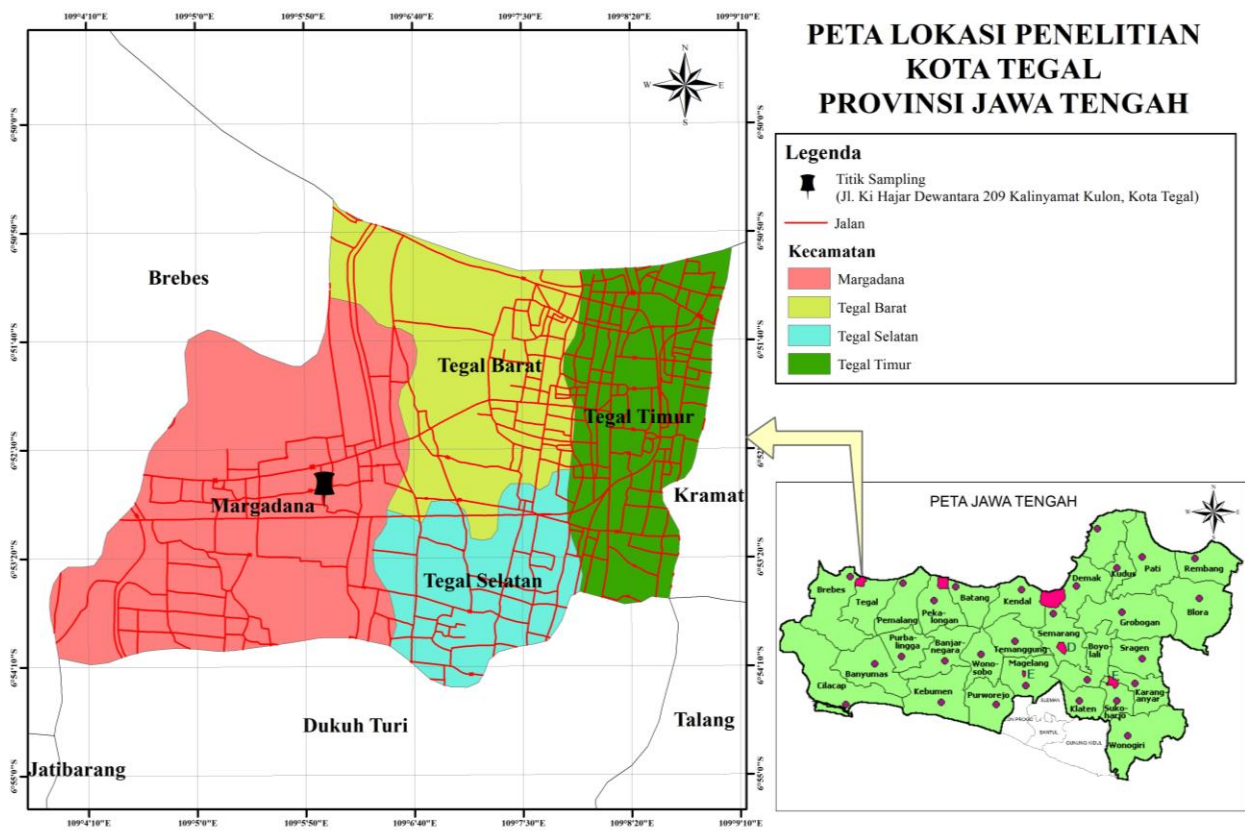
Gambar 1. Buah, daun, dan pohon jeruk nipis Tegal

mortar dan *pestle*. Buffer ekstraksi DNA CTAB sebanyak 5 mL ditambahkan secara bertahap dan dihomogenkan kembali. Tabung mikrotube diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 65 °C selama 30 menit. Larutan 250 µL kloroform : isoamil alkohol (24:1) ditambahkan ke dalam sampel, kemudian dicampur dan dihomogenkan. Tabung mikro divortex selama 10 detik atau selama 1 menit. Sampel disentrifuge pada 8.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dimasukkan ke dalam tabung mikro baru dengan hati-hati untuk mencegah pencampuran fase supernatan dan natan. Dilakukan penambahan isopropanol ke preparasi DNA dengan perbandingan 1:1 sesuai dengan supernatan yang didapatkan pada masing-masing tabung mikro. Larutan diinkubasi pada suhu -20 °C semalaman, kemudian disentrifus pada 8.000 rpm selama 10 menit. Fase organik (isopropanol) dibuang dengan hati-hati, dan dikeringanginkan selama 30 menit. Buffer TE sebanyak 250 µL, sodium asetat 3M sebanyak 20 µL, dan etanol absolut sebanyak 500 µL ditambahkan ke dalam tabung kemudian diinkubasi pada suhu -20 °C selama 30 menit. Larutan

disentrifus pada 8.000 rpm selama 10 menit. Fase organik dibuang dengan hati-hati kemudian dicuci dengan alkohol 70% sebanyak 200 µL dengan cara disentrifus pada 8.000 rpm selama 10 menit kemudian alkohol dibuang dan dikeringanginkan selama 30 menit. Buffer TE 50 µL ditambahkan ke dalam tabung. Terakhir sampel DNA disimpan pada suhu -20 °C.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Amplifikasi daerah 18S ribosomal RNA dilakukan dengan mencampurkan 12,5 µL MyTaq HS Red Mix, 1,5 µL primer *forward* 18S (5’-GTA GTC ATA TGC TTG TCT-3’) dan 1,5 µL primer *reverse* 18S (5’-AGG GCA AGT GTG GTG CCA GC-3’), 2 µL template DNA dan 7,5 µL ddH₂O. Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dengan denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 1 menit, denaturasi pada 95 °C selama 30 detik, *annealing* dengan menggunakan metode gradien PCR pada 52 °C (Susanto et al. 2018) dan 55 °C (Kusumaningrum et al. 2018) selama 1 menit, *extention* pada 72 °C selama 50 detik, dan *extention* akhir pada 72 °C selama 1 menit.



Gambar 2. Lokasi pengambilan sampel jeruk nipis Tegal (Jl. Ki Hajar Dewantara 209 Kalinyamat Kulon, Kota Tegal, Jawa Tengah)

Analisis filogenetik

Urutan basa nukleotida yang telah didapatkan kemudian diproses dengan aplikasi Bioedit dan ClustalX untuk selanjutnya dilakukan penyejajaran dengan menggunakan BLAST (*basic local alignment search tool*) pada *website* NCBI. Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan beberapa aplikasi seperti NJ Plot dan MEGA 7.

HASIL DAN PEMBAHASAN

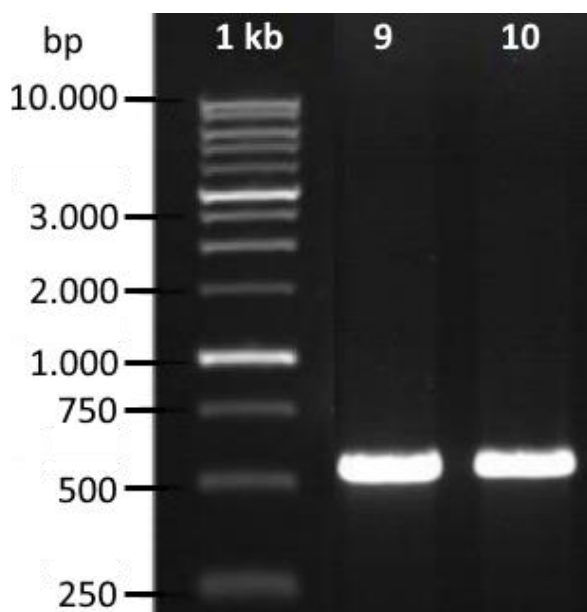
Sampel daun jeruk yang digunakan memiliki warna hijau tua dengan panjang 9,3 cm, lebar 5,3 cm, dan berat 700 mg. Proses isolasi DNA daun jeruk nipis Tegal dilakukan dengan menggunakan metode CTAB. Hasil dari isolasi ini berupa cairan bening berisi DNA. Metode CTAB dinilai memiliki kemampuan untuk mengatasi terjadinya kontaminasi yang disebabkan oleh senyawa lain dalam daun jeruk yang dapat menghambat proses isolasi DNA. Selain itu, metode ini dapat dilakukan dengan mudah dan tidak membutuhkan biaya besar serta menghasilkan kemurnian dan konsentrasi yang baik (Rizko et al. 2020). Beberapa peneliti memilih metode isolasi dengan menggunakan metode CTAB seperti pada penelitian Nugroho et al. (2019), yang menggunakan beberapa sampel tanaman padi (*Oryza sativa* L.), jagung (*Zea mays* L.), kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.), cabai (*Capsicum*

annum L.), dan bawang merah (*Allium cepa* var *ascalonium* L. (Back)), yang menunjukkan bahwa deterjen CTAB mampu mendegradasi dinding dan membran sel tanaman, selain itu NaCl memiliki peran untuk mempermudah proses pelisisan sel dengan menciptakan kondisi hipertonik. Konsentrasi DNA yang dihasilkan dihitung berdasarkan perbandingan antara gambaran pita pada gel elektroforesis dan hasil spektrofotometer (UV/VIS). Pita DNA yang tebal dan tidak menyebar menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi yang diperoleh memiliki konsentrasi tinggi dan berada dalam kondisi utuh. Sedangkan pita DNA yang terlihat tersebar menunjukkan bahwa terdapat ikatan DNA yang terputus akibat proses ekstraksi yang tidak baik (Harahap 2018).

Hasil uji kualitatif dan kuantitatif DNA

Berdasarkan hasil uji kualitas dan kuantitas DNA yang telah dilakukan menggunakan pengukuran Nanodrop, didapatkan 2 tabung mikro DNA dengan konsentrasi 213,47 dan 464,83 ng μL^{-1} yang memiliki kemurnian DNA masing-masing 1,91 dan 1,88. Hasil yang diperoleh ini sudah baik dan memenuhi syarat untuk dapat dilanjutkan ke tahap berikutnya. Menurut Hikmatyar et al. (2015), DNA yang baik memiliki nilai kemurnian 1,8–2,0 pada panjang gelombang 260/280 nm dan konsentrasi DNA di atas 100 ng μL^{-1} . Nilai kemurnian DNA di atas 2,0 mengindikasikan bahwa pada sampel DNA yang didapatkan masih terdapat kontaminan berupa RNA, sedangkan nilai kemurnian DNA di bawah 1,8 mengindikasikan bahwa pada DNA hasil isolasi masih terdapat kontaminan berupa senyawa protein. Perbedaan hasil konsentrasi dan kemurnian DNA pada setiap tabung disebabkan oleh faktor teknis ketika melakukan proses distribusi dan pemindahan supernatan pada tabung mikro baru. Hal ini sesuai dengan pendapat Triani (2020), yang menyatakan bahwa beberapa faktor teknis yang terjadi selama proses isolasi seperti pemindahan supernatan dan pengeringan isolat dapat memengaruhi kemurnian DNA yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan larutan purifikasi seperti alkohol, atau etanol dapat menurunkan nilai kemurnian DNA ketika dilakukan pengukuran pada spektrofotometer.

Berdasarkan hasil visualisasi dengan menggunakan alat UV *transluminator* (Gambar 3), didapatkan hasil pita DNA yang tebal dan jelas dengan ukuran ± 500 pb. Hasil



Gambar 3. Hasil visualisasi produk PCR daerah 18S rRNA jeruk nipis Tegal. Nomor 9. Sampel jeruk suhu *annealing* 52 °C; nomor 10. Sampel jeruk suhu *annealing* 55 °C

Tabel 1. Hasil BLAST fragmen gen 18S rRNA sampel jeruk nipis Tegal

No.	Deskripsi	Skor Max	Skor Total	Query Cover	E-value	Kesamaan	Nomor Akses
1	<i>C. sinensis</i>	1013	1013	96%	0.0	99.64%	XR_003066634.1
2	<i>C. clementina</i>	1013	1013	96%	0.0	99.64%	XR_002904496.1
3	<i>C. aurantium</i>	992	992	97%	0.0	98.92%	U38312.1
4	<i>C. tachibana</i>	963	963	92%	0.0	99.62%	KJ740206.1
5	<i>C. hassaku</i>	963	963	92%	0.0	99.44%	KJ740196.1
6	<i>C. maxima</i>	963	963	92%	0.0	99.62%	KJ740207.1

pita tersebut merupakan hasil amplifikasi DNA jeruk nipis Tegal menggunakan metode gradien PCR pada suhu *annealing* 52 °C dan 55 °C. Budiarto et al. (2018) menyatakan bahwa penggunaan metode gradien PCR ini tepat digunakan dalam optimasi kondisi PCR untuk menentukan suhu *annealing* terbaik. Hal ini menunjukkan bahwa gradien PCR menggunakan suhu *annealing* 52 °C dan 55 °C merupakan suhu yang tepat untuk mengamplifikasi DNA jeruk nipis Tegal menggunakan penanda 18S.

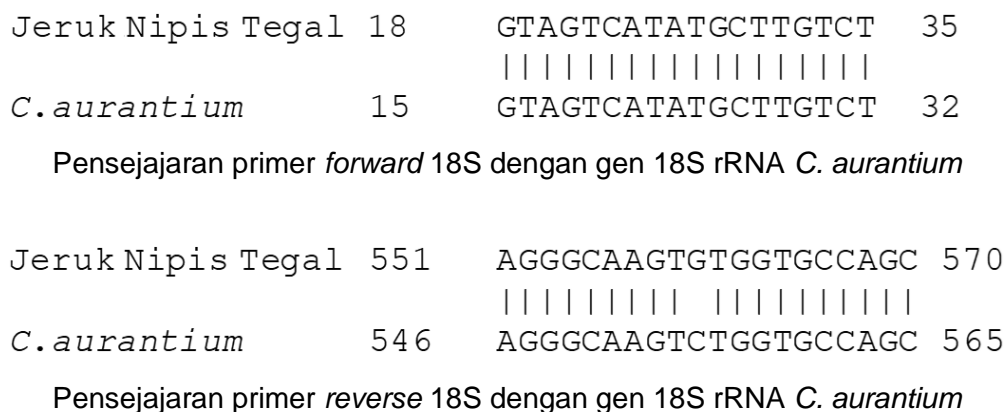
Analisis hasil sekuensing

Hasil sekuensing produk PCR dari sampel jeruk nipis Tegal menunjukkan bahwa ukuran sekuen parsial yang dapat teramplifikasi pada sekuen *forward* adalah 505 pb, sedangkan pada sekuen *reverse* adalah sebesar 525 pb dan berdasarkan analisis contig didapatkan hasil fragmen gen 18S ribosomal RNA sebesar 572 pb. Untuk membuktikan bahwa sekuen yang didapatkan benar sekuen gen 18S ribosomal RNA maka dilakukan pensejajaran dengan sekuen gen 18S ribosomal RNA yang ada di GenBank yaitu fragmen gen 18S ribosomal RNA pada *C. aurantium* dengan aksesori U38312.1 yang memiliki panjang sekuen 1.754 pb (Gambar 4).

Berdasarkan pensejajaran antara sampel jeruk nipis Tegal dengan sampel *C. aurantium* 18S ribosomal RNA *gene* dengan nomor aksesori U38312.1 menunjukkan bahwa daerah penempelan primer *forward* pada sekuen *C. aurantium* yang digunakan terjadi pada urutan basa ke 15 hingga 32, sedangkan primer *reverse* menempel pada urutan basa 546 hingga 565 (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa primer yang digunakan tepat dan memiliki kemampuan untuk mengamplifikasi sekuen parsial jeruk nipis Tegal yang ditunjukkan oleh penempelan primer pada 18S rRNA *C. aurantium* pada urutan sekuen 15 hingga 566 yang memiliki total panjang sekuen adalah 551 pb dan pada sampel jeruk nipis Tegal yang diujikan menghasilkan ukuran panjang sekuen 572 pb.

Analisis filogenetik

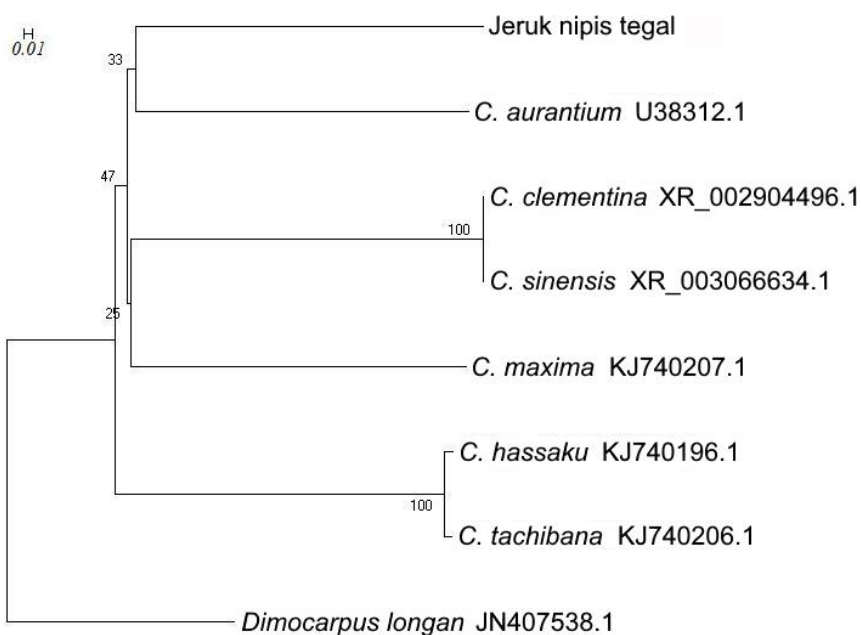
Berdasarkan Tabel 1, hasil pensejajaran dengan BLAST pada *website* NCBI, maka didapatkan hasil bahwa jeruk nipis Tegal memiliki kesamaan dengan beberapa sekuen jeruk yang ada pada GenBank dan memiliki kesamaan yang paling tinggi dengan *C. sinensis* sebesar 99,64%. Berdasarkan hasil pohon filogenetik pada



Gambar 4. Pensejajaran sekuen gen 18S ribosomal RNA di GenBank pada *C. aurantium*

Gambar 5, fragmen gen 18S ribosomal RNA pada jeruk nipis Tegal memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat dengan *C. aurantium* yang ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* sebesar 33% dan termasuk dalam kelompok monofiletik. Menurut Hidayat dan Pancoro (2008), kelompok monofiletik dapat diasumsikan sebagai kelompok yang memiliki nenek moyang yang sama. Kelompok ini memiliki banyak kesamaan karakter atau ciri dan dapat diperkirakan membawa sifat atau pola genetik dan biokimia yang sama. Hal ini sesuai dengan hasil pohon filogenetik yang terbentuk, karena jeruk nipis Tegal dan *C. aurantium* berasal dari genus yang sama yaitu *Citrus* namun memiliki spesies yang berbeda. Menurut Kress et al. (2002), nilai *bootstrap* yang kuat ditunjukkan dengan persentase >85%, kategori sedang yaitu 70–85%, kategori lemah sebesar 50–69%, sedangkan kategori buruk sebesar <50%. Metode *bootstrap* yang digunakan adalah 1000x. Metode *bootstrap* ini digunakan untuk menguji keakuratan titik cabang yang terbentuk pada pohon filogenetik (Xi et al. 2015, Seprianto et al. 2017). Penggunaan pengulangan *bootstrap* sebanyak 1000x dilakukan untuk memperhitungkan stabilitas pengelompokan pada pohon filogenetik yang terbentuk. Pohon filogenetik yang terbentuk memiliki garis skala sebesar 0,01 yang memiliki arti bahwa adanya jarak genetik dengan perubahan pada nukleotida sebanyak 1 kali setiap 100 pb.

Hasil pensejajaran pada Gambar 6 menunjukkan bahwa sekuen jeruk nipis Tegal memiliki kesamaan sebanyak 548 basa nukleotida dari 554 basa nukleotida terhadap *C. aurantium* dan memiliki presentase kesamaan sebesar 99%. Sebanyak 6 basa yang lain mengalami delesi dan substitusi. Kemena dan Notredame (2009) serta Dharmayanti (2011) menyatakan bahwa tujuan dari proses pensejajaran yaitu untuk mencocokkan karakter-karakter yang homolog atau karakter yang berasal dari nenek moyang yang sama. Melalui pensejajaran ini, dapat dilihat adanya kesamaan basa nukleotida yang ada pada jeruk nipis Tegal dengan *C. aurantium* dari *website* NCBI yang ditunjukkan dengan adanya garis vertikal yang menghubungkan kedua sekuen tersebut, sedangkan ketidakhadiran garis vertikal yang menghubungkan kedua sekuen menunjukkan adanya *gap*. Menurut Dharmayanti (2011), *gap* dapat menunjukkan terjadinya insersi, delesi, maupun penyusunan ulang materi genetik pada karakter sekuen selama proses evolusi. *Gap* yang terbentuk pada proses pensejajaran ini berjumlah 2. Pensejajaran ini juga menunjukkan bahwa terjadi 4 perubahan basa pada jeruk nipis Tegal yang ditunjukkan dengan tidak adanya garis vertikal yang menghubungkan kedua sekuen tersebut. Perubahan basa dapat terjadi secara transversal yaitu perubahan basa purin menjadi pirimidin atau sebaliknya dan transisi



Gambar 5. Pohon filogenetik sampel jeruk nipis Tegal dengan sampel jeruk pada GenBank

atau perubahan basa purin menjadi purin dan pirimidin menjadi pirimidin.

Pensejajaran dilakukan dengan menggunakan BLAST *Sequence two alignment* pada *website* NCBI (Gambar 7). Proses pensejajaran sekuen jeruk nipis Tegal terhadap sekuen *Citrus* hasil BLAST dilakukan untuk mengetahui adanya homologi dan divergensi pada tiap basa nukleotida pada jeruk nipis Tegal, selain itu pensejajaran ini juga melibatkan *C. medica* yang merupakan kelompok *Citrus* nenek

moyang. Menurut Chatzou et al. (2015), *multiple sequence alignment* (MSA) merupakan algoritma yang digunakan untuk menyelaraskan urutan sekuen yang memiliki hubungan ekologi dengan mengacu pada evolusi tiap sekuen baik mutasi, insersi, maupun delesi. MSA dilakukan pada tiga atau lebih sekuen biologis seperti DNA, RNA atau protein. Berdasarkan hasil pensejajaran ini, diketahui bahwa terdapat adanya transisi basa timin menjadi sitosin pada jeruk nipis Tegal yang terjadi pada urutan basa ke-130.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
992 bits(537)	0.0	548/554(99%)	2/554(0%)	Plus/Plus
Query 18	GTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATGAACTAATTCAGA	77		
Sbjct 15	GTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATGAACTAATTCAGA	74		
Query 78	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTGTGGTATCTGCTACT	137		
Sbjct 75	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTGTGGTATCTGCTACT	134		
Query 138	CGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCACCAAACCCGACTTCTGGAAGGGA	197		
Sbjct 135	CGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCACCAAACCCGACTTCTGGAAGGGA	194		
Query 198	TGCATTTATTAGATAAAAAGGTCGACGGGCTCTGCCC GTT GCTCTGATGATTCATGATA	257		
Sbjct 195	TGCATTTATTAGATAAAAAGGTCGAC - C - GCTCTGCCC GTT GCTCTGATGATTCATGATA	252		
Query 258	ACTCGACGGATCGCAAGGCCACC GTGCCGGCGACGCATCATTCAAATTTCTGCCCTATCA	317		
Sbjct 253	ACTCGACGGATCGCAAGGCCACC GTGCCGGCGACGCATCATTCAAATTTCTGCCCTATCA	312		
Query 318	ACTTTGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTGACGGGTGACGGAGAATTAGGGTT	377		
Sbjct 313	ACTTTGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTGACGGGTGACGGAGAATTAGGGTT	372		
Query 378	CGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCCCGC	437		
Sbjct 373	CGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCCCGC	432		
Query 438	AAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACGGGCTCTATG	497		
Sbjct 433	AAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACGGGCTCTATG	492		
Query 498	AGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAA	557		
Sbjct 493	AGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAA	552		
Query 558	G T G GGTGCCAGCA	571		
Sbjct 553	G T C GGTGCCAGCA	566		

Gambar 6. Hasil pensejajaran sekuen jeruk nipis Tegal (Query) dengan *Citrus aurantium* (Subject) pada GenBank

Transisi merupakan perubahan basa nukleotida purin menjadi purin atau pirimidin menjadi pirimidin. Perubahan basa lainnya terjadi pada urutan basa nukleotida ke-560 yang terjadi karena transversi yang ditunjukkan dengan perubahan basa sitosin menjadi guanin pada jeruk nipis Tegal. Transversi merupakan perubahan basa nukleotida dari purin menjadi pirimidin atau dari basa nukleotida pirimidin menjadi purin. Perubahan basa yang terjadi pada jeruk nipis Tegal terhadap jeruk perbandingan menunjukkan bahwa adanya karakter pembeda pada jeruk nipis Tegal. Jeruk nipis Tegal memiliki kesamaan paling tinggi dengan *C. sinensis* sebesar 99,64% dengan panjang basa pensejajaran 573 pb. Sedangkan kesamaan dengan *C. aurantium* sebesar 98, 92% dengan panjang basa pensejajaran lebih pendek yaitu 566 pb. Hal ini menyebabkan prosentasi kesamaan dengan *C. sinensis* lebih besar. Selain itu pada pensejajaran antara jeruk nipis Tegal dengan *C. sinensis* terdapat substitusi 2 basa, sedangkan dengan *C. aurantium* terjadi 4 substitusi dan 2 delesi yang membuat similaritasnya semakin menurun. Cantarel et al (2006), Ives dan Helmus (2010) serta Pearson (2013) menyatakan bahwa pencarian kesamaan atau similaritas adalah strategi yang efektif dan andal untuk mengidentifikasi homologi yaitu urutan yang memiliki nenek moyang evolusi yang sama. Namun kesamaan memiliki perbedaan dengan homologi. Homologi dinyatakan bila dua urutan atau struktur berbagi lebih banyak kesamaan sehingga ketika diperoleh kesamaan yang lebih tinggi maka

diperkirakan mereka muncul dari nenek moyang yang sama. Namun, urutan homolog tidak selalu identik dengan kesamaan untuk urutan yang signifikan dan fungsi yang kompleks. Dengan demikian ketika analisis kesamaan menemukan kecocokan yang signifikan secara statistik, kita dapat dengan yakin menyimpulkan bahwa kedua urutan itu homolog. Jika tidak ditemukan kecocokan yang signifikan secara statistik, maka urutan basa tersebut bukan merupakan urutan yang homolog atau bisa berasal dari nenek moyang yang berbeda. Hal ini menjelaskan mengapa fragmen gen 18S ribosomal RNA pada jeruk nipis Tegal memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat dengan *C. aurantium* namun nilai *bootstrap* sebesar 33% walaupun termasuk dalam kelompok monofiletik. Nilai *bootstrap* yang rendah juga memperlihatkan adanya pengaruh lingkungan, fungsi yang spesifik, tingkat evolusi yang berbeda karena adanya mutasi, evolusi jeruk yang sangat kompleks dan jumlah sampel yang terlalu rendah. Hal ini biasa terjadi pada fragmen DNA yang sangat terkonservasi dan urutannya terlalu mirip satu sama lain.

KESIMPULAN

Identifikasi secara molekuler menggunakan gen 18S rRNA menunjukkan hasil bahwa jeruk nipis Tegal memiliki kesamaan yang paling tinggi dengan *C. sinensis* sebesar 99,64%, sedangkan berdasarkan analisis filogenetik, fragmen gen 18S rRNA jeruk nipis Tegal memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat

jeruk nipis tegal	78	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTGTGGATGGTAT	TGCTACT	137
<i>C. clementina</i>	80	T.....	139
<i>C. sinensis</i>	80	T.....	139
<i>C. aurantium</i>	75	T.....	134
<i>C. hassaku</i>	52	T.....	111
<i>C. tachibana</i>	52	T.....	111
<i>C. maxima</i>	47	T.....	106
<i>C. medica</i>	55	T.....	114

jeruk nipis tegal	558	GT	TGGTGCCAGCA	571
<i>C. clementina</i>	560	..C.....		573
<i>C. sinensis</i>	560	..C.....		573
<i>C. aurantium</i>	553	..C.....		566
<i>C. hassaku</i>	532	..C.....		545
<i>C. tachibana</i>	532	..C.....		545
<i>C. maxima</i>	527	..C.....		540
<i>C. medica</i>	535	..C.....		548

Gambar 7. Hasil pensejajaran homologi fragmen gen 18S rRNA jeruk nipis Tegal terhadap sekuen *Citrus* hasil BLAST

dengan *C. aurantium* dengan nilai *bootstrap* sebesar 33%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Tim penulis mengucapkan terimakasih kepada Universitas Diponegoro yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah RPP dengan pendanaan selain Anggaran Pendapatan dan Belanja Negara (APBN) Universitas Diponegoro Tahun Anggaran 2021 No SPK: 185 – 36/UN7.6.1/PP/2021.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Aamri MS, Al-Abousi NM, Al-Jabri SS, Alam T, Khan S (2018) Chemical composition and *in-vitro* antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of *Citrus aurantifolia* L. leaves grown in Eastern Oman. *J Taibah Univ Med Sci* 13: 108–112. doi: 10.1016/j.jtumed.2017.12.002
- Andariyusti F, Roslim DI (2021) Analisis sekuens DNA penyandi 18S rRNA pada tumbuhan cocor bebek (*Kalanchoe x laetivirens*). *J Bios Logos* 11: 109–113. doi: 10.35799/jbl.11.2.2021.32297
- BP4D (2017) Laporan Akhir: Studi analisis dampak intrusi air laut Kota Tegal-Tahun Anggaran 2017. Badan Perencanaan Pembangunan, Penelitian dan Pembangunan Daerah, Pemerintah Kota Tegal
- Budiarto BR, Widyowati H, Desriani (2018) Kaitan *genotyping errors* dengan performa diagnostik molekuler kanker berbasis amplifikasi asam nukleat. *Biodidaktika: J Biol Pembelajaran* 13: 1–18. doi: 10.30870/biodidaktika.v13i2.3279
- Cantarel BL, Morrison HG, Pearson W (2006) Exploring the relationship between sequence similarity and accurate phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 23: 2090–2100. doi:10.1093/molbev/msl080
- Chatzou M, Magis C, Chang JM, Kemena C, Bussotti G, Erb I, Notredame C (2015) Multiple sequence alignment modeling: Methods and applications. *Brief Bioinform* 17: 1009–1023. doi: 10.1093/bib/bbv099
- Dharmayanti NLPI (2011) Filogenetika molekuler: Metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa* 21: 1–10. Corpus ID: 55941368
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11–15.
- Harahap MR (2018) Elektroforesis: Analisis elektronika terhadap biokimia genetika. *Circuit J Ilm Pendidikan Tekno Elektro* 2: 21–26. doi: 10.22373/crc.v2i1.3248
- Hidayat T, Pancoro A (2008) Ulasan: Kajian filogenetika molekuler dan peranannya dalam menyediakan informasi dasar untuk meningkatkan kualitas sumber genetik anggrek. *J AgroBiogen* 4: 35–40. doi: 10.21082/jbio.v4n1.2008.p35-40
- Hikmatyar MF, Royani JI, Dasumiati (2015) Isolasi dan amplifikasi DNA keladi tikus (*Thyponium flagelliform*) untuk identifikasi keragaman genetik. *J Bioteknologi Biosains Indones* 2: 42–48. doi: 10.29122/jbbi.v2i2.507
- Ives AR, Helmus MR (2010) Phylogenetic metrics of community similarity. *Am Nat* 176: E128–E142. doi: 10.1086/656486
- Kemena C, Notredame C (2009) Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the high-throughput era. *Bioinformatics* 25: 2455–2465. doi: 10.1093/bioinformatics/btp452
- Kress WJ, Prince LM, Williams KJ (2002) The phylogeny and a new classification of the gingers (*Zingiberaceae*): Evidence from molecular data. *Am J Bot* 89: 1682–1696. doi: 10.3732/ajb.89.10.1682
- Kusumaningrum HP, Budiharjo A, Supriyadi A, Eshananda Y, Fadillah A, Pangestuti DR (2018) The characterization of *Citrus* sp. from Parang Island Karimunjawa based on morphological, DNA barcoding, and nutritional analysis. *Int J Genet Mol Biol* 10: 26–38. doi: 10.5897/IJGMB2018.0167
- Lv X, Zhao S, Ning Z, Zeng H, Shu Y, Tao O, Xiao C, Lu C, Liu Y (2015) *Citrus* fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chem Cent J* 9: 68. doi: 10.1186/s13065-015-0145-9
- Nikbakht M, Gholami A, Morowvat MH, Ghasemi Y, Mohagheghzadeh A (2016) Analysis of volatiles and 18S rRNA gene of *Haplophyllum canaliculatum* in *in vitro* culture. *Res J Pharmacog* 3: 17–25. Corpus ID: 15123527
- Nugroho K, Terryana RT, Reffinur, Lestari P (2019) Metode ekstraksi DNA tanaman

- tanpa presipitasi etanol untuk kegiatan *polymerase chain reaction* (PCR). *J Bioteknologi Biosains Indonesia* 6: 29–38. doi: 10.29122/jbbi.v6i1.3082
- Nuraida D (2012) Pemuliaan tanaman cepat dan tepat melalui pendekatan marka molekuler. *El-Hayah* 2: 97–103. doi: 10.18860/elha.v2i2.2210
- Pearson WR (2013) An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Curr Protoc Bioinformatics* 42: 3.1.1–3.1.8. doi:10.1002/0471250953.bi0301s42
- Prastiwi SS, Ferdiansyah F (2017) Review Article: Kandungan dan aktivitas farmakologi jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.). *Farmaka* 15: 1–8. doi: 10.24198/jf.v15i2.12964
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian (2015) Outlook Komoditas Pertanian Subsektor Hortikultura - Jeruk. ISSN: 1907–1507. Sekjen Kementerian Pertanian, Jakarta
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian (2016) Outlook Komoditas Pertanian Subsektor Hortikultura - Jeruk. ISSN: 1907–1507. Sekjen Kementerian Pertanian, Jakarta
- Rizko N, Kusumaningrum HP, Ferniah RS, Pujiyanto S, Erfianti T, Mawarni SN, Rahayu HT, Khairunnisa D (2020) Isolasi DNA daun jeruk bali merah (*Citrus maxima* Merr.) dengan modifikasi metode *Doyle and Doyle*. *Berkala Bioteknologi* 3: 1–7
- Roslim DI, Nuryani N, Herman (2018) Sekuen penyandi 18S ribosomal RNA dan ubiquitin pada *Pandanus* sp. asal Riau. *J Bios Logos* 8: 1–8. doi: 10.35799/jbl.8.1.2018.20590
- Seprianto S, Feliatra F, Nugroho TT (2017) Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik dari usus udang windu (*Penaeus monodon*) berdasarkan sekuen gen 16S rDNA. *Jurnal Biogenesis* 5: 83–92. doi: 10.24252/bio.v5i2.3943
- Susanto YW, Kusumaningrum HP, Nurjanah S, Rustini S (2018) Characterization of 18S ribosomal RNA fragment from *Solanum tuberosum* L. var. *granola* potato. *Scripta Biol* 5: 27–30. doi: 10.20884/1.sb.2018.5.1.760
- Syahputra I, Putri LAP, Basyuni M (2017) Identifikasi keragaman molekuler material genetika kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) berdasarkan marka SSR (*Simple Sequence Repeats*). *J Pertanian Trop* 4: 57–64. doi: 10.32734/jpt.v4i1.3070
- Triani N (2020) Isolasi DNA tanaman jeruk dengan menggunakan metode CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*). *G-Tech - J Teknol Terapan* 3: 221–226. doi: 10.33379/gtech.v3i2.419
- Xi Z, Liu L, Davi CC (2015) Genes with minimal phylogenetic information are problematic for coalescent analyses when gene tree estimation is biased. *Mol Phylogenet Evol* 92: 63–71. doi: 10.1016/j.ympev.2015.06.009
- Yulianti F, Palupi NE, Agisimanto D (2016) Keragaman jeruk fungsional Indonesia berdasarkan karakter morfologis dan marka RAPD. *J AgroBiogen* 12: 91–100. doi: 10.21082/jbio.v12n2.2016.p91-100