

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman Mangga (*Mangifera indica* L.)

2.1.1 Morfologi Tanaman Mangga

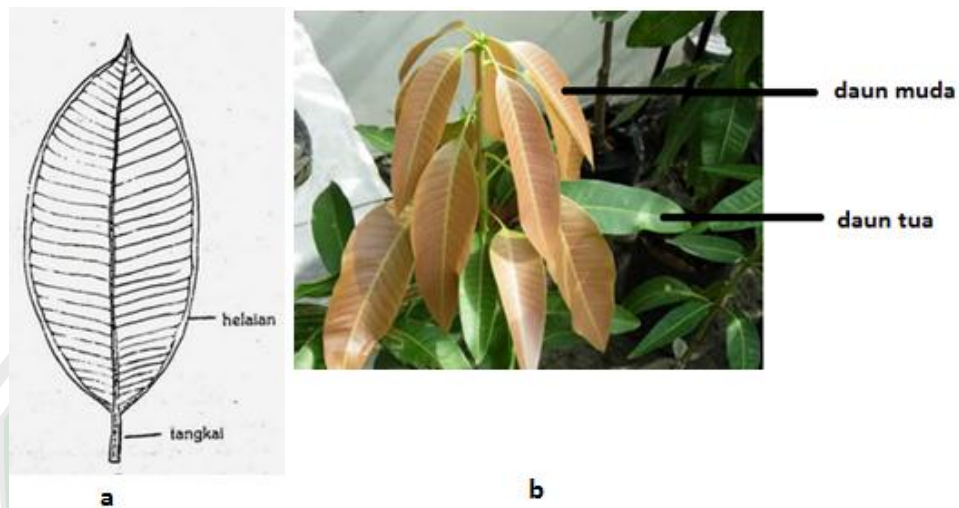
Mangga merupakan pohon yang bisa tumbuh mencapai 20 meter atau bahkan lebih. Umumnya mangga yang dibudidayakan hanya memiliki tinggi sekitar 10 m atau kurang. Kulit batang mangga coklat kelabu sampai kehitaman. Kulit batang mangga bagian terluar memecah atau beralur. Pohon mangga bertajuk rimbun dan lebarnya bisa mencapai 10 m (Pracaya, 2004).



Gambar 2.1. Pohon Mangga di Kebun Percobaan Mangga Cukurgondang, Pasuruan (Dokumentasi pribadi, 2014).

Daun mangga tergolong daun tunggal karena pada tangkai daunnya hanya terdapat satu helaian daun saja. Daun mangga berbentuk *lanceolatus* (lanset), daging daunnya *papyraceus* (seperti kertas), tepi daunnya *integer* (rata),

ujung daun *acuminatus* (meruncing), pangkal daun *acutus* (runcing), pertulangan daun *penninervis* (menyirip), permukaan daun *scaber* (kasap), dan duduk daun *folio sparsa* (tersebar) (TJitrosoepomo, 1985).



Gambar 2.2 Daun mangga. (a) struktur daun (Ttitrosoepomo, 1985). (b) daun muda dan daun tua (Dokumentasi pribadi, 2015)

Bentuk buah mangga sangat bervariasi, ukuran dan bentuk sangat berubah-ubah bergantung pada macamnya, mulai bentuk bulat (contoh: mangga gedong), bulat seperti telur atau jorong (contoh: gadung dan indramayu) hingga lonjong memanjang (mangga golek). Kulit buah agak tebal, hijau, kekuningan atau kemerahan bila masak. Daging buah jika masak berwarna kuning sampai merah jingga, krem, berserabut (ada yang tidak berserabut), rasanya manis sampai asam, mengandung banyak air dan berbau kuat sampai lemah. Biji putih terbungkus endokarp yang tebal, mengayu dan berserat, bentuknya gepeng memanjang (Pracaya, 2004).



a.



b.



c.



d.

Gambar 2.3 Beberapa jenis buah mangga a. Garifta Merah, b. Gedong Gincu, c. Podang Kuning, d. Arumanis (Balitbu, 2012)

Buah Garifta Merah merupakan buah mangga yang warna kulit buahnya merah pada pangkal dan merah kekuningan pada ujungnya. Permukaan kulit buah halus, warna bintik kulit buah hijau. Bentuk buah jorong, pangkal buah sedikit berlekuk dan pucuk buah lancip. Panjang buah 14-16,5 cm dan lebarnya 6,8-8,3 cm. Tebal daging buah 2,8-3,6 cm, sedangkan tebal kulit buah 1,4-1,9 mm. Warna daging buah kuning kemerahan dan tekstur dagingnya lunak berserat halus. Rasa buahnya manis segar (Kementrian Pertanian, 2009).

Gedong Gincu merupakan buah mangga yang warna kulit buahnya oranye, namun berwarna oranye kemerahan ketika masak. Permukaan kulit buah halus. Bentuk buah bulat dengan ukuran 7-10 cm. Tebal kulit buah 0,1-0,2 mm. Warna daging buah oranye tua sampai merah dan teksturnya halus tidak berserat. Rasa buahnya manis segar (Kementrian Pertanian, 1995).

Podang Kuning merupakan buah mangga yang warna kulit buahnya kuning kemerahan. Bentuk buah jorong dengan panjang 12,5 cm dan lebar 7 cm. tebal daging buah 2-2,5 cm. Warna daging buah jingga dan teksturnya lunak, cukup berair dan berserat halus. Rasa buahnya manis segar (Kementrian Pertanian, 2003).

Arumanis merupakan buah mangga yang warna kulitnya hijau. Bentuk buah jorong berparuh sedikit dan pucuknya runcing. Ukuran buah 15,1 x 7,8 x 5,5 cm. Warna daging buah kuning jingga dan teksturnya lunak tidak berserat. Rasa buahnya manis (Kementrian Pertanian, 19843).

2.1.2 Taksonomi Tanaman Mangga

Buah mangga yang digunakan pada penelitian ini yaitu Arumanis, Garifta Merah, Gedong Gincu dan Podang termasuk spesies *Mangifera indica* L. Famili Anacardiaceae (mangga-mangga) memiliki sekitar 500 spesies tumbuhan yang terbagi atas 64 genus, salah satu diantaranya genus *Mangifera* (Coronel, 1996). Kedudukan tanaman mangga dalam sistem taksonomi tumbuhan yaitu termasuk dalam divisi Magnoliophyta, kelas Magnoliopsida, ordo sapindales, family anacardiaceae, genus *Mangifera*, dan spesies *Mangifera indica* L. (Sudarsono, 2005).

2.1.3 Kandungan Karotenoid Kulit Buah Mangga

Karotenoid adalah pigmen alami tumbuhan yang memiliki peran sangat penting sebagai parameter kualitas buah, khususnya buah mangga. Buah mangga memiliki karakteristik warna kuning oranye menunjukkan adanya kandungan karotenoid. Sebagian besar dari kandungan karotenoid mangga berupa beta-

karoten (pro vitamin A). Kulit buah mangga yang mengandung beta-karoten yang tinggi dapat dimanfaatkan sebagai sumber ekstrak beta-karoten. Ekstrak tersebut dapat digunakan sebagai zat tambahan atau sebagai antioksidan (Sulbaran *et. al*, 2008).

Berdasarkan hasil penelitian Wardiyati (2010) diketahui bahwa mangga yang berwarna merah oranye, oranye, atau kuning oranye memiliki kandungan beta karoten yang lebih tinggi daripada mangga yang berwarna hijau. Informasi ini dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kandungan Beta Karoten dalam Buah Mangga

Kultivar	Warna kulit buah	Kandungan Beta Karoten (pro Vitamin A)	
		IU/ 100gr	µg/gr
Garifta Merah	Merah pada pangkal dan kuning pada ujungnya	16.400 I.U/100 gr	-
Gedong Gincu	Oranye terang	3.894 I.U/100 gr	-
Podang Urang	Kuning terang, oranye cerah-kuning, oranye cemerlang-kuning	2.900 I.U/100gr	25, 46 ± 4,96
Arumanis 143	Hijau kebiru-biruan, hijau kekuningan,	1.200 I.U/100gr	9,81 ±0,32

Sumber : (bpatp.litbang, 2010 dan Wardiyati, 2010).

Variasi kandungan karotenoid dalam buah mangga dapat dipengaruhi oleh banyak faktor, misalnya kondisi lingkungan, kematangan buah dan jenis kultivar (Sulbaran *et. al*, 2008). Mercadante *et. al*, (1997) mengungkapkan bahwa buah dari daerah yang beriklim panas mengandung beta-karoten lebih tinggi daripada buah yang berasal dari iklim sedang. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, diketahui bahwa mangga varietas Criollo mengandung beta-karoten lebih banyak daripada varietas yang lainnya, seperti varietas Keith yang tumbuh di Bahia,

Brazil (15 mg beta-karoten/kg), varietas Hi la cha yang tumbuh di Maracaibo, Venezuela (12 mg beta-karoten/kg) (Sulbaran *et. al*, 2008).

Kandungan beta karoten dalam buah mangga yang bermanfaat bagi manusia merupakan nikmat yang diberikan Allah kepada manusia yang harus disyukuri.

Hal ini diterangkan dalam surat ar-Rahman ayat 10-13 :

وَالْأَرْضَ وَضَعَهَا لِلْأَنَامِ ﴿١٠﴾ فِيهَا فَكِهَةٌ وَالنَّخْلُ ذَاتُ الْأَكْمَامِ ﴿١١﴾ وَالْحَبُّ ذُو الْعَصْفِ ﴿١٢﴾ وَالرِّيحَانُ ﴿١٣﴾ فَبِأَيِّ آيَاتِ رَبِّكُمَا تُكَذِّبَانِ ﴿١٤﴾

Artinya : Dan Allah telah meratakan bumi untuk makhluk(Nya). Di bumi itu ada buah-buahan dan pohon kurma yang mempunyai kelopak mayang. Dan biji-bijian yang berkulit dan bunga-bunga yang harum baunya. Maka nikmat Tuhan kamu yang manakah yang kamu dustakan?

Surat ar-Rahman ayat 10-13 berisi tentang nikmat Allah yang diberikan kepada manusia di dunia. Kata *وضعتها* yang artinya meratakan adalah menghamparkan bumi. Kata *للانام* yang artinya untuk makhluk menunjukkan makhluk Allah yang tinggal di bumi dalam hal ini adalah manusia. Allah menghamparkan tanah untuk manusia agar manusia bisa mengambil manfaat dari tanah tersebut. Di tanah tersebut terdapat tumbuh-tumbuhan dalam ayat ini disebutkan *فكهة* yang artinya buah-buahan dan *النخل* yang artinya pohon kurma, *الحب* yang artinya biji-bijian, dan *الريحان* artinya bunga-bunga yang harum baunya (al-Qarni, 2008).

Tanaman mangga termasuk dalam kelompok buah-buahan (*فكهة*) karena umumnya tanaman tersebut yang dimanfaatkan adalah buahnya. Secara umum semua buah mangga memiliki kandungan vitamin A dan C yang cukup tinggi,

masing-masing sebesar 1.000 IU/100 g bobot segar dan 20 mg/100 g bobot segar (Sistrunk dan Moore, 1983). Mangga juga mengandung serat, satu buah mangga mengandung 7 gram serat yang dapat membantu sistem pencernaan. Sebagian besar serat larut dalam air dan dapat menjaga kolesterol agar tetap normal. Ekstrak buah mentah, dan ekstrak kulit batang, batang dan daun mangga juga memiliki khasiat antibiotik (Ide, 2004).

Ayat 13 surat ar-Rahman yang berarti ‘nikmat Tuhan manakah yang kamu dustakan?’ merupakan ayat yang diulang-ulang dalam surat ar-Rahman. Pengulangan ini menunjukkan suatu pesan penting bahwa Allah telah melimpahkan rahmatNya untuk manusia namun kebanyakan manusia lupa untuk bersyukur bahkan mendustakan nikmat Allah. Rasa syukur manusia dapat diimplementasikan dengan cara tidak merusak alam termasuk tumbuh-tumbuhan dan mampu mengelola tumbuhan untuk diambil manfaatnya (al-Qarni, 2008).

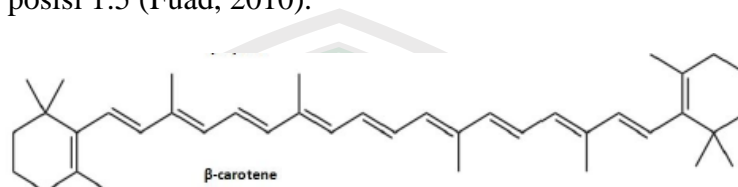
2.2 Beta Krotan

2.2.1 Deskripsi Beta Karoten

Beta karoten merupakan salah satu jenis karotenoid. Karotenoid merupakan salah satu dari empat pigmen alami tumbuhan (karotenoid, anthosianin, betalains dan klorofil) yang bertanggung jawab terhadap warna tumbuhan. Karotenoid yang diisolasi pertama kali adalah beta karoten. Beta karoten dikristalisasi oleh Wachenroder pada tahun 1831 dari ekstrak wortel dan diberi nama karoten. (Zhou, 2012).

Karoten dengan rumus molekul $C_{40}H_{56}$ adalah hidrokarbon yang tidak jenuh dan mengandung 11 sampai 12 ikatan rangkap dan tersusun dari unit-unit isoprena

dan sepuluh gugus metal. Karotenoid memiliki struktur dasar yang terdiri atas delapan unit isoprena yang saling berhubungan dan dua gugus metal yang terdekat dari pusat molekul berada pada posisi 1.6, sedangkan gugus metal yang lain berada pada posisi 1.5 (Fuad, 2010).



Gambar 2.4 Struktur karotenoid. Beta-karoten (siklik) merupakan karotenoid yang tidak mengandung oksigen (Namitha, 2010).

2.2.2 Fungsi Biologis Beta Karoten

Karotenoid memiliki fungsi esensial dalam fotosintesis. Contohnya, zeaxanthin membantu menangkap cahaya, menstabilkan membran tilakoid dan melindungi pusat reaksi fotosintesis dari foto-oksidan dengan cara mendispersikan energi cahaya berlebih yang telah didapatkannya dari antena pigmen (Niinements *et. al.*, 2003). Peran karotenoid dalam mengumpulkan cahaya adalah memperluas keefektifan spektrum cahaya untuk fotosintesis (Marin *et. al.* 2011).

Komposisi karotenoid dalam kloroplas kemungkinan sedikit. Sebaliknya, komposisi karotenoid di dalam kromoplas bunga dan buah kemungkinan adalah banyak karena menyediakan banyak manfaat untuk menarik polinator dan herbivora yang akan menyebarkan biji (Zhou, 2012). Beberapa karotenoid berfungsi sebagai prekursor hormon pertumbuhan yaitu asam absisat (ABA) dan strigolactones (Jiang *et. al.*, 2008).

Selain memberi warna pada buah, bunga, pada beberapa fungi dan bakteri karotenoid berfungsi untuk melindungi organisme dari cahaya dan kerusakan

oksidatif. Bau harum dari beberapa bunga juga dihasilkan ketika beta-karoten dan alfa-karoten dipecah oleh *carotenoid cleavage dioxygenases* (CCDs) (Baldermann *et. al.*2010). Kecuali kumbang, hewan tidak bisa mensintesis karotenoid, tetapi beberapa hewan dapat mengakumulasi karotenoid pada bagian-bagian tertentu dari tubuh mereka dengan cara memakan tumbuhan (Moran *et. al.*, 2010). Misalnya, karotenoid yang bertanggung jawab dalam warna merah muda ikan salmon, warna kuning dari kuning telur dan warna merah dari bulu burung bangau (Zhou, 2012).

Karotenoid merupakan bagian yang penting dalam makanan manusia, misalnya sebagai sumber vitamin A, pelindung cahaya mata dan sebagai antioksidan. Pada awal tahun 1930, ilmuwan biokimia menemukan bahwa karotenoid yang mengandung cincin beta seperti beta-karoten dapat diubah menjadi vitamin A dalam tubuh tikus. Oleh karena itu, karotenoid tersebut disebut sebagai provitamin A. Provitamin A yang dikonsumsi penting untuk mencegah kebutaan pada mata. Selain berperan penting dalam melindungi penglihatan, karotenoid juga merupakan antioksidan yang dapat membantu melawan radikal bebas yang dapat merusak DNA dan fungsi sistem imun (Azqueta dan Collins, 2012; Rossoni *et. al.*, 2012). Karotenoid seperti likopen telah diteliti memiliki aktivitas anti kanker, yang berkontribusi dalam menghambat proliferasi sel yang tidak terkontrol dengan cara memperbaiki komunikasi antar sel (Bhuvaneshwari *et. al.*, 2005).

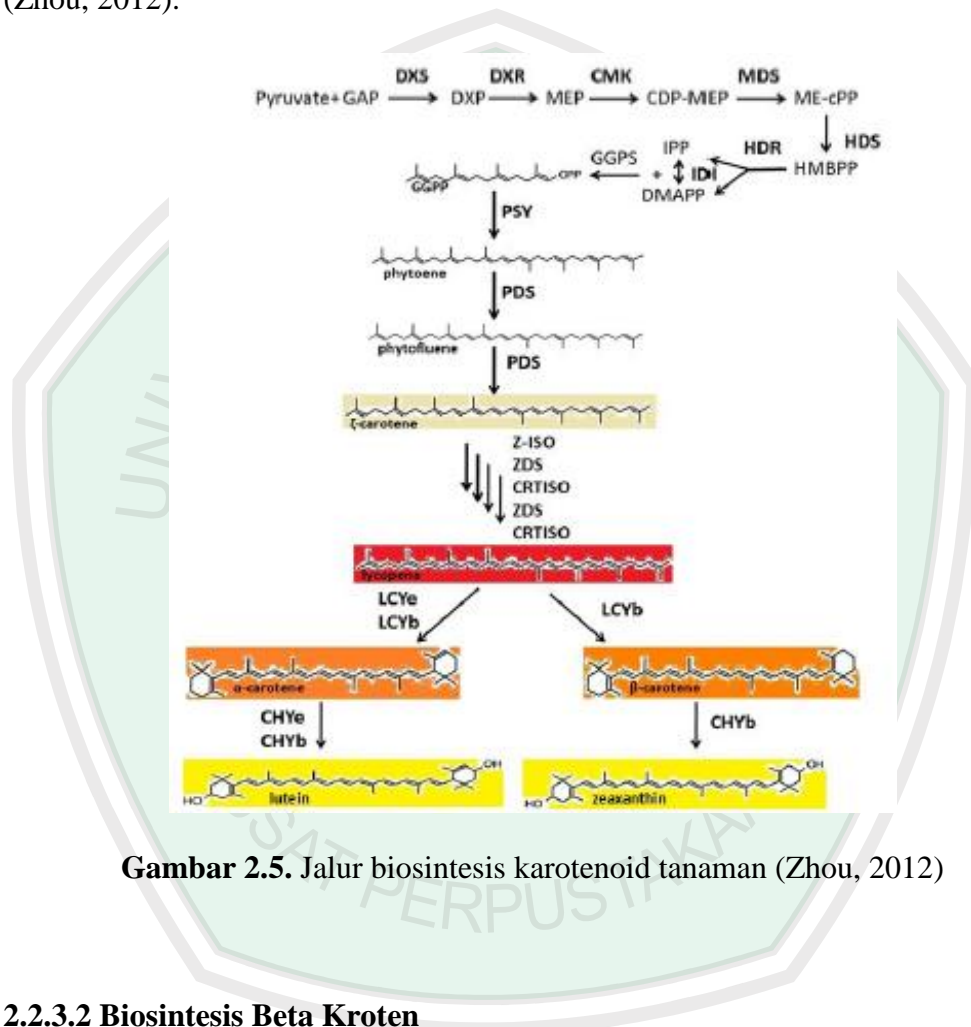
2.2.3 Biosintesis Beta Karoten

2.2.3.1 Biosintesis Prekursor Beta Karoten

Prekursor karotenoid (beta karoten) yaitu *geranyl-geranyl diphosphate* (GGDP) terbentuk oleh kondensasi tiga molekul *isopentenyl diphosphate* (IPP) yang berkarbon lima dengan satu molekul isomernya yaitu *dimethylallyl diphosphate* (DMAPP). Pada tumbuhan, IPP dan DMAPP dapat dibuat dengan dua cara yang terpisah yaitu jalur MEP (*methylerythritol 4-phosphate*) yang terjadi di plastida dan jalur MVA (*mevalonic acid*) yang terjadi di sitosol spesifik. Pada hewan dan fungi, kedua substrat tersebut hanya bisa diperoleh dari jalur MVA, sedangkan jalur MEP tidak ada. Pada tumbuhan, karotenoid dimulai dengan mensintesis IPP dan DMAPP melalui jalur MEP karena telah diketahui bahwa pergerakan DMAPP dan IPP dari sitosol ke plastid hanya sedikit. Oleh karena itu, dipercaya bahwa prekursor isoprenoid yang digunakan untuk mensintesis karotenoid dominan berasal dari jalur MEP (Rodriguez *et. al*, 2002).

Biosintesis prekursor karotenoid IPP dan DMAPP dimulai dengan DXS (*1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase*) mengkatalisis kondensasi metabolit glikolisis yaitu piruvat dan GAP (*glyceraldehydes-3-phosphate*) menjadi DXP (*1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate*) (Gambar 2.5). DXP kemudian diubah oleh DXR (*1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase*) menjadi MEP (*2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphatase*). MEP kemudian diubah oleh CMK (*CDP-ME kinase*), MDS (*ME-cPP sintase*), HDS (*HMBPP sintase*) dan HDR (*HMBPP reduktase*) menjadi IPP dan DMAPP. Jalur MEP menghasilkan IPP dan DMAPP oleh reaksi HDR. Isomerisasi antara IPP dan DMAPP dapat dikatalisis oleh IPP atau DMAPP *isomerase* (IDI) ketika senyawa tersebut dihasilkan di sitosol dan

mitokondria dengan jalur MVA. IPP dan DMAPP yang telah berada di plastida kemudian diubah menjadi GGPP oleh GGPP *sintase*. GGPP merupakan prekursor untuk banyak senyawa seperti karotenoid, giberelin dan rantai samping klorofil (Zhou, 2012).



Gambar 2.5. Jalur biosintesis karotenoid tanaman (Zhou, 2012)

2.2.3.2 Biosintesis Beta Krotan

Jalur biosintesis karotenoid tanaman merupakan salah satu aspek yang sedang diteliti secara intensif misalnya pada kentang, arabidopsis, wortel dan juga ubi kayu (Morris *et. al.*, 2004; Sakurai *et. al.*, 2007). Jalur dasar dari biosintesis karotenoid telah diketahui selama bertahun-tahun dan hal ini dapat dilihat pada gambar 2.5.

Tahap pertama yaitu kondensasi molekul GGPP menjadi *Phytoene* oleh enzim *phytoene synthase* (PSY). *Phytoene* yang merupakan senyawa tidak berwarna kemudian didehidrogenasi. Pada bakteri, proses desaturasi phytoene hanya dilakukan oleh satu enzim yaitu *karoten desaturase* (CrtI), tetapi pada tumbuhan dilakukan oleh dua enzim yaitu *phytoene desaturase* (pds) dan *zeta-karoten desaturase* (zds). *Phytoene desaturase* mengubah phytoene menjadi *zeta-karoten*, dan *zeta-karoten desaturase* mengubah zeta-karoten menjadi likopen. Siklus likopen merupakan jalur yang penting dari biosintesis karotenoid dimana pada tahap ini likopen akan diubah menjadi alfa karoten atau beta karoten. Pengubahan menjadi alfa karoten dikatalis oleh kombinasi enzim beta likopen siklase (LCYb) dan ϵ -likopen siklase (LCYe), sementara pengubahan menjadi beta karoten dikatalis hanya oleh beta likopen siklase (LCYb). Alfa karoten diubah menjadi lutein oleh beta karoten hidroksilase (CHYb) dan ϵ -karoten hidroksilase (CHYe). Beta karoten diubah menjadi zeaxanthin oleh beta karoten hidroksilase (CHYb) (Dwamena *et. al.* 2009).

2.2.3.3 Penyimpanan Beta Karoten

Karotenoid disintesis dan disimpan di kloroplas dan kromoplas. Ada lima tipe ultrastruktur kromoplas yaitu globular, membranous, tubular, retico-globular dan Kristal. Kromoplas globular merupakan tipe yang paling sering ditemui pada tanaman mangga (Vasquez, 2006), sementara kromoplas tubular sering ditemukan pada tanaman pisang dan kunyit. Buah tomat mengakumulasi likopen pada membrane plastid yang berbentuk Kristal. Komposisi karotenoid dan tipe lipid dan protein yang ada diperkirakan menjadi faktor kunci dalam mengontrol tipe

perkembangan kromoplas. Kromoplas terdiferensiasi secara langsung dari proplastida atau terbentuk dari diferensiasi amiloplas dan kloroplas. Kromoplas umumnya berkembang dari kloroplas, yang termodifikasi pada level ultrastruktural untuk mengakomodasi fungsi barunya yaitu penyimpanan karotenoid. Sistem penyimpanan karotenoid ini mencegah gangguan sel yang diakibatkan karena kelebihan senyawa karotenoid (Zhou, 2012).

Banyak karotenoid dimodifikasi setelah disintesis dengan cara dilengkapi dengan ester yang berbeda. Esterifikasi dan modifikasi karotenoid lainnya diperkirakan berfungsi untuk menstabilkan karotenoid yang dihasilkan dan untuk fungsi penyimpanan. Esterifikasi lutein berguna untuk melindunginya dari UV dan kerusakan panas. Ester grup yang berbeda dapat ditambahkan pada molekul karotenoid yang sama yang menghasilkan banyak puncak pada profil HPLC. Komponen karotenoid ester dapat dipisahkan dengan cara saponifikasi, suatu proses yang menggunakan alkali untuk memutus ikatan ester (Zhou, 2012).

2.2.3.4 Gen-gen yang Berperan dalam Biosintesis Beta Karoten

Karotenoid merupakan salah satu senyawa yang disintesis di plastid, terutama di kloroplas dan kromoplas oleh enzim yang disandi oleh DNA nuklear (Hirschberg, 2001). Peran gen-gen biosintesis karotenoid dalam proses regulasi meliputi gen-gen yang meregulasi jalur MEP dan gen-gen yang berperan dalam biosintesis karotenoid itu sendiri. Gen-gen yang meregulasi jalur MEP antara lain yaitu gen *DXS* (*1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase*) dan gen *HDR* (*HMBPP reduktase*). Sementara itu, pada biosintesis karotenoid terdapat beberapa

gen yaitu gen PSY, gen PDS, gen ZDS, gen LCYb, gen LCYe dan gen CHY (Zhou, 2012).

Gen *phytoene synthase* (PSY) merupakan gen yang mengkode enzim *phytoene syntase*. Enzim *phytoene syntase* merupakan enzim kunci dalam biosintesis beta karoten karena mengawali biosintesis beta karoten dengan mengubah *geranyl geranyl diphosphate* (GGDP) menjadi *phytoene* (Fuad, 2010). Gen PSY pada tanaman mangga telah dikloning dan diteliti ekspresinya oleh Luo *et. al.* (2012) pada mangga varietas Jinhuang. Gen PSY terletak pada lokus JQ277716 dengan panjang CDS (*coding DNA sequence*) adalah 1519 bp.

Gen PSY merupakan suatu keluarga gen kecil yang terdapat pada tumbuhan monokotil seperti padi, gandum dan jagung, sedangkan pada tanaman dikotil tomat terdapat dua gen PSY. Perbedaan anggota keluarga gen kecil PSY melibatkan regulasi *karotenogenesis* pada jaringan yang berbeda. Misalnya kedua gen PSY1 dan 2 sama-sama diekspresikan di jaringan daun padi dan jagung, namun pada endosperm varietas jagung kuning hanya terjadi transkripsi gen PSY1. Dua gen PSY tomat juga telah membuktikan pola ekspresi yang spesifik pada buah dan jaringan hijau. Transkripsi PSY3 khusus diekspresikan di akar, dan diperkirakan berperan dalam meregulasi induksi stres abiotik akar (Zhou, 2012).

Gen PSY merupakan jenis gen yang sering diinsersikan ke tanaman transgenik agar tanaman tersebut memiliki kandungan beta karoten yang tinggi, misalnya pada tanaman padi (*golden rice*) dan ubi kayu (Fuad, 2010). Over-ekspresi dari gen PSY dan gen CrtI (PDS) bakteri pada *golden rice* meningkatkan

kandungan beta karoten (Schaub *et. al*, 2005). Begitu juga pada ekspresi gen CrtB (PSY) di umbi kentang dapat meningkatkan kandungan karotenoid (Fuad, 2010).

Gen PSY merupakan keluarga gen yang terdiri atas Psy 1, Psy 2 dan Psy3. Psy 1, Psy 2 dan Psy 3 secara berurutan merupakan gen yang bertanggung jawab dalam biosintesis karotenoid di daun, buah dan akar. Mlalazi (2010) menjelaskan bahwa struktur nukleotida gen Psy terdiri dari enam *exon* yang dipisahkan oleh lima *intron*. Pada tanaman pisang, jagung dan beras ukuran dari ekson 2,3,4 dan 5 adalah 51, 173, 236 dan 193 bp. Ukuran ekson 1 antara 286 bp (psy 2 padi) hingga 457 bp (psy 1 pisang), sedangkan ekson 6 ukurannya bervariasi antara 150 bp (psy 2 pada jagung dan padi) hingga 183 bp (psy 1 pisang).

Ekspresi gen *phytoene synthase* (PSY) telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya memiliki hubungan yang tinggi dengan akumulasi karotenoid pada buah tomat (Giuliano *et al*, 1993), buah jeruk (Ikoma *et. al.*, 2001) dan buah lada (Romer *et al.*, 1993). Biji *Brassica napus* yang memiliki gen PSY transgenik mengandung akumulasi karotenoid 50 kali lebih banyak (Shewmaker *et al.*, 1999). Penelitian tentang gen PSY termasuk sequence dan ekspresinya dapat membantu memahami mekanisme regulasi biosintesis karotenoid suatu tanaman. Selain itu, sequence gen PSY yang lengkap dibutuhkan untuk mendesain marka STS (*Sequence tagged sites*) yang dapat digunakan untuk memilih plasma nutfah yang kandungan karotenoidnya tinggi (Borthakur *et al*, 2008).

2.2.3.5 Regulasi Biosintesis Beta-Karoten

Regulasi jalur biosintesis karotenoid sangatlah ketat, karena fungsinya yang sangat penting untuk kehidupan. Meskipun langkah-langkah enzimatik jalur

biosintesis karotenoid telah diketahui dengan baik, namun belum banyak diketahui mengenai bagaimana regulasi jalur tersebut (Cunningham *et. al*, 1998). Data penelitian menunjukkan bahwa jalur biosintesis karotenoid diregulasi oleh sinyal yang berhubungan dengan peran biologis karotenoid, faktor lingkungan, perkembangan tumbuhan dan kondisi penyimpanan. Jalur biosintesis karotenoid juga dikontrol oleh regulasi proses transkripsi dan post-transkripsi (Rodriguez, 2002).

Perubahan akumulasi karotenoid pada buah terjadi selama proses pematangan. Hal ini ditandai dengan perubahan warna buah dari hijau menjadi merah atau oranye atau kuning. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh degradasi klorofil dan pembentukan karoten. Perubahan yang terjadi pada proses pematangan bukan hanya warna, tapi juga rasa dan tekstur buah. terdapat hubungan yang erat antara warna dengan peningkatan kadar gula, penurunan rasio asam malat dan asam sitrat, dan penurunan keasaman total pada jaringan buah tomat yang terjadi selama pemasakan (Masithoh, 2013).

Proses pematangan buah merupakan fenomena yang kompleks, dimana terdapat banyak gen yang terlibat dalam proses tersebut. Berdasarkan penelitian Godoy *et. al* .(2009) pada pematangan buah mangga ekspresi dari gen APX (*ascorbat peroxidase*) dan AOX (*ascorbat oksidase*) meningkat. Gen tersebut berhubungan dengan peningkatan asam askorbat saat pematangan buah.

2.3 Marka Molekuler

2.3.1 Pengertian dan Macam-macam Marka Molekuler

Marka atau penanda molekuler merupakan suatu metode penunjuk keberadaan rangkaian nukleotida (DNA atau RNA) dan protein yang

menyandakan suatu sifat atau memberikan informasi tentang keberadaan posisi suatu sekuens di dalam genom (Brown, 1996). Penanda molekuler DNA langsung berintegrasi dengan genetik dan menggambarkan keadaan genom yang sesungguhnya (Noorrohmah, 2010). Sedangkan penanda molekuler protein (isoenzim) merupakan metode yang sesuai untuk mendeteksi perubahan genetik namun terbatas dalam jumlah sampel, dan hanya daerah pengkode protein saja yang terdeteksi.

Penanda dengan menggunakan DNA terbagi menjadi dua tipe yaitu (1) non PCR seperti RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dan (2) berbasis PCR seperti RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequences Repeat / microsatellite*), dan ISSR (*Inter Simple Sequences Repeat / microsatellite*). Analisis teknik tersebut yaitu dengan terbentuknya separasi pita hasil proses elektroforesis sebagai pencerminan alel atau lokus (Powell *et al.* 1996), namun tiap teknik tersebut mempunyai keterbatasan.

2.3.2 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Penanda molekuler yang banyak digunakan dalam analisis keragaman genetik tumbuhan, salah satunya adalah *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Teknik ini digunakan untuk mengidentifikasi genotipe tumbuhan, karena memiliki kelebihan dalam pelaksanaan dan analisisnya. Keuntungan dari teknik ini adalah (Isabel *et al.* 1993):

1. Dapat menggunakan sampel dengan jumlah besar dan relatif cepat, serta secara ekonomi hanya menggunakan bahan dalam jumlah mikro

2. Amplikon tidak tergantung dari ekspresi ontogenetik
3. Banyak daerah genom dapat diamplifikasi dengan jumlah yang tak terbatas.
4. Selain itu tidak memerlukan data sekuen terlebih dahulu karena bekerja secara acak.

Penanda RAPD memiliki panjang primer 10 bp, yang dapat menempel secara acak pada situs target homolognya dalam genom. Kelemahan teknik ini adalah reproduibilitas yang rendah (Jones *et al.* 1997) karena dipengaruhi oleh banyak faktor meliputi isolasi DNA (Korbin *et al.* 2000), konsentrasi DNA cetakan dan primer, konsentrasi Taq DNA polymerase, suhu penempelan primer pada cetakan (*annealing*), jumlah siklus thermal dan konsentrasi MgCl₂ (Bassam *et al.* 1992 ; Kernodle *et al.* 1993). Kelemahan ini dapat diatasi dengan membuat reaksi dan kondisinya sehomogen mungkin, skrining primer, memilah pita-pita fragmen DNA yang jelas, menggunakan suhu *annealing* yang optimal, dan penambahan 1-2 basa pada primer untuk mempertinggi spesifikasi penempelan DNA (Tanaka, 2002).

2.3.3 Penggunaan Marka Molekuler untuk Pemuliaan Tanaman

Penerapan marka molekuler akhir-akhir ini menunjukkan perkembangan yang semakin pesat. Teknik ini telah banyak membantu dalam berbagai bidang, seperti pemuliaan tanaman. Dalam pemuliaan tanaman, analisa variasi genetik merupakan kegiatan yang penting. Menurut Romeida (2012) informasi variasi genetik dapat meningkatkan efisiensi pada tahap awal seleksi dan dapat memperpendek waktu yang diperlukan untuk program pemuliaan tanaman. Selain itu, penanda molekuler dapat memberikan gambaran hubungan kekerabatan yang

lebih akurat antara suatu spesies tanaman dibandingkan karakterisasi morfologi karena analisis DNA sebagai materi genetik tidak dipengaruhi oleh lingkungan (Liu *et al.* 2006).

2.3.3.1 MAS (*Marker Assisted Selection*)

MAS (*Marker Assisted Selection*) merupakan suatu penanda molekuler yang digunakan untuk membantu proses penyeleksian tanaman dengan sifat tertentu dalam kegiatan pemuliaan tanaman. MAS dapat dibuat dari marka umum (seperti RAPD dan SSR) dan marka spesifik yang telah dikarakterisasi sekuen hasil amplifikasinya (misalnya SNP/ *Single Nucleotida Polymorphisme*) (Zhang, 2001).

Marka RAPD berbasis PCR berguna dalam MAS karena mudah, cepat, relatif tidak mahal, tidak membutuhkan isotop radioaktif, dan dapat digunakan sampel dalam jumlah banyak. Tetapi primer RAPD bersifat acak artinya banyak daerah lokus yang berbeda pada genom yang teramplifikasi, sehingga menghasilkan produk amplifikasi yang banyak (Zhang, 2001).

Kekurangan RAPD dapat diatasi dan diperbaiki penggunaannya untuk MAS dengan cara diubah menjadi marka SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*). Marka SCAR dikembangkan dari kloning dan sekuensing hasil amplifikasi RAPD, menghasilkan primer spesifik pada target sekuen. Pengembangan MAS dari primer gen spesifik juga dengan metode yang sama. Strategi ini secara luas dan sukses digunakan untuk membuat MAS pada berbagai tanaman pertanian (Zhang, 2001).

2.4 Desain Primer

Desain primer yang baik sangat penting untuk keberhasilan reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam desain primer antara lain (Fatchiyah, 2012):

1. Panjang primer: Secara umum panjang optimal primer PCR adalah 18-22 basa.
2. *Primer Melting Temperatur: Primer Melting Temperatur* (T_m) merupakan temperatur yang diperlukan oleh separuh primer dupleks mengalami disosiasi/ lepas ikatan. Primer dengan T_m berkisar antara 52-58° C sangat ideal, sedangkan T_m di atas 65°C akan mengurangi efektifitas annealing sehingga proses amplifikasi DNA kurang berjalan baik. T_m ini sangat ditentukan oleh jumlah basa GC. T_m primer dapat dihitung dengan formula :
 - a. $T_m (^{\circ}\text{C}) = ((\text{G}+\text{C}) \times 4) + ((\text{A}+\text{T}) \times 2)$
3. *Primer Annealing Temperature: Primer annealing temperature* (T_a) merupakan suhu yang diperkirakan primer dapat berikatan dengan template (DNA) dengan stabil (*DNA-DNA hybrid stability*). Jika suhu annealing tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer dengan DNA template sehingga akan menghasilkan produk PCR yang rendah (kurang efisien). Namun jika T_a terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA tempat yang tidak spesifik. T_a dapat dihitung dengan menggunakan formula di bawah ini:

$$T_a = 0.3 \times T_m(\text{primer}) + 0.7 T_m (\text{product}) - 14.9$$

4. Kandungan GC: Jumlah Basa G dan C (*GC content*) di dalam primer yang ideal sekitar 40-60%.
5. *GC Clamp*: Jumlah basa G dan C yang terdapat pada 5 basa terakhir (3') disebut dengan *GC clamp*. *GC clamp* yang baik sekitar 3 basa G/C dan tidak melebihi 5 basa G/C. Keberadaan G/C di ujung 3' primer sangat membantu terjadinya stabilitas ikatan antara primer dengan DNA templat yang diperlukan untuk inisiasi polymerase DNA (proses PCR).
6. Struktur Primer Sekunder:
 - i) *Hairpin* : terbentuknya struktur *loop/hairpin* pada primer sebaiknya dihindari, namun sangat sulit untuk memperoleh primer tanpa memiliki struktur hairpin. Hairpin pada ujung 3' dengan ΔG (energy yang diperlukan untuk memecah struktur hairpin) = -2 kcal/mol dan hairpin internal dengan $\Delta G = -3$ kcal/mol masih dapat ditoleransi.
 - ii) *Self Dimer* : primer dapat berikatan dengan primer lainnya yang sejenis disebut dengan *self-dimer*. *Self-dimer* pada ujung 3' dengan $\Delta G = -5$ kcal/mol dan self- dimer pada bagian internal dengan $\Delta G = -6$ kcal/mol masih dapat ditoleransi.
 - iii) *Cross Dimer* : Primer dapat berikatan dengan primer pasangannya (reverse dan forward) sehingga disebut cross dimmers. Cross dimer re homologous. Optimally a 3' end cross dimer with a ΔG of -5 kcal/mol and an internal cross dimer pada ujung 3' dengan $\Delta G = -5$ kcal/mol dan self-dimer pada bagian internal dengan $\Delta G = -6$ kcal/mol masih dapat ditoleransi.

7. Pengulangan : Primer sebaiknya tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa dan maksimum pengulangan 2 basa sebanyak 4 kali masih dapat ditoleransi. Misalnya ATATATAT. Selain itu, pengulangan satu basa berurutan sampai 4 kali masih dapat ditoleransi. Misalnya AGCGGGGGATGGGG memiliki urutan basa G diulang 5 kali berturut-turut.
8. *Avoid Cross homology*: *Cross* homologi dapat dihindari dengan cara analisis homologi primer dengan DNA genom melalui BLAST-NCBI.
9. *Optimum Annealing temperature* (T_a Opt): Suhu annealing optimum sangat mempengaruhi hasil PCR. (T_a Opt) ini dapat dihitung dengan cara :
$$T_a \text{ Opt} = 0.3 \times (T_m \text{ of primer}) + 0.7 \times (T_m \text{ of product}) - 25$$
10. *Primer Pair T_m Mismatch*: Perbedaan T_m sepasang primer sebaiknya tidak lebih dari 5°C.

2.5 Analisis Variasi Genetik dari Marka Molekuler

Pita DNA yang dihasilkan karena polimorfisme melalui elektroforesis dapat dianalisis untuk melihat keanekaragaman genetik dari suatu kelompok organisme. Analisis variasi genetik dapat dilakukan dengan cara membuat kesepakatan biner, seperti jika ada pita pada suatu posisi berat molekul dianggap bernilai 1, jika tidak ada bernilai 0. Beberapa program statistik khusus yang dapat digunakan antara lain NT-Sys, Popgen, Arlequin dan Treecon. Masing-masing *software* digunakan sesuai dengan kebutuhan analisis (Suryanto, 2003).