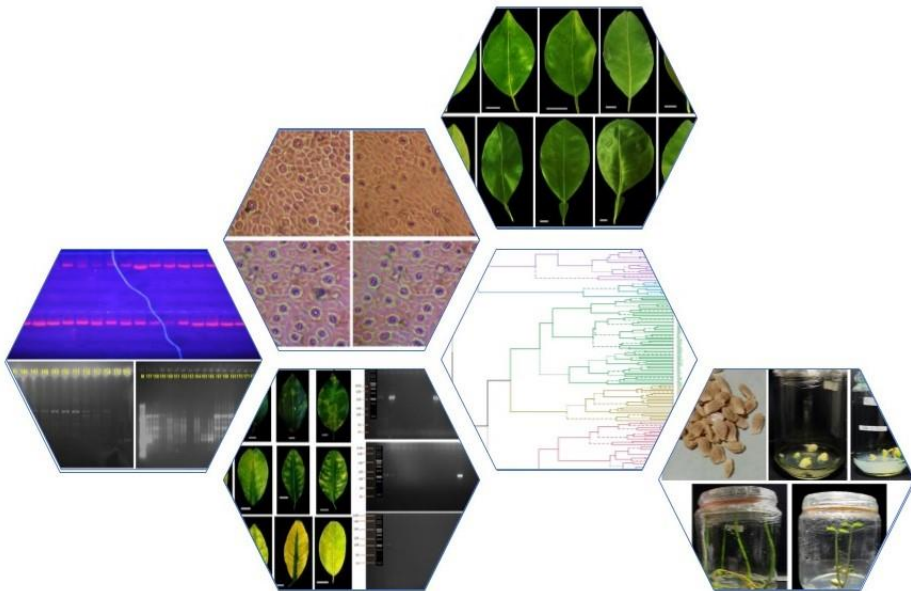


**ANALISIS KERAGAMAN JERUK LOKAL (*Citrus* spp.)
SULAWESI SELATAN, DETEKSI MOLEKULER KEBERADAAN
CVPD DAN POTENSI PENGEMBANGANNYA MELALUI TEKNIK
KULTUR *IN VITRO***

*DIVERSITY ANALYSIS OF LOCAL ORANGE (*Citrus* spp.) IN SOUTH
SULAWESI, MOLECULAR DETECTION OF CVPD, AND ITS
POTENTIAL CULTIVATION USING TISSUE CULTURE*



**MUSTIKA TUWO
P013201005**



**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ANALISIS KERAGAMAN JERUK LOKAL (*Citrus* spp.)
SULAWESI SELATAN, DETEKSI MOLEKULER KEBERADAAN
CVPD DAN POTENSI PENGEMBANGANNYA MELALUI TEKNIK
KULTUR *IN VITRO***

*DIVERSITY ANALYSIS OF LOCAL ORANGE (*Citrus* spp.) IN SOUTH
SULAWESI, MOLECULAR DETECTION OF CVPD, AND ITS
POTENTIAL CULTIVATION USING TISSUE CULTURE*

**MUSTIKA TUWO
P013201005**



**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ANALISIS KERAGAMAN JERUK LOKAL (*Citrus* spp.)
SULAWESI SELATAN, DETEKSI MOLEKULER KEBERADAAN
CVPD DAN POTENSI PENGEMBANGANNYA MELALUI TEKNIK
KULTUR *IN VITRO***

*DIVERSITY ANALYSIS OF LOCAL ORANGE (Citrus spp.) IN SOUTH
SULAWESI, MOLECULAR DETECTION OF CVPD, AND ITS
POTENTIAL CULTIVATION USING TISSUE CULTURE*

Disertasi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar doktor

Program Studi Ilmu Pertanian

Disusun dan diajukan oleh

MUSTIKA TUWO
P013201005

kepada

**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

DISERTASI

ANALISIS KERAGAMAN, JERUK LOKAL (*Citrus spp.*) SULAWESI SELATAN, DETEKSI MOLEKULER KEBERADAAN CVPD DAN POTENSI PENGEMBANGANNYA MELALUI KULTUR *IN VITRO*

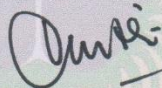
MUSTIKA TUWO
P013201005

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Doktor pada 27 Februari
2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Studi Ilmu Pertanian
Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan
Promotor



Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M.Sc.
NIP. 196503161989032002

Ko-promotor



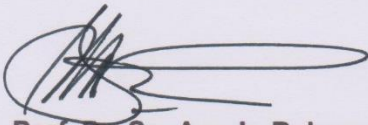
Prof. Dr. Ir. Andi Nasruddin, M.Sc.
NIP. 196012311986011011

Ko-promotor



Dr. Elis Tambaru, M. Si.
NIP. 196301021990022001

Ketua Program Studi,



Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Baharuddin
NIP. 19601224198601101

Dekan Sekolah Pascasarjana,



Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.MedEd.
NIP. 196612311995031009

DISSERTATION

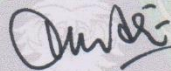
DIVERSITY ANALYSIS OF LOCAL ORANGE (Citrus spp.) IN SOUTH SULAWESI, MOLECULAR DETECTION OF CVPD, AND ITS POTENTIAL CULTIVATION USING TISSUE CULTURE

MUSTIKA TUWO
Student ID. P013201005

Has been examined and defended in front of the dissertation examination committee on date February 27, 2024 and declared eligible

Approved by

Supervisor Commission,
Supervisor



Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M.Sc.
NIP. 196503161989032002

Co-supervisor



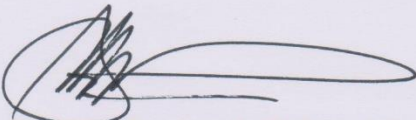
Prof. Dr. Ir. Andi Nasruddin, M.Sc.
NIP. 196012311986011011

Co-supervisor



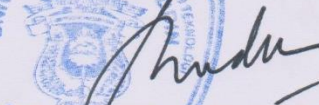
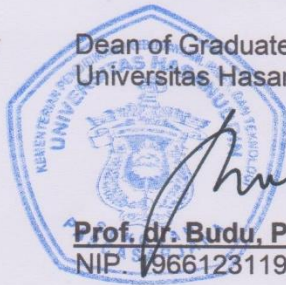
Dr. Elis Tambaru, M. Si.
NIP. 196301021990022001

Head of Agricultural Sciences Study
Program



Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Baharuddin
NIP. 19601224198601101

Dean of Graduate School
Universitas Hasanuddin,



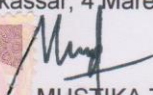
Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.MedEd.
NIP. 196612311995031009

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi berjudul "**Analisis Keragaman Jeruk Lokal (*Citrus* spp.) Sulawesi Selatan, Deteksi Molekuler Keberadaan CVPD dan Potensi Pengembangannya Melalui Teknik Kultur *In Vitro***" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M. Sc. sebagai Promotor dan Prof. Dr. Ir. Andi Nasaruddin, M. Sc. sebagai Ko-promotor-1 serta Dr. Elis Tambaru, M. Si. Sebagai Ko-promotor-2). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka. Isi disertasi ini telah diseminarkan dalam seminar internasional dengan judul artikel "Shoot Induction of Japansche Citroen (JC) (*Citrus limonia* Osbeck.) as Rootstock for *In Vitro* Micrografting", diseminarkan dalam seminar internasional dan dipublikasikan dalam prosiding **International IOP Conference Series: Earth and Environmental Science** 886 dengan judul artikel "RAPD Primer Screening as a Preliminary Study to Analyze the Genetic Diversity of *Citrus* spp. in South Sulawesi, Indonesia", DOI: 10.1088/1755-1315/886/1/012017. Isi disertasi juga telah dipublikasikan di **International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology**, Vol.12. No. 6. Hal. 2499-2506 dengan judul "Application of RAPD Molecular Technique to Study the Genetic Variations of *Citrus* in South Sulawesi, Indonesia" Tahun 2022; di **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** (*Accepted*) dengan judul "Uncovering the Presence of CVPD Disease in Citrus Varieties of South Sulawesi, Indonesia: A Molecular Approach" Tahun 2023; di **Jurnal Scientifica**, Vol. 2023 dengan judul "Estimating the Genetic Diversity of Oranges *Citrus* spp. in South Sulawesi, Indonesia, Using RAPD Markers" Tahun 2023; di **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Vol. 26, No. 6, Hal. 321-333 dengan judul "Diverse Morphology and Anatomy of *Citrus* spp. (Orange) in South Sulawesi, Indonesia Plantations: A Comprehensive Study" Tahun 2023; di **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Vol. 26, No. 11, Hal. 576-585 dengan judul "In Vitro Culture Optimization of Pomelo Seeds (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.): A South Sulawesi Orange" Tahun 2023. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa disertasi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 4 Maret 2024




MUSTIKA TUWO
NIM P013201005

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, ucapan syukur yang tak terhingga atas nikmat kesehatan, kesempatan, dan kemudahan dari Allah SWT, sehingga perjalanan akademik saya dapat terlaksana dengan lancar. Proses penyelesaian studi ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan dari banyak pihak dalam berbagai kapasitas dan keahlian yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu. Ucapan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada promotor saya Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M. Sc. serta ko-promotor Prof. Dr. Ir. Andi Nasruddin, M. Sc. dan Dr. Elis Tambaru, M. Si. atas motivasi dan bimbingannya dalam penyusunan disertasi dan artikel. Ucapan terima kasih juga saya haturkan kepada tim penilai Prof. Dr. Ir. Baharuddin, Dipl. Ing. Agr., Prof. Dr. Ir. Itji Diana Daud, M.S., Prof. Dr. Ir. Ade Rosmana, M. Sc. dan Dr. Siti Halimah Larekeng, S. P., M. Si. atas saran dan kritik demi kesempurnaan naskah disertasi. Saya ucapkan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Riset dan Teknologi Dikti atas bantuan penelitian pada skim Penelitian Disertasi Doktor 2021. Ucapan terima kasih kepada Rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M. Sc., Dekan Sekolah Pasca Sarjana Prof. dr. Budu, Ph. D., Sp.M(K), M. MedEd., Ketua Program Studi Ilmu Pertanian Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Baharuddin, para dosen S3 Ilmu Pertanian serta seluruh staf Sekolah Pascasarjana atas pelayanan terbaik selama studi. Saya juga mengucapkan terima kasih kepada teman-teman mahasiswa Pascasarjana Prodi Ilmu Pertanian Angkatan 2020 untuk dukungan dan persahabatan selama kuliah.

Penghargaan dan terima kasih juga saya ucapkan untuk Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Dr. Eng. Amiruddin, S. Si., M. Si. Ketua Departemen Biologi FMIPA Dr. Magdalena Litaay, M. Sc. beserta seluruh dosen Departemen Biologi atas motivasi dan pemberian izin untuk melanjutkan Pendidikan pada jenjang doktor. Ucapan terima kasih saya haturkan kepada seluruh Pemerintah Daerah Kabupaten Pangkep, Kabupaten Sidrap, Kabupaten Bantaeng, Kabupaten Luwu Utara dan Kabupaten Selayar atas dukungan dan kebaikan dalam berbagi informasi, pengetahuan, pengalaman dan pendapat mereka tentang gejala penyakit CVPD di lapangan.

Terakhir, saya berterima kasih atas doa, cinta, berkah, dukungan dan motivasi dari orang tua saya Ayahanda H. La Tuwo, Ibunda Hj. Buba serta kepada saudariku Hj. Sumiati Tuwo, S. IP., dan Rahma Tuwo, S. Sos. yang selalu memberikan dukungan dan semangat. Banyak terima kasih dan cinta untuk suami tercinta H. Muktiadi Mahmud, ST. dan putraku tersayang Fadhil Asyam T. Mukti atas pengertian, perhatian, kesabaran dan motivasinya, sehingga saya mampu menyelesaikan studi doktoral. Semoga segala aktivitas, bantuan dan dukungan semua pihak menjadi catatan kebaikan dan pahala bagi kita semua. Aamiin Yaa Rabb.

Penulis,



Mustika Tuwo

ABSTRAK

MUSTIKA TUWO. *Pemuliaan Jeruk Lokal Sulawesi Selatan: Analisis Keragaman, Deteksi Molekuler Keberadaan CVPD dan Potensi Pengembangannya Melalui Teknik Kultur In Vitro* (dibimbing oleh **Tutik Kuswinanti, Andi Nasruddin, dan Elis Tambaru**).

Jeruk merupakan komoditas penting di Sulawesi Selatan dengan banyak varietas. Namun, tantangan utama dalam produksinya adalah penyebaran penyakit CVPD. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan keragaman jeruk lokal yang terdapat di Sulawesi Selatan; mendeteksi keberadaan bakteri Kandidatus *Liberibacter asiaticus* melalui PCR pada sentra pertanaman jeruk di Sulawesi Selatan; serta menentukan konsentrasi BAP yang tepat terhadap pertumbuhan *in vitro* varietas jeruk lokal Sulawesi. Untuk mencapai ketiga tujuan tersebut, penelitian ini menggunakan analisis pengelompokan berdasarkan metode UPGMA, PCoA, analisis deskriptif, dan SPSS. Studi ini menunjukkan bahwa keragaman genetik jeruk di Sulawesi Selatan tergolong sedang. Variasi genetik yang berbeda dalam varietas jeruk dapat menyebabkan perbedaan dalam respon tanaman terhadap infeksi penyakit. Hasil deteksi molekuler menunjukkan terdapat varietas jeruk positif mengandung bakteri Kandidatus *Liberibacter asiaticus* dengan munculnya fragmen DNA pada ukuran 1160 bp. Varietas jeruk tersebut adalah jeruk nipis, jeruk siam, jeruk keprok batu 55 dan jeruk keprok selayer yang masing-masing berasal dari Kabupaten Sidrap, Luwu Utara dan Bantaeng. Namun, hasil pengamatan serangga vektor di lapangan tidak ditemukan *Diaphorina citri* di lima lokasi areal pertanaman jeruk. Kemungkinan inokulum CVPD berasal dari penyebaran tunas terinfeksi melalui okulasi atau *grafting*. Beberapa upaya telah dilakukan untuk mengendalikan penyakit CVPD, namun demikian penyakit CVPD masih ditemukan diberbagai sentra pertanaman jeruk. Strategi pengendalian secara holistik diperlukan dalam pengelolaan penyakit CVPD. Tindakan strategis yang dapat dilakukan adalah produksi tanaman jeruk bebas patogen melalui kultur *in vitro*. Regenerasi tanaman melalui kultur *in vitro* melibatkan penggunaan zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk memacu pertumbuhan tanaman. Penambahan BAP sebagai ZPT pada medium kultur jaringan memberikan pengaruh yang signifikan pada pertumbuhan tunas jeruk pamele pangkep merah pada konsentrasi 1.5 ppm serta pertumbuhan jumlah tunas dan daun jeruk keprok selayer pada konsentrasi 2 ppm.

Kata kunci: BAP, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, keragaman, mikropropagasi


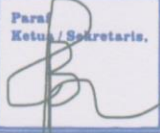
 GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris.
Tanggal : _____	

ABSTRACT

MUSTIKA TUWO. *Breeding of Local Citrus in South Sulawesi: Diversity Analysis, Molecular Detection of CVPD Presence, and Development Potential through In Vitro Culture Technique* (supervised by **Tutik Kuswinanti, Andi Nasruddin, and Elis Tambaru**).

Citrus is a crucial commodity in South Sulawesi with numerous varieties. However, its production faces a major challenge due to the spread of CVPD disease. The objectives of this research are to determine the diversity of local citrus in South Sulawesi; detect the presence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* bacteria through PCR in citrus cultivation centers in South Sulawesi; and identify the appropriate concentration of the growth regulator BAP for in vitro growth of local citrus varieties in South Sulawesi. To achieve these objectives, the study employs clustering analysis using the UPGMA, PCoA, descriptive analysis, and SPSS analysis. The study reveals that the genetic diversity of citrus in South Sulawesi is moderate. Different genetic variations in citrus varieties can lead to variations in plant responses to disease infections. Molecular detection results indicate the presence of citrus varieties positive for *Candidatus Liberibacter asiaticus* bacteria, with DNA fragments appearing at 1160 bp. These varieties include lime, siam orange, keprok batu 55, and keprok selayar, each originating from Sidrap, North Luwu, and Bantaeng districts. However, field observations did not find *Diaphorina citri* insects in five citrus cultivation locations. CVPD inoculum possibly originated from infected shoots which spread through budding or grafting. Despite efforts to control CVPD, the disease is still found in various citrus cultivation centers. A holistic control strategy is required for CVPD management. One strategic approach is the production of pathogen-free citrus plants through in vitro culture. Plant regeneration through in vitro culture involves the use of plant growth regulators (PGRs) to stimulate plant growth. The addition of BAP as a PGR in tissue culture medium significantly influences the growth of red pamelo pangkep citrus shoots at a concentration of 1.5 ppm and the growth of the number of shoots and leaves of selayar keprok at a concentration of 2 ppm.

Keywords: BAP, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, diversity, micropropagation

 GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS	
Abstrak ini telah diperiksa.	Para Ketua / Sekretaris.
Tanggal : _____	

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Review of Evidence/ Gap of Knowledge	3
1.3 Rumusan Permasalahan/ Tujuan Penelitian	10
1.4 Kerangka Penelitian	10
BAB II ANALISIS KERAGAMAN JERUK LOKAL SULAWESI SELATAN BERDASARKAN KARAKTER FENOTIP, ANATOMI DAN GENOTIP MELALUI MARKAH <i>Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)</i>	12
2.1 Abstrak	12
2.2 Pendahuluan	13
2.3 Metode Penelitian.....	14
2.4 Hasil Penelitian.....	20
2.5 Pembahasan	40
2.6 Kesimpulan.....	47
BAB III DETEKSI MOLEKULER BAKTERI CANDIDATUS <i>Liberibacter Asiaticus</i> PENYEBAB PENYAKIT CVPD PADA TANAMAN JERUK <i>Citrus</i> spp. DI SULAWESI SELATAN	48
3.1 Abstrak	48
3.2 Pendahuluan	49
3.3 Metode Penelitian.....	50
3.4 Hasil Penelitian.....	55
3.5 Pembahasan	66
3.6 Kesimpulan.....	74
BAB IV PENGARUH BAP TERHADAP PERTUMBUHAN JERUK <i>Citrus</i> spp. LOKAL SULAWESI SELATAN.....	76
4.1 Abstrak	76
4.2 Pendahuluan	77
4.3 Metode Penelitian.....	78
4.4 Hasil Penelitian.....	80
4.5 Pembahasan	91
4.6 Kesimpulan.....	95
BAB V PEMBAHASAN UMUM.....	96
BAB VI KESIMPULAN UMUM	101
DAFTAR PUSTAKA	102
LAMPIRAN	119

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
Tabel 1. Hirarki taksonomi bakteri penyebab penyakit HLB	6
Tabel 2. Rincian lokasi pengambilan sampel daun jeruk di Sulawesi Selatan	15
Tabel 3. Komponen bahan untuk reaksi PCR	17
Tabel 4. Primer yang digunakan dalam analisis RAPD	18
Tabel 5. Analisis fenotip karakter kualitatif dan kuantitatif 13 varietas jeruk....	26
Tabel 6. Karakter anatomi stomata daun jeruk dari 13 varietas jeruk.....	31
Tabel 7. Konsentrasi DNA hasil isolasi	32
Tabel 8. Primer RAPD dan produk amplifikasi DNA varietas jeruk.....	33
Tabel 9. Hasil analisis RAPD	35
Tabel 10. Hasil pengukuran nilai heterozigositas.....	37
Tabel 11. Pengelompokan 175 genotip varietas jeruk	39
Tabel 12. Tingkat keparahan penyakit CVPD	52
Tabel 13. Tabel skor (nilai numerik) tingkat keparahan jeruk terinfeksi CVPD	52
Tabel 14. Rataan persentase dan intensitas tanaman jeruk terserang CVPD	62
Tabel 15. Hasil analisis unsur hara pada tanah di lima sentra pertanaman ...	63
Tabel 16. Rancangan penelitian.....	78
Tabel 17. Hasil uji normalitas pada pengaruh hormon BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk keprok selayer.....	80
Tabel 18. Hasil uji homogenitas pada pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk keprok selayer.....	81
Tabel 19. Hasil uji <i>Kruskal-Wallis</i> pada pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk keprok selayer.....	81
Tabel 20. Hasil uji <i>Mann-Whitney</i> pada parameter jumlah tunas dan jumlah daun jeruk keprok selayer	82
Tabel 21. Hasil uji normalitas pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk pameo pangkep merah	84
Tabel 22. Hasil uji homogenitas pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk pangkep merah	84
Tabel 23. Hasil uji <i>Kruskal-Wallis</i> pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk pangkep merah	85
Tabel 24. Hasil uji <i>Mann-Whitney</i> pada parameter jumlah tunas dan jumlah akar jeruk pameo pangkep merah.....	85
Tabel 25. Hasil uji normalitas pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk pameo pangkep putih	87
Tabel 26. Hasil uji homogenitas pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk pameo pangkep putih.....	87
Tabel 27. Hasil uji <i>Kruskal-Wallis</i> pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk pameo pangkep putih.....	88
Tabel 28. Hasil uji normalitas pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk pameo pangkep golla-golla.....	89
Tabel 29. Hasil uji homogenitas pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk pameo pangkep golla-golla	89
Tabel 30. Hasil uji <i>Kruskal-Wallis</i> pengaruh BAP terhadap jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar jeruk pameo pangkep golla-golla	90
Tabel 31. Hasil uji <i>Mann-Whitney</i> terhadap jumlah daun pameo golla-golla ..	90

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
Gambar 1. Penampang melintang pembuluh floem yang diinfeksi secara eksperimental dengan <i>CLas</i>	5
Gambar 2. Gejala defisiensi nutrisi dan penyakit lain	7
Gambar 3. Diagram kerangka pikir penelitian.....	11
Gambar 4. Variasi fenotip pohon dari 13 varietas tanaman jeruk.....	21
Gambar 5. Variasi fenotip daun dari 13 varietas tanaman jeruk.....	24
Gambar 6. Dendogram yang dihasilkan melalui analisis klistor fenotip.....	25
Gambar 7. Dendogram yang dihasilkan melalui analisis klistor anatomi.....	28
Gambar 8. Analisis karakter anatomi dari 13 varietas jeruk	29
Gambar 9. Elektroforegram DNA tanaman jeruk hasil isolasi.....	32
Gambar 10. Elektroforegram hasil amplifikasi seleksi primer	34
Gambar 11. Pola pita RAPD pada 175 sampel jeruk dengan primer OPA-15	36
Gambar 12. Dendogram yang dihasilkan dari analisis klistor UPGMA.....	38
Gambar 13. Hasil analisis koordinat utama PCoA	40
Gambar 14. Lokasi pengambilan sampel daun tanaman jeruk.....	52
Gambar 15. Morfologi <i>Diaphorina citri</i>	53
Gambar 16. Gejala CVPD pada daun jeruk keprok di Kab. Selayar.....	56
Gambar 17. Gejala CVPD pada daun jeruk pamelo di Kab. Pangkep.....	57
Gambar 18. Gejala CVPD pada daun jeruk keprok batu 55 di Kab. Bantaeng.....	58
Gambar 19. Gejala CVPD pada daun jeruk siam, santang madu dan dekopon di Kab. Luwu Utara	60
Gambar 20. Gejala CVPD pada daun jeruk nipis dan jeruk purut di Kab. Sidrap.....	61
Gambar 21. DNA total daun jeruk bergejala	64
Gambar 22. Visualisasi DNA hasil deteksi penyakit CVPD	65
Gambar 23. Perbandingan jumlah tunas jeruk keprok selayar	83
Gambar 24. Perbandingan jumlah daun jeruk keprok selayar	83
Gambar 25. Perbandingan jumlah daun jeruk pamelo pangkep merah	86
Gambar 26. Perbandingan jumlah akar pamelo pangkep merah	86
Gambar 27. Perbandingan jumlah daun jeruk pamelo pangkep golla-golla	91
Gambar 28. Strategi manajemen penyakit HLB yang melibatkan tiga komponen.....	99
Gambar 29. Kerangka upaya preventif untuk mewujudkan jeruk bebas patogen.....	100

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
Lampiran 1. Output Penelitian 1	119
Lampiran 2. Output Penelitian 2	120
Lampiran 3. Output Penelitian 3	121
Lampiran 4. Output Penelitian 4	122
Lampiran 5. Output Penelitian 5	123
Lampiran 6. Output Penelitian 6	124
Lampiran 7. Output Penelitian 7	125

BAB I PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Indonesia salah satu negara tropis dan merupakan *global megadiverse countries* terdiri dari 17,000 pulau dengan berbagai jenis habitat dan sejarah geologi yang sangat kompleks (Arifin dan Nakagoshi, 2011; Rintelen et al., 2017). Jeruk adalah salah satu tanaman buah dunia yang memiliki nilai ekonomi tinggi (El-Mouei et al., 2011; Tolangara et al., 2020) karena kandungan nutrisi yang dapat memenuhi kebutuhan vitamin dan mineral bagi masyarakat yang sejalan dengan pola hidup sehat (*back to nature*), sehingga konsumsi buah jeruk mengalami peningkatan seiring dengan pertambahan jumlah penduduk yang terus meningkat dari tahun ke tahun (Budiyati, dkk., 2016; Keputusan menteri Pertanian RI, 2019). Hal ini didukung oleh data Badan Pusat Statistik (2021), bahwa produksi buah jeruk di Indonesia mengalami peningkatan setiap tahunnya. Tercatat produksi buah jeruk pada tahun 2018 sebesar 2,510,442 ton, pada tahun 2019 meningkat menjadi 2,563,490 ton dan pada tahun 2020 kembali meningkat menjadi 2,722,952 ton.

Tanaman jeruk dapat dibudidayakan di daerah tropis sampai subtropis (Al-Janabi ASA, 2016; Ahmed et al., 2017; Liu C et al., 2020). Indonesia memiliki spesies dan varietas lokal jeruk unggul nasional yang tersebar di seluruh nusantara dari Sabang sampai Merauke. Indonesia memiliki potensi yang tinggi dalam keragaman genetik tanaman jeruk, diantaranya jeruk siam, jeruk keprok, jeruk pamelon, dan jeruk nipis. Sentra produksi jeruk relatif tersebar di seluruh Indonesia, beberapa sentra lokasi penghasil jeruk meliputi Garut (Jawa Barat), Tawangmangu (Jawa Tengah), Batu (Jawa Timur), Tejakula (Bali), Selayar (Sulawesi Selatan), Pontianak (Kalimantan Barat) dan Medan (Sumatera Utara). Kementerian Pertanian menerbitkan keputusan tentang Lokasi Kawasan Pertanian Nasional yang menetapkan kawasan pengembangan jeruk siam nasional di 22 Provinsi, yang didetailkan lagi 110 Kabupaten dan dibagi berdasarkan kawasan prioritas dimana Sulawesi Selatan termasuk didalamnya.

Sentra pengembangan jeruk di Sulawesi Selatan adalah Kabupaten Bantaeng, Selayar, Bulukumba, Pangkep, dan Wajo (Halid, 2016). Jeruk memiliki keragaman yang tinggi dalam genus, spesies, varietas dan klon. Namun saat ini, secara umum klasifikasi jeruk dunia masih berdasarkan sistem klasifikasi menurut Swingle dan Tanaka bahwa pada genus *Citrus* terdapat 16 spesies (Zech-Matterne dan Fiorentino, 2018) dan 7 diantaranya telah banyak dibudidayakan di Indonesia dan menjadi jeruk komersial (Martasari, 2017). Beberapa penelitian dengan penanda molekuler menunjukkan, bahwa hanya ada tiga spesies jeruk sebenarnya yaitu mandarin (*C. reticulata*), pamelon (*C. maxima*) dan sitrun (*C. medica*) dan spesies lainnya merupakan hasil persilangan dari ketiga kelompok tersebut. Variasi genotipik yang tinggi sangat

penting dikembangkan baik untuk industri maupun *fresh market* yang menjadi salah satu tujuan utama program pemuliaan jeruk (Machado et al., 2011).

Karakterisasi tanaman jeruk perlu dilakukan untuk mengetahui karakter khusus dari tanaman yang dibudidayakan. Karakterisasi tanaman dapat dilakukan secara fenotip maupun genotip. Keragaman merupakan suatu kekayaan dalam plasma nutfah perjerukan nasional. Namun, jika keragaman ini bukanlah perwujudan dari keragaman secara genetik maka dapat menimbulkan kerancuan dalam kegiatan perbenihan jeruk mengingat sumber bibit yang digunakan petani di sentra-sentra pertanaman jeruk nasional saling berkaitan satu sama lain. Langkah yang dapat dilakukan dalam mengelola plasma nutfah buah tropis di Indonesia adalah eksplorasi (inventarisasi dan identifikasi), pengenalan keanekaragaman genetik, pengumpulan pengamatan, dan evaluasi produksi serta pengembangan buah (Rezkianti, dkk., 2016; Adelina, dkk., 2017). Informasi mengenai keragaman sangat diperlukan dalam program pemuliaan tanaman, karena dengan semakin tersedianya informasi tersebut, semakin mudah dalam menentukan kedudukan atau kekerabatan antarvarietas yang dapat dijadikan sebagai dasar seleksi tanaman (Qosim, dkk., 2013). Ragam genotip menjadi penting sebagai informasi genetik, sedangkan ragam fenotip sebagai pembeda secara visual apabila keragaman genotip dan fenotip keduanya berada pada kategori luas (Hetharie, dkk., 2018). Karakterisasi fenotip memiliki keterbatasan yang dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga dapat memberikan hasil yang berbeda-beda bergantung pada tempat tumbuhnya (Suparman, 2012). Karakterisasi fenotip perlu didukung oleh penerapan teknologi biomolekuler untuk mengidentifikasi dan menganalisis keragaman varietas tanaman unggul secara cermat.

Penanda molekuler telah banyak diaplikasikan pada penelitian keragaman genotip jeruk (Ciampi et al., 2013; Munankarmi et al., 2014; Srilekha dan Sankar, 2018), hubungan filogenetik diantara spesies, varietas, dan kultivar (Al-Janabi et al., 2016; El-Khayat dan Asee, 2020). Penanda molekuler *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD) digunakan secara luas termasuk pada karakterisasi DNA tumbuhan karena memiliki keuntungan dengan prosedur sederhana, harga relatif murah dan sangat sedikit jumlah DNA yang dibutuhkan untuk analisis (Bidisha et al., 2013). Analisis RAPD menjadi alat umum yang digunakan untuk mengevaluasi variasi genetik dalam populasi tanaman jeruk. Populasi dengan keragaman genetik rendah memberikan dampak yang signifikan pada produktivitas dan kualitas jeruk karena memiliki kerentanan terhadap infeksi penyakit (Wirawan, dkk., 2014), sehingga sangat penting untuk dilakukan survei dan indeks penyakit pada tanaman jeruk. Indeksing dilakukan terhadap penyakit tular vektor dan penyakit sistemik non-tular vektor. Penyakit CVPD termasuk penyakit tular vektor yang merupakan penyakit penting dan penyebab utama kehilangan hasil pada tanaman jeruk di hampir semua negara terutama Asia dan Afrika. Salah satu metode deteksi yang dapat diterapkan adalah *Polymerase Chain*

Reaction (PCR). PCR diklaim sebagai metode spesifik yang cepat dalam mendeteksi dan mengidentifikasi infeksi CVPD pada tanaman jeruk (Kim dan Wang, 2009; Fujikawa et al., 2013). Peningkatan produktivitas tanaman jeruk dapat diperoleh melalui penerapan teknik kultur *in vitro* dengan keunggulan perbanyakannya cepat yang menghasilkan tanaman bebas patogen (Chand et al., 2013; Hamza et al., 2013; Mas dan Perez, 2014; Sing et al., 2019). Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini dilaksanakan untuk menentukan keragaman jeruk lokal (*Citrus* spp.) Sulawesi Selatan, mendeteksi keberadaan CVPD di sentra pertanaman jeruk Sulawesi Selatan serta potensi pengembangannya melalui penerapan teknik kultur *in vitro*.

1.2 Review of Evidence/ Gap of Knowledge

1.2.1 Keragaman Jeruk di Sulawesi Selatan

Variasi jeruk sangat beragam dalam hal bentuk buah, kualitas, tipe embrio, *inflorescence*, habitat dan pertumbuhan, serta adaptabilitas (kemampuan beradaptasi) (Omura dan Shimada, 2016). Jenis jeruk yang pengembangannya hampir ada di setiap Provinsi di Indonesia seperti jeruk siam, jeruk keprok, jeruk pamelon, jeruk manis, jeruk nipis, jeruk lemon, dan jeruk purut (Balitjestro, 2020). Sentra pengembangan Jeruk di Sulawesi Selatan terdapat di Kabupaten Bantaeng, Selayar, Bulukumba, Pangkep, dan Wajo (Halid, 2016). Jenis jeruk yang ditanam adalah jeruk keprok (Selayar), jeruk siam (Malangke, Luwu Utara) dan jeruk pamelon (Pangkep).

Jeruk keprok selayar merupakan komoditas hortikultura unggulan dan komoditas primadona bagi petani setempat (Ramadhana, dkk., 2018), dinamakan jeruk selayar karena memang pertama kali dikembangkan oleh para petani di Kepulauan Selayar (Balitjestro, 2019). Jeruk keprok selayar merupakan salah satu varietas unggul asal Sulawesi Selatan dan merupakan jeruk keprok *Citrus reticulata* L. pertama yang didaftarkan sebagai varietas unggul di Indonesia dan telah dilepas pada tahun 1994. Pertanaman jeruk tersebar di daratan Pulau Selayar terutama di Kecamatan Bontoharu, Bontomatene dan Bontosikuyu.

Jeruk pamelon *Citrus maxima* (Burm.) Merr. termasuk jenis buah-buahan komersial yang populer dan digemari konsumen, mempunyai nilai ekonomi yang tinggi di pasar nasional dan internasional (Susanto, dkk., 2013; Taufik, dkk., 2015). Indonesia diperhitungkan sebagai produsen sekaligus pasar potensial utama jeruk di Asia (Balitjestro, 2010). Salah satu daerah pengembangan jeruk pamelon di Indonesia adalah Sulawesi Selatan khususnya di Kabupaten Pangkep. Jeruk pamelon, jeruk besar, atau yang lebih dikenal dengan sebutan dalam bahasa Inggris: pomelo, latin: *Citrus maxima* (Burm.) Merr. merupakan jeruk penghasil buah terbesar. Nama "pamelon" sekarang disarankan oleh Departemen Pertanian karena jeruk ini tidak ada kaitannya dengan Bali. Jeruk pamelon dikenal sebagai spesies yang memiliki variabilitas fenotip tinggi terutama pada organ buah yang meliputi bentuk, ukuran, ketebalan kulit buah, warna, dan rasa buah (Susandarini, 2014).

Jeruk pamelو potensial dikembangkan karena karakteristiknya yang khas yaitu berukuran besar, memiliki rasa segar, dan daya simpan yang lama sampai empat bulan (Marhawati, 2019). Petani jeruk di Kabupaten Pangkep membagi tiga jenis buah jeruk pamelو yakni jeruk merah, jeruk putih dan jeruk gula-gula. Plasma nutfah pamelو sangat beragam di Indonesia dengan nama daerah berbeda-beda (Hermansyah dan Susanto, 2018). Kini jeruk pamelو telah dibudidayakan secara turun temurun, sehingga tidak sedikit masyarakat setempat yang menjadikannya sebagai mata pencaharian (Marhawati, 2019).

Kabupaten Luwu Utara juga merupakan salah satu penghasil jeruk di Provinsi Sulawesi Selatan yaitu jeruk siam *Citrus nobilis* L. (Dinas Tanaman Pangan Hortikultura dan Perkebunan Kabupaten Luwu Utara, 2019). Jeruk siam bukan tanaman asli daerah Luwu Utara, tetapi merupakan tanaman introduksi dari Palembang pada tahun 1980-an. Pada akhir tahun 1990-an, jeruk siam malangke dinyatakan masih bebas *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD), tetapi sejak tahun 1999 petani sudah menemukan gejala penguningan yang diduga gejala CVPD, sehingga disadari keberadaannya setelah tanaman sudah mulai mati. Petani mengetahui nama CVPD dari penyuluh dan staf dinas pertanian setempat. Penyakit ini diduga terkait dengan masuknya bibit asal Jawa Timur dan Jawa Tengah yang merupakan daerah endemis penyakit CVPD (Asaad, dkk., 2005).

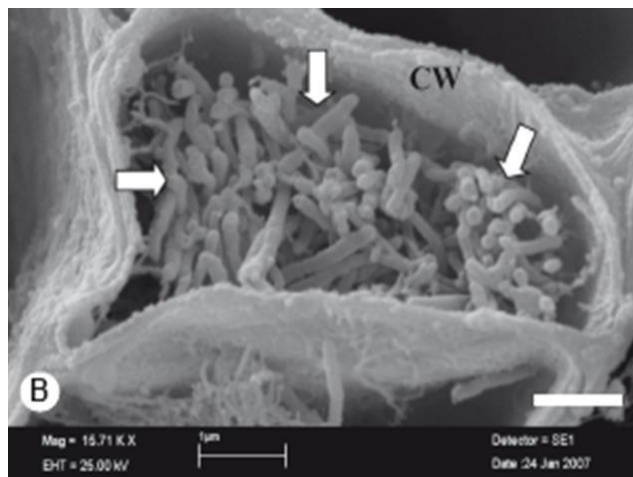
Penelitian mengenai keragaman jeruk di Indonesia telah dilakukan berdasarkan karakter fenotip dan genotip, diantaranya jeruk dari Jawa Timur, Jawa Tengah, Maluku Utara, Maluku Tenggara, dan Kalimantan Timur (Budiyati, dkk., 2016; Kusumaningrum, dkk., 2018), jeruk siam dari Pontianak, Medan, Banjar, Kintamani, Ponorogo, Jember dan Mamuju (Martasari, dkk., 2004), jeruk pamelو dari Aceh, Jawa Timur, Jawa Barat, Jawa Tengah, Yogyakarta, Nusa Tenggara Timur dan Sulawesi Selatan (Susanto, dkk., 2011; Rahayu, dkk., 2012; Susandarini, dkk., 2013; Rahayu, dkk., 2017; Susandarini, dkk., 2020), jeruk bali (Mahardika, dkk., 2017), jeruk lemon dari Ternate Maluku Utara (Tolangara, dkk., 2020), beberapa jeruk batang bawah *Japansche citroen* (JC), citrumelo dan kanci (Yulianti, dkk., 2020). Namun, sampai saat ini karakterisasi varietas jeruk khususnya jeruk lokal di Sulawesi Selatan belum dikaji secara spesifik, sehingga dipandang perlu dilakukan penelitian mengenai karakterisasi fenotip, anatomi dan genotip jeruk di Sulawesi Selatan.

1.2.2 Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD)

Salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas buah jeruk adalah infeksi penyakit, sehingga perlu dimonitor dan diperiksa secara periodik kelayakannya sebagai bahan tanaman yang akan digunakan. Pemeriksaan tersebut dinamakan indeksing untuk mengetahui keberadaan patogen penyebab penyakit. Indeksing dilakukan terhadap penyakit tular vektor yang meliputi *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD), *Citrus Tristeza Virus* (CTV), *Citrus Vein Enation Virus* (CVEV) serta penyakit sistemik non-tular

vektor yang meliputi *Citrus Exocortis Viroid* (CEV) dan *Citrus Psorosis Virus* (CPsV) (Keputusan Menteri Pertanian, 2019).

Penyakit CVPD merupakan penyakit utama pada tanaman jeruk di Indonesia (Yuniti, dkk., 2020) dan pertama kali terdeteksi di Asia dan Afrika yang disusul selanjutnya di Amerika (Angel et al., 2014). CVPD dikenal dengan nama *citrus greening*, *yellow shoot*, *leaf mottle* (Filipina), *likubin* atau *decline* (Taiwan), *citrus dieback* (India), *blotchy-mottle* atau *mottling disease* (Afrika); dengan nama internasional *huanglongbing* (China) (Zubaidah, 2010). Penyakit ini disebabkan oleh bakteri gram negatif α -proteobacteria genus *Candidatus Liberibacter* yang berada pada jaringan floem tanaman jeruk (De Graca, 1991; Mora, 2012; Tsai dan Liu, 2000), mengikuti aliran pada pembuluh floem (Lin et al., 2008) (Gambar 1) dan penyebarannya melalui perbanyakan vegetatif dan vektor serangga yang menjadi alasan mengapa teknik pengendalian masih sangat terbatas (Manjunath et al., 2008).



Gambar 1. Penampang melintang pembuluh floem yang diinfeksi secara eksperimental oleh *Candidatus Liberibacter americanus*. Tanda panah menunjukkan bakteri (Tanaka et al., 2007).

Menurut Bove (2006), terdapat tiga varian *Candidatus Liberibacter* spp. yang telah dilaporkan yaitu (1) *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), yang tersebar luas pada perkebunan jeruk di Asia, Brazil, Florida, Meksiko dan Karibia; (2) *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf), spesies yang terdaftar pada beberapa daerah pertanaman jeruk di Afrika; dan (3) *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam), terdeteksi di Brazil dan Asia. Tabel 1 menunjukkan taksonomi penyebab CVPD menurut Mora (2012).

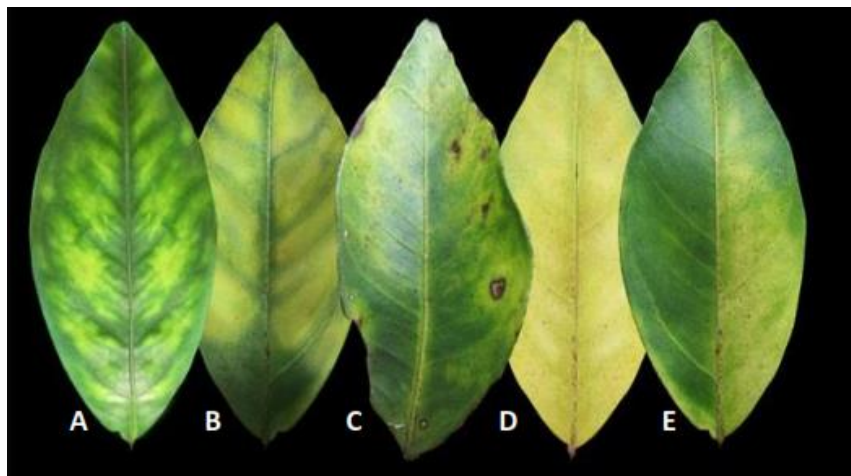
Tabel 1. Hirarki taksonomi bakteri penyebab penyakit CVPD

Kingdom	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Alphaproteobacteria
Ordo	Rhizobiales
Family	Rhizobiaceae
Genus	Candidatus <i>Liberibacter</i>
Species	Candidatus <i>Liberibacter africanus</i>
	Candidatus <i>Liberibacter asiaticus</i>
	Candidatus <i>Liberibacter americanus</i>

Strain *CLas* dan *CLam* dapat ditularkan dari tanaman sakit ke tanaman sehat melalui serangga *Diaphorina citri* Kuwayama dan dikategorikan *heat tolerance*, sedangkan *CLaf* yang ditularkan oleh *Trioza erythrae* Del Guercio dikategorikan *heat sensitive*. *CLas*, *CLam*, dan *D. citri* secara geografis tersebar hampir di seluruh pertanaman jeruk di dunia, sementara *CLaf* dan *T. erythrae* terbatas hanya di dataran tinggi Afrika Selatan. Penyakit CVPD juga dapat menular melalui bahan perbanyakan vegetatif (mata tempel). Penyebaran CVPD secara geografis disebabkan oleh transportasi bibit sakit, sedangkan penyebaran CVPD antartanaman dalam kebun disebabkan oleh vektor (Nurhadi, 2005).

Gejala CVPD bervariasi tergantung varietas, spesies, dan umur tanaman yang terinfeksi dan terlihat jelas pada pohon muda. Pohon yang terinfeksi pada tahap perkembangan gejala kurang terlihat (Hu dan Wright, 2019). Secara umum, gejala pada daun biasanya menguning dari satu cabang, dimulai sepanjang vena, belang-belang asimetris pada daun, daun kecil dan tegak. Menurut Hu dan Wright (2019), bahwa gejala CVPD seringkali dikecohkan dengan gejala kerusakan hama bahkan defisiensi nutrisi, seperti yang disebabkan oleh:

1. Defisiensi seng (Zn), ditandai dengan pola garis-garis pada daun cukup simetris dan sangat mencolok.
2. Defisiensi magnesium (Mg), yang ditandai dengan warna kekuningan yang khas seperti huruf V terbalik.
3. *Citrus Variegated Chlorosis Virus*, yang ditandai dengan munculnya bintik-bintik nekrotik.
4. Penyakit gumosis, dalam hal ini diagnosis sangat sulit.



Gambar 2. Gejala defisiensi nutrisi dan penyakit lain. A) Defisiensi seng (Zn); B) Defisiensi magnesium (Mg); C) CVC; D) Gumosis; E) CVPD (Hu dan Wright, 2019).

Gejala kekurangan nutrisi seringkali menyulitkan diagnosis gejala CVPD. Namun, gejala CVPD menunjukkan gejala karakteristik dengan bintik asimetris pada daun, berbeda dengan defisiensi nutrisi yang akan selalu menunjukkan gejala dengan bintik simetris (Bove, 2006). Deteksi penyakit CVPD dapat dilakukan melalui beberapa cara diantaranya melalui pengamatan secara visual, uji kimiawi, penyambungan dan penempelan, serta secara molekuler (Adiartayasa, dkk., 2015). Deteksi secara visual mudah dilakukan tetapi biasanya gejala penyakit baru tampak setelah patogen berkembang lanjut dan gejala tidak spesifik karena mirip dengan penyakit defisiensi seng (Zn) atau magnesium (Mn) (Tirtawidjaya, 1983). Deteksi melalui uji biokimia melalui akumulasi pati dengan penambahan yodium pada jaringan floem tetapi gejalanya tidak spesifik karena semua jaringan tanaman berada dalam kondisi abnormal juga dapat menunjukkan akumulasi zat pati seperti gejala CVPD (Tirtawidjaya, 1983; Mutia, dkk., 1992). Deteksi melalui penyambungan dan penempelan membutuhkan waktu yang cukup lama yaitu antara 4 sampai 7 bulan (Marlina, 1998). Metode deteksi secara molekuler dengan teknik PCR dapat memberikan hasil yang cepat dengan tingkat akurasi tinggi dan sangat sensitif karena dapat mendeteksi populasi bakteri yang sangat rendah (Jagoeux et al., 1996). Penggunaan PCR untuk mendeteksi bakteri *Candidatus Liberibacter* pada pertanaman jeruk dilakukan oleh sejumlah peneliti di Indonesia sejak tahun 2001 sampai saat ini di beberapa lokasi sentra pertanaman jeruk. Tahun 2001-2004, Assad, dkk., (2005) melakukan deteksi CVPD pada pertanaman jeruk bergejala di Malaysia dan Indonesia (Sulawesi Selatan), Bali Utara (Dwiastuti, dkk., 2003);

Tulungagung (Zubaidah, dkk., 2006); Sulawesi Tenggara (Taufik, dkk., 2010); Sumatera Utara (Nurwahyuni, dkk., 2015); Bogor dan Bekasi (Rustiani, dkk., 2015); Bali (Meitayani, dkk., 2014; Nurhayati, dkk., 2016 dan Sitorus, dkk., 2016; Wirawan, dkk., 2017; Wijaya, dkk., 2018; Wirawan, dkk., 2019); Singkawang, Pontianak, Kalimantan Barat (Rahmawati, dkk., 2020); dan Sumatera Barat (Puspitasari, dkk., 2020). Gejala klorosis yang bervariasi polanya dari klorosis ringan sampai berat pada pertanaman jeruk menarik untuk diketahui keberadaannya karena belum diketahui apakah semua daun bergejala klorosis positif mengandung bakteri *Candidatus Liberibacter*, sehingga pada penelitian ini dilakukan deteksi keberadaan bakteri tersebut pada daun jeruk yang menunjukkan berbagai pola klorosis.

1.2.3 Aplikasi Kultur *In Vitro* Untuk Menghasilkan Tanaman Bebas Patogen

Perbanyakan jeruk pada umumnya dilakukan oleh petani dengan cara konvensional melalui biji, stek, okulasi dan *grafting*. Kendala yang dihadapi dari perbanyakan konvensional ini adalah terbatasnya bahan baku dan kekhawatiran rusaknya tanaman induk apabila dilakukan stek terus menerus. Pengadaan bibit secara okulasi dan *grafting* paling diminati karena merupakan perpaduan dua sifat unggul tetuanya. Batang bawah bibit okulasi tidak berasal dari sembarang jenis jeruk. Selain itu, keadaan batang atasnya pun juga harus diperhatikan. Mata tempel yang digunakan dalam okulasi harus dalam keadaan segar, tetapi di lapangan sering terjadi penundaan bahan entres yang sudah diambil. Entres tidak segera diokulasikan karena terhambat waktu dan jarak dengan lokasi pembibitan. Batang bawah yang umum digunakan adalah *Japansche Citroen* (JC) (Jenks et al., 2007; Eed et al., 2011; Jayanti et al., 2015).

Upaya yang dilakukan untuk mengatasi kelemahan dari perbanyakan konvensional adalah melalui perbanyakan kultur *in vitro* yang diharapkan dapat memenuhi kebutuhan bibit berkualitas secara kontinu dengan jumlah banyak dalam waktu singkat. Kultur *in vitro* adalah teknik menumbuhkan dan memperbanyak sel, jaringan serta organ pada media pertumbuhan secara aseptis dalam lingkungan yang terkontrol secara *in vitro* (Sen et al., 2013). Setiap sel tumbuhan memiliki kemampuan untuk mengatur proses fisiologisnya sendiri dan bersifat totipotensi. Perbanyakan melalui cara ini, baik yang dilakukan melalui perbanyakan embrio (embriogenesis) maupun multiplikasi organ (organogenesis) memberikan kelebihan dibandingkan cara konvensional. Keuntungan perbanyakan kultur *in vitro* melalui organogenesis atau induksi langsung adalah waktu perbanyakan lebih cepat, jumlah bibit yang dihasilkan tidak terbatas jumlahnya, jumlah eksplan yang digunakan kecil (tunas terminal/ aksilar), tidak merusak pohon induk, mendapatkan tanaman yang bebas patogen, virus, hama dan penyakit, tidak memerlukan lahan yang luas untuk menghasilkan tanaman dalam jumlah banyak, genotip sama dengan induk, pengaturan faktor-faktor lingkungan dapat dikontrol (*in vitro*)

serta dapat dilakukan sepanjang tahun tanpa tergantung iklim (Surachman, 2011; Rasud et al., 2015).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) pada media kultur *in vitro* sangat penting untuk memacu pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Jenis ZPT yang digunakan dalam kultur *in vitro* tergantung pada tujuan penelitian yang akan dilakukan. Pada induksi tunas, ZPT yang digunakan adalah golongan sitokinin. Sitokinin mempengaruhi proses fisiologis pada tumbuhan terutama untuk memacu pembelahan sel. Jenis sitokinin yang umumnya digunakan dalam kultur *in vitro* adalah *Benzylaminopourine* (BAP). BAP merupakan golongan sitokinin aktif yang mempengaruhi poliferasi tunas lebih dari satu jika diberikan pada tunas pucuk. BAP dan kinetin memiliki struktur yang sama namun penggunaan BAP lebih efektif karena memiliki gugus benzil. Pada beberapa penelitian, BAP yang digunakan untuk induksi tunas secara *in vitro* maupun induksi kalus dapat menghasilkan respon yang baik pada tanaman. BAP dapat memacu peningkatan produksi klorofil, sehingga laju fotosintesis lebih aktif yang kemudian membentuk senyawa organik seperti karbohidrat yang dapat berpengaruh pada proses pembentukan daun (Eroil et al., 2019; Quora et al., 2019; Yulian et al., 2021).

Penggunaan BAP dalam menginduksi tunas pada tanaman jeruk telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya. Harliana et al. (2012) menyatakan penggunaan BAP pada konsentrasi 1 ppm mampu menghasilkan jumlah daun terbanyak pada tanaman jeruk keprok. Pada tahun 2015, Rasud et al. melaporkan pemberian BAP konsentrasi 1.0 ppm pada media MS diperoleh waktu muncul tunas, jumlah tunas dan jumlah daun paling banyak hingga 6 minggu setelah tanam yaitu masing-masing 3.40 Hari Setelah Tanam (HST), 2.12 tunas per eksplan dan 5.00 helai daun per eksplan. Perlakuan 1 mg/L BAP menghasilkan jumlah tunas yang paling banyak yaitu 2.50. Pertumbuhan kalus yang paling banyak adalah pada perlakuan 5 mg/L BAP dengan tekstur kalus kompak berwarna putih (Leonardo et al., 2018; Forius et al., 2020; Yanti dan Mayta, 2021).

Perbanyakan melalui teknik kultur *in vitro* menggunakan eksplan biji memiliki keunggulan dalam hal variabilitas genetik tinggi karena biji terbentuk melalui persilangan sehingga memungkinkan untuk mendapatkan tanaman dengan kombinasi genetik dan meningkatkan peluang untuk mendapatkan varietas unggul. Biji merupakan bagian tanaman yang masih juvenil, materi genetiknya masih stabil untuk diperbanyak dan bebas mikroba (Yuliani et al., 2019). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan perbanyakan melalui kultur *in vitro* menggunakan eksplan biji pada jeruk lokal unggulan Sulawesi Selatan untuk menunjang ketersediaan bibit bebas patogen sehingga meningkatkan produktivitas dan mutu dari jeruk yang dibudidayakan petani.

1.3 Rumusan Masalah dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Rumusan Masalah

Pemetaan plasma nutfah jeruk memerlukan informasi terkait keragaman karena dengan semakin tersedianya informasi tersebut, semakin mudah dalam menentukan kedudukan atau kekerabatan antarvarietas yang dapat dijadikan sebagai dasar seleksi tanaman. Oleh karena itu, diperlukan kegiatan karakterisasi baik fenotip, anatomi dan genotip. Di samping itu, kajian tentang karakteristik tanaman bebas penyakit dan metode perbanyakan melalui kultur *in vitro* sangat diperlukan dalam upaya peningkatan produktivitas buah jeruk. Oleh sebab itu, penelitian ini dirancang untuk menjawab permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimanakah tingkat keragaman fenotip, anatomi dan genotip tanaman jeruk di Sulawesi Selatan?
2. Apakah terdapat bakteri *Liberibacter asiaticus* pada pertanaman jeruk di Sulawesi Selatan?
3. Bagaimanakah konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP yang tepat dalam mendukung pertumbuhan varietas jeruk secara *in vitro*?

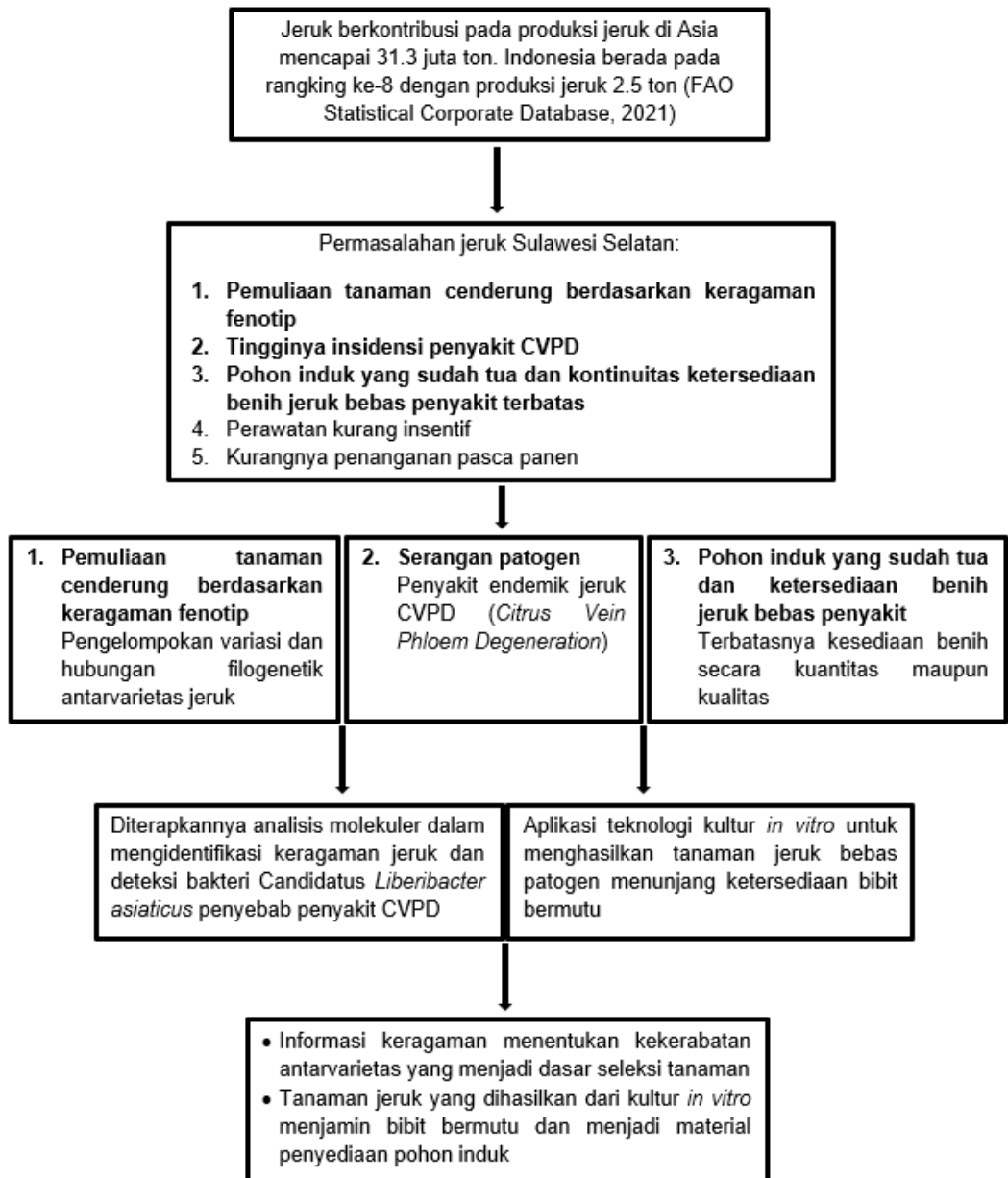
1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menentukan keragaman jeruk lokal yang terdapat di Sulawesi Selatan berdasarkan karakter fenotip, anatomi dan genotip melalui analisis molekuler RAPD.
2. Mendeteksi keberadaan bakteri *Liberibacter asiaticus* melalui PCR pada sentra pertanaman jeruk di Sulawesi Selatan.
3. Menentukan konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP yang tepat terhadap pertumbuhan *in vitro* jeruk lokal Sulawesi Selatan mendukung pengembangan pembibitan bebas patogen.

1.4 Kerangka Penelitian

Jeruk merupakan komoditi tanaman hortikultura yang memiliki prospek yang baik dan termasuk tanaman unggulan nasional, sehingga memerlukan peningkatan baik kuantitas, kualitas maupun kontinuitas. Langkah yang dapat dilakukan dalam mengelola plasma nutfah buah tropis di Indonesia dalam upaya mendapatkan varietas unggul adalah eksplorasi dan identifikasi di lapangan khususnya tanaman jeruk yang memiliki keunggulan spesifik, semakin beragam plasma nutfah maka akan semakin banyak sumber-sumber genetik untuk pemuliaan tanaman. Kegiatan identifikasi tanaman dapat dilakukan melalui identifikasi berdasarkan karakter fenotip, anatomi dan genotip melalui pola pita DNA. Karakter tanaman bebas penyakit juga diperlukan pada kegiatan perbanyakan tanaman, sehingga perlu dilakukan deteksi molekuler keberadaan bakteri *Liberibacter asiaticus* penyebab penyakit CVPD. Peningkatan produktivitas tanaman jeruk dapat diperoleh melalui kultur *in vitro* dengan keunggulan perbanyakan cepat dan menghasilkan tanaman bebas patogen menunjang ketersediaan bibit bermutu.



Gambar 3. Diagram kerangka pikir penelitian.

BAB II

ANALISIS KERAGAMAN JERUK LOKAL SULAWESI SELATAN BERDASARKAN KARAKTER FENOTIP, ANATOMI DAN GENOTIP MELALUI MARKAH *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)

2.1 Abstrak

Jeruk merupakan tanaman buah yang penting secara ekonomi dan paling banyak dibudidayakan di seluruh dunia dengan pasar global yang besar. Sulawesi Selatan adalah salah satu daerah penghasil jeruk yang cukup potensial dengan banyak varietas yang ditanam secara luas untuk ekspor maupun penggunaan domestik. Informasi mengenai keragaman dan hubungan kekerabatan sangat penting digunakan dalam pemuliaan tanaman dan konservasi plasma nutfah. Oleh karena pentingnya hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman fenotip, anatomi, dan genotip 13 varietas jeruk di lima sentra pertanaman Sulawesi Selatan menggunakan primer hasil seleksi sebanyak 19 primer RAPD. Hasil analisis keragaman menunjukkan keragaman fenotip pada karakter bentuk pohon dan daun (bentuk daun, ujung daun, pangkal daun, tepi daun, sayap pada tangkai daun, panjang, lebar, tebal, dan panjang tangkai daun). Keragaman juga dihasilkan melalui karakterisasi anatomi pada ukuran dan indeks stomata. Analisis keragaman genetik (H_e) jeruk di Sulawesi Selatan tergolong sedang (0.236). Berdasarkan analisis klaster pada koefisien kemiripan 77% membagi 175 genotip jeruk menjadi 5 kelompok. Genotip berkerabat paling dekat adalah genotip SB6 dan SB7 dengan koefisien kemiripan 100% diikuti genotip JS8 dan JS9, serta JS13 dan JS17, dengan nilai kemiripan genetik masing-masing >99%. Genotip P9 dan SI5 memiliki nilai kekerabatan paling jauh dengan nilai kemiripan sebesar 57%. Hasil karakterisasi dapat menjadi dasar pertimbangan memilih sifat tanaman yang dikehendaki dalam memperbaiki sifat-sifat tanaman melalui kegiatan pemuliaan tanaman baik persilangan konvensional maupun rekayasa genetika.

Kata kunci: analisis stomata, karakter fenotip, varietas jeruk Sulawesi Selatan, markah molekuler

-
- Telah dipresentasikan pada seminar internasional The 2nd Biennial Conference of Tropical
 - Biodiversity (Makassar, 4-5 Agustus 2021)
 - *Published* pada IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 886 (2021)
 - *Published* pada *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, Vol. 12 No. 6, Tahun 2022, pp. 2499-2506.
 - *Published* pada *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Vol. 26 No. 6, Tahun 2023, pp. 321-333.
 - *Published* pada *Scientifica Journal*, Vol. 2023, Tahun 2023, pp. 1-12.

2.2 Pendahuluan

Jeruk merupakan salah satu jenis buah dunia yang paling populer dan terpenting dalam hal produksi global (FAO, 2014). Jeruk memiliki potensi untuk dikembangkan dan dimanfaatkan dalam mendukung ketahanan pangan terutama dalam memenuhi kebutuhan nutrisi yang penting terhadap kesehatan seiring dengan peningkatan populasi dari tahun ke tahun. Jeruk merupakan sumber vitamin C dan mineral (Budiyati dan Nirmala, 2016), senyawa fenolik, flavonoid, asam folat, potasium, pektin, dan sifat antioksidan yang baik (Abirami et al., 2014; Gosslau et al., 2014; Rafiq et al., 2016; Samraj dan Rajamurgugan, 2017).

Keragaman jeruk ditunjukkan oleh tingginya jumlah unit taksonomi (spesies dan hibrida) (Cottin, 1997). Hibridisasi, mutasi dan keragaman fenotip menyebabkan identifikasi dan klasifikasi jeruk sulit dilakukan (Machado et al., 1996). Hasil eksplorasi jenis-jenis jeruk menunjukkan bahwa Indonesia kaya akan sumber plasma nutfah termasuk Sulawesi Selatan yang merupakan salah satu sentra pengembangan jeruk. Informasi keragaman diperlukan dalam menentukan hubungan genetik, karakterisasi plasma nutfah, program pemuliaan, taksonomi dan pendaftaran varietas baru (Herrero et al., 1996; Al-Janabi, 2016). Kegiatan karakterisasi terhadap keragaman jenis jeruk yang ada saat ini diperlukan sebagai salah satu langkah awal untuk memberikan jaminan terhadap kebenaran kultivar maupun varietas yang digunakan.

Kajian keragaman dapat dilakukan menggunakan ciri fenotip, fisiologi, anatomi, palinologi, sitologi, biokimia, embriologi, dan molekuler (Sharma, 1993). Penggunaan karakter fenotip paling sering digunakan dalam proses identifikasi karena merupakan cara yang mudah dilakukan. Namun, karakter fenotip cenderung tidak stabil karena dipengaruhi oleh lingkungan (Al-Janabi et al., 2016). Karakter fenotip dianggap masih belum cukup untuk mencari kedudukan yang jelas dalam tingkatan takson, sehingga perlu dilengkapi dengan metode lain sebagai komplemen untuk mengevaluasi kekerabatan (Karp et al., 1997; Santos et al., 2003; Campos et al., 2005). Karakteristik anatomi pada daun juga telah banyak digunakan untuk melihat kekerabatan di antara tumbuhan. Menurut Hidayat (1995), daun merupakan organ yang amat beragam, baik dari segi fenotip maupun anatominya.

Saat ini, perkembangan teknologi yang pesat menjadikan kajian keragaman secara molekuler telah banyak dilakukan. Markah molekuler seperti RAPD, ISSR, RFLP, SSR, AFLP telah diaplikasikan pada penelitian karakterisasi plasma nutfah, keragaman genetik, sistematik dan analisis filogenetik (Weising et al., 2005). Markah RAPD banyak digunakan pada kegiatan pemuliaan tanaman termasuk analisis keragaman genetik plasma nutfah jeruk (Al-Janabi et al., 2016; Shahzadi et al., 2016; Sedeek et al., 2017). RAPD memiliki keuntungan dengan prosedur sederhana, harga relatif murah dan sangat sedikit jumlah DNA yang dibutuhkan untuk analisis, menghasilkan DNA yang sangat polimorfik dan mewakili seluruh genom (Shahsavari et al., 2007; Bidisha et al., 2013).

Aplikasi markah RAPD, perlu dilakukan seleksi terhadap primer-primer yang akan digunakan untuk mencari primer acak yang menghasilkan penanda pita, baik dari jelasnya pita yang dihasilkan maupun jumlah lokus yang diperoleh. Primer yang digunakan dari beberapa spesies tumbuhan yang sefamili dengan tumbuhan yang diteliti, karena tidak semua primer nukleotida dapat menghasilkan produk amplifikasi (primer positif) dan dari primer positif tidak semuanya menghasilkan fragmen DNA polimorfik (Siregar, dkk., 2008; Gusmiaty, dkk., 2012). Pemilihan primer pada analisis genetik berpengaruh terhadap pita polimorfik yang dihasilkan karena setiap primer memiliki situs penempelan tersendiri. Pita DNA polimorfik yang dihasilkan setiap primer dapat berbeda, baik dalam ukuran banyaknya pasang basa maupun jumlah pita DNA. Intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer sangat dipengaruhi oleh kemurnian dan konsentrasi cetakan DNA yang mengandung senyawa-senyawa seperti polisakarida dan senyawa fenolik, serta konsentrasi DNA cetakan yang terlalu kecil seringkali menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup atau tidak jelas (Weeden et al., 1992). Penelitian ini dilaksanakan untuk identifikasi dan penilaian variasi fenotip, anatomi dan genotip, sehingga terbangun keterkaitan antara varietas jeruk yang ada di Sulawesi Selatan dengan menggunakan markah molekuler *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD). Penelitian ini penting dilakukan sebagai informasi dasar untuk penelitian lebih lanjut.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif dengan pendekatan eksploratif untuk mengetahui karakter fenotip, anatomi dan genotip serta tingkat kekerabatan varietas jeruk lokal Sulawesi Selatan berdasarkan markah molekuler *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD).

2.3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April - Desember 2021. Pengambilan sampel tanaman jeruk dilakukan di lima sentra pertanaman jeruk di Sulawesi Selatan yaitu jeruk pamelo *Citrus maxima* (Burm.) Merr. di Kabupaten Pangkep, jeruk nipis *Citrus aurantifolia* L. dan jeruk purut *Citrus hystrix* D.C di Kabupaten Sidrap, jeruk keprok batu 55 *Citrus reticulata* Blanco. di Kabupaten Bantaeng, jeruk siam *Citrus nobilis* Lour. dan jeruk santang madu *Citrus reticulata* di Kabupaten Luwu Utara, dan jeruk keprok selayar *Citrus reticulata* L. di Kabupaten Selayar. Analisis fenotip dilakukan di Laboratorium Botani, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Analisis anatomi daun dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Penelitian dan Pengembangan Lingkungan Hidup dan Kehutanan Makassar. Analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit (RS) Pendidikan Universitas Hasanuddin.

2.3.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu *Global Position System (GPS)* model 60 CSx Garmin, haga meter W-Germany, meteran, erlenmeyer, gelas ukur, *tube* eppendorf 2 ml dan 1.5 ml, *tube* PCR 0.3 ml, tabung mikro 2 ml, 1,5 ml dan 0,5 ml, pinset, *ice gel pack*, *micropipet* dan *tip*, mortar dan *pestle*, spatula steril, gunting, sarung tangan karet, *cool box*, nampan, timbangan analitik, sentrifus, *waterbath*, *vortex mixer*, *freezer*, mesin PCR, *microwave*, *freezer -72° C*, *laminar air flow*, mesin elektroforesis, mesin PCR, mikroskop (Nikon 119c Tokyo Japan), oven, *shaker*, autoklaf, *gel documentation*, laptop, dan kamera digital.

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun jeruk yang diambil dari pertanaman jeruk di lima lokasi (Kabupaten Pangkep, Sidrap, Bantaeng, Luwu Utara, dan Kepulauan Selayar), amplop, plastik sampel, kertas label, acetone, kit ekstraksi DNA (Geneaid), etanol 70%, akuades, buffer TE, *RNAse*, ddH₂O, *DNA template*, primer RAPD, larutan mix Kapa Taq Extra Hotstart Ready Mix (Kappa Biosystem, Massachusetts-USA), *agarose*, aquades, buffer TAE, gelred, dan *DNA marker* 50 bp.

2.3.4 Prosedur Penelitian

2.3.4a Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun tanaman jeruk yang diambil dari setiap varietas dengan kondisi biologis tanaman sehat dari setiap kabupaten. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil 5 helai daun muda (3-5 daun teratas di bagian pucuk tanaman) pada masing-masing tanaman, daun diambil dari 10 tanaman untuk setiap varietas tanaman jeruk. Sampel daun kemudian dimasukkan ke dalam *cool box* yang berisi *ice gel* untuk kemudian dilakukan identifikasi fenotip dan disimpan dalam *freezer* sampai proses isolasi dilakukan.

Tabel 2. Rincian lokasi pengumpulan sampel daun jeruk di Sulawesi Selatan

Lokasi Sampel	Varietas	Koordinat Geografis	Ketinggian (m dpl.)
Ma'rang, Pangkep	Pamelo merah (M), pamelo putih (P), pamelo gula-gula (G)	Lat S-4°42' "Long E 119 °34"	32
Pitu Riase, Sidrap	Nipis (N), purut (NN)	Lat S-3.84° Long E 119.81°	205
Bissappu, Bantaeng	jeruk keprok batu 55 (B)	Lat S-5°32' "Long E 119 °51"	265
Malangke Barat, Luwu Utara	Siam (SI), santang madu (SM), dekopon (D)	Lat S-2°50' "Long E 120°19"	17
Bontomatene dan Bontona Saluk, Selayar	selayar biji (SB), selayar-selayar (SS), JC-selayar (JS), <i>Japansche citroen</i> (JC)	Lat S-6°8'1"Long E 120°27"	268.5

2.3.4b Karakterisasi Fenotip

Pengamatan karakter fenotip tanaman jeruk digunakan deskriptor berdasarkan *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI, 1999) dan Tjtrosoepomo (2020). Karakter fenotip yang diukur adalah karakter kualitatif dan kuantitatif. Karakter kualitatif meliputi bentuk pohon, bentuk batang, arah tumbuh batang, percabangan pada batang, arah tumbuh cabang, perlekatan helaian daun (lamina), bentuk daun (circumscription), ujung daun (apex folii), pangkal daun (basis folii), susunan tulang-tulang daun (nervatio/ venation), tepi daun (margo folii), daging daun (intervenium), warna daun, permukaan daun, tata letak daun pada batang (phyllotaxis), sayap pada tangkai daun, lebar sayap pada tangkai daun, dan bentuk sayap tangkai daun. Karakter kuantitatif yaitu rata-rata tinggi pohon, rata-rata diameter batang, panjang daun, lebar daun, tebal daun, dan panjang tangkai daun.

Analisis kemiripan antara varietas jeruk dilakukan dengan mengolah data karakter fenotip dengan software *Numerical Taxonomy and Multyvariate Analysis System* (NTSYS). Hasil kemiripan ini ditampilkan dalam bentuk dendogram.

2.3.4c Karakterisasi Anatomi

Permukaan daun bagian atas dan bawah diolesi dengan acetone pada saat daun masih berada di atas pohon penelitian. Preparat stomata diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 200x, pengamatan karakter anatomi yang diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x untuk pengamatan panjang stomata, lebar stomata, dan tipe stomata. Sampel yang telah diamati kemudian difoto dengan mikroskop dengan perbesaran 400x. Pengamatan karakter anatomi dilakukan terhadap karakter letak stomata, tipe stomata, panjang dan lebar stomata, ukuran stomata, indeks stomata, tipe sel epidermis atas dan bawah, dinding sel epidermis atas dan bawah, bentuk sel penutup stomata, letak dan bentuk trikoma, pembukaan stomata, dan tipe penyebaran stomata. Ukuran stomata (SS) dan Indeks stomata (IS) dihitung berdasarkan rumus Paul et al. (2017) sebagai berikut:

$$SS = L \times B \times K$$

Keterangan:

- L = Panjang
- B = Lebar
- K = Konstanta Franco's (0.79)

$$IS = \frac{S/L}{(S + L)/L} \times 100\%$$

Keterangan:

- S = jumlah stomata
- E = jumlah sel epidermis
- L = satuan luas daun

2.3.4d Karakterisasi genotip

Karakterisasi genotip meliputi (1) Isolasi DNA, (2) Amplifikasi DNA (PCR), (3) Elektroforesis, (4) Visualisasi DNA.

Isolasi DNA

Isolasi DNA tanaman jeruk dilakukan berdasarkan protokol Genomic DNA Kit (Geneaid). Menimbang sampel daun muda (3-5 daun teratas di bagian pucuk tanaman) sebanyak 50-100 mg kemudian ditambahkan 400 µl buffer GP1, divortex lalu diinkubasi di *waterbath* pada suhu 60°C selama 30 menit. Setiap 10 menit, campuran dibolak balik. Sebanyak 100 µl buffer GP2 ditambahkan lalu divortex dan diinkubasi di es selama 10 menit kemudian disentrifus pada 10,000 g selama 5 menit. Meletakkan filter column pada tube 2 ml. Supernatan dipipet dan dipindahkan pada *filter column* lalu disentrifus 1,000 g selama 1 menit lalu *column* dibuang. Supernatan ditambahkan 700 µl buffer GP3 dan segera dibolak-balik. *GD column* diletakkan pada tube 2 ml, semua larutan dipipet ke dalam *GD column* lalu disentrifus selama 2 menit. Pada *GD column* ditambahkan 400 µl W1 buffer kemudian disentrifus 10,000 g selama 1 menit kemudian supernatan dibuang. *GD column* disentrifus selama 3 menit lalu dipindahkan ke tube 1.5 ml ditambah *elution buffer*/ TE 100 µl yang telah dipanaskan tepat pada tengah kolom selama 5 menit dan disentrifus pada 10,000 g selama 1 menit. *GD column* dibuang. Larutan yang diperoleh adalah larutan DNA kemudian ditambahkan 3 µl RNase.

Amplifikasi DNA (PCR) Menggunakan Primer Hasil Seleksi

Sampel DNA dilarutkan dengan ddH₂O yang selanjutnya digunakan dalam reaksi PCR. *Tube* yang berisi bahan-bahan untuk reaksi PCR (Tabel 3) dimasukkan ke mesin PCR.

Tabel 3. Komponen bahan untuk reaksi PCR (KAPA Biosystems Kit, 2017)

No.	Bahan	Volume
1.	DNA target	3 µl
2.	Primer RAPD	1.25 µl
3.	PCR Mix Kapa	6.25 µl
4.	ddH ₂ O	3 µl
Total volume		13.5 µl

Amplifikasi DNA dengan teknik RAPD menggunakan 23 primer acak (Tabel 4) yang sebagian besar mengacu dari beberapa jurnal yang dapat mengamplifikasi DNA tanaman jeruk.

Tabel 4. Primer yang digunakan dalam analisis RAPD

No.	Primer	Primer Sequences 5'-3'	T _m (°C)
1.	OPA-05	AGG GGT CTT G	32.6
2.	OPA-09	GGG TAA CGC C	37.4
3.	OPA-12	TCG GCG ATA G	34.0
4.	OPA-17	GAC CGC TTG T	35.7
5.	OPC-09	CTC ACC GTC C	36.2
6.	OPC-17	TTC CCC CCA G	37.4
7.	OPD-07	TTG GCA CGG G	40.9
8.	OPE-04	GTG ACA TGC C	33.2
9.	OPH-04	GGA AGT CGC C	37.5
10.	OPH-15	AAT GGC GCA G	37.1
11.	OPN-14	TCG TGC GGG T	43.2
12.	OPN-16	AAG CGA CCT G	35.1
13.	OPR-08	CCA TTC CCC A	33.2
14.	OPR-20	TCG GCA CGC A	44.5
15.	OPW-06	AGG CCC GAT G	39.3
16.	OPW-09	GTG ACC GAG T	33.9
17.	OPX-07	GAG CGA GGC T	39.5
18.	OPX-11	GGA GCC TCA G	35.4
19.	OPX-13	ACG GGA GCA A	37.5
20.	OPX-16	CTC TGT TCG G	31.6
21.	OPX-17	GAC ACG GAC C	36.8
22.	UBC-18	GGG CCG TTT A	35.0
23.	UBC-51	CTA CCC GTG C	36.9

Tahapan amplifikasi PCR sebagai berikut:

1. Denaturasi awal, suhu 95°C selama 5 menit
2. Denaturasi siklus pertama, suhu 94°C selama 1 menit
3. Penempelan primer spesifik (suhu disesuaikan dengan masing-masing pasangan primer) selama 60 detik
4. Pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 1 menit
5. Pemanjangan akhir 72°C selama 10 menit

Elektroforesis

Tahapan elektroforesis yaitu dengan menimbang agarose seberat 3.6 g kemudian dimasukkan sebanyak 180 ml buffer TE 1X. Larutan dipanaskan dengan menggunakan *microwave* selama 5 menit lalu ditambahkan gel red sebanyak 1.5 µl. Larutan dituang ke dalam cetakan agar kemudian dipasangkan *comb* (sisir), kemudian dидiamkan sampai agar memadat. Setelah padat *comb* dilepas kemudian agar dimasukkan ke dalam tank yang berisi buffer TE 1X. Sampel DNA yang telah melalui tahap PCR dimasukkan ke dalam masing-masing sumur agar, pada sumur disisi kanan dan kiri di beri larutan marker. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 120 Volt selama 70 menit. Agar dimasukkan ke dalam *gel documentation* untuk divisualisasikan.

Visualisasi DNA

Hasil PCR yang telah dielektroforesis dilakukan pengambilan foto dan dianalisis melalui skoring.

2.3.5 Analisis Data

Data hasil pengamatan karakter fenotip dan anatomi dianalisis secara deskriptif dengan menggambarkan ciri-ciri fenotip dan anatomi sesuai pengamatan terhadap seluruh varietas jeruk yang disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Analisis data genotip secara deskriptif dengan melihat jumlah alel yang dihasilkan masing-masing primer, ciri fenotip dan anatomi yang dihasilkan dari setiap sampel kemudian dilakukan skoring, jika terdapat ciri yang muncul dinilai 1 dan jika tidak terdapat nilai ciri dinilai 0. Analisis pengelompokan berdasarkan metode *Unweighted Pair Group Method Arithmetic* (UPGMA) dengan software *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSYS). *Principal Coordinate Analysis* (PCoA) dilakukan berdasarkan data *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) untuk lebih memahami kesamaan antarvarietas dengan menggunakan paket PCoA di NTSYS-pc 2.1 (Ibrahim et al., 2017).

Analisis Kekuatan Primer

Penentuan primer RAPD yang paling informatif diketahui dari beberapa parameter yaitu *Polymorphic Information Content* (PIC) (Laurentin dan Karlovsky, 2007). PIC sebagai parameter standar untuk mengevaluasi hasil amplifikasi PCR markah genetik berdasarkan pita DNA. Nilai PIC berkisar antara 0-0.5, semakin tinggi nilai PIC maka menandakan, bahwa suatu primer tersebut semakin baik digunakan untuk mengetahui adanya variasi genetik. Klasifikasi PIC menurut Botstein et al. (1980) yaitu sangat informatif jika $PIC > 0.5$; cukup informatif jika $0.5 > PIC > 0.25$ dan sedikit informatif jika $PIC < 0.25$. Nilai PIC untuk setiap primer dapat dihitung menggunakan rumus Roldan-Ruiz et al. (2000) sebagai berikut:

$$PIC_i = 2f(1 - f)$$

Keterangan:

f = frekuensi pita DNA yang muncul

1 - f = frekuensi pita DNA yang tidak muncul

Analisis Keragaman Genetik

Keragaman genetik dianalisis berdasarkan data biner dengan parameter jumlah alel yang diamati (N_a), jumlah alel efektif per lokus (N_e), heterozigositas harapan (H_e) dan keragaman genotipik berdasarkan indeks *Shannon's information indeks* (I) menggunakan software *Genetic Analysis in Excel* (GenAIEx) (Tanavar et al., 2014). Nilai N_e diperoleh menggunakan rumus:

$$N_e = 1 / (1 - h) = 1 / \sum p_i^2$$

Keterangan:

p_i = frekuensi alel ke- i dalam lokus

h = $1 - \sum p_i^2$ = heterozigositas dalam lokus

Nilai H_e diperoleh dengan rumus:

$$H_e = 2 * p * q,$$

Dimana untuk data diploid biner dan dengan asumsi Hardy-Weinberg Equilibrium, $q = (1 - \text{Band Freq.})^{0.5}$ dan $p = 1 - q$ (Nei, 1978).

2.4 Hasil Penelitian

2.4.1 Keragaman Fenotip

Karakterisasi fenotip merupakan pengamatan karakter morfologis tanaman baik berdasarkan sifat kualitatif maupun kuantitatif. Pengamatan dilakukan terhadap 24 karakter (Tabel 5). Karakter kualitatif yang diamati meliputi bentuk pohon, bentuk batang, arah tumbuh batang, percabangan pada batang, arah tumbuh cabang, perlekatan helaian daun (lamina), bentuk daun (circumscription), ujung daun (apex folii), pangkal daun (basis folii), susunan tulang-tulang daun (nervatio/ venation), tepi daun (margo folii), daging daun (intervenium), warna daun, permukaan daun, tata letak daun pada batang (phyllotaxis), sayap pada tangkai daun, lebar sayap pada tangkai daun, dan bentuk sayap tangkai daun (Tabel 5). Karakter kuantitatif adalah pengamatan fenotip berdasarkan ukuran atau jumlah sifat yang teramati dengan satuan yang ada. Karakter kuantitatif yang diamati meliputi rata-rata tinggi pohon, rata-rata diameter batang, panjang daun, lebar daun, tebal daun, dan panjang tangkai daun (Tabel 5).

Bentuk pohon

Bentuk pohon *ellipsoid* pada varietas jeruk selayar biji (SB), JC-selayar (JS), selayar-selayar (SS), pamelo merah (M), pamelo putih (P), pamelo gula-gula (G), keprok batu (B), purut (NN), dan dekopoon (D) sedangkan bentuk pohon *obloid* pada varietas jeruk *Japanshe citroen* (JC), siam (SI), santang madu (SM) dan nipis (N).

Bentuk, arah tumbuh dan percabangan batang

Secara umum, 13 varietas jeruk memiliki bentuk batang bulat (teres) dengan arah tumbuh batang tegak lurus ke atas (erectus) dan percabangan pada batang simpodial yaitu batang pokok sukar ditentukan karena dalam perkembangan selanjutnya mungkin menghentikan pertumbuhannya atau kalah besar dan cepat pertumbuhannya dibandingkan dengan cabangnya.



Gambar 4. Karakter fenotip pohon dari 13 varietas tanaman jeruk. a) selayer biji (SB); b) JC-selayer (JS); c) selayer-selayer (SS); d) pamelu merah (M); e) pamelu putih (P); f) pamelu gula-gula (G); g) keprok batu (B); h) siam (SI); i) jeruk nipis (N); j) jeruk purut (NN); k) dekopon (D); l) santang madu (SM); m) *Japansche citroen* (JC).

Arah tumbuh cabang

Semua varietas memiliki arah tumbuh cabang tegak (*fastigiatus*) yaitu sudut antara batang dan cabang sangat kecil, sehingga arah tumbuh cabang hanya pada pangkalnya saja sedikit serong ke atas, tetapi selanjutnya hampir sejajar dengan batang pokoknya.

Perlekatan helaian daun (lamina)

Semua varietas tergolong *brevipetiolate* yaitu tangkai daun lebih pendek dibanding helaian daun.

Bentuk daun

Bentuk daun dari 13 varietas tanaman jeruk bervariasi yaitu bentuk daun bulat telur (*ovatus*) pada varietas jeruk selayer biji (SB), JC-selayer (JS), selayer-selayer (SS), keprok batu (B), siam (SI), santang madu (SM), purut (NN), dan dekopon (D). Bentuk bulat telur sungsang (*obovatus*) pada varietas jeruk pameloma merah (M), pameloma putih (P), pameloma gula-gula (G), dan *Japanshe citroen* (JC). Bentuk daun ini berbentuk bulat telur tetapi bagian yang lebar terdapat dekat ujung daun. Bentuk daun bulat telur (*ovatus*)-jorong (*ovalis*) pada varietas jeruk nipis (N).

Ujung daun

Ujung daun terbelah (*retusus*) pada varietas jeruk selayer biji (SB), JC-selayer (JS), selayer-selayer (SS), pameloma merah (M), pameloma gula-gula (G), dan keprok batu (B). Ujung daun tumpul (*obtusus*) pada varietas *Japanshe citroen* (JC), pameloma putih (P) dan dekopon (D). Ujung daun meruncing (*acuminatus*)-terbelah (*retusus*) pada varietas jeruk siam (SI) dan santang madu (SM). Ujung runcing (*acutus*)-terbelah (*retusus*) pada varietas jeruk nipis (N) dan ujung daun tumpul (*obtusus*)-runcing (*acutus*)-terbelah (*retusus*) pada varietas jeruk purut (NN).

Pangkal daun

Pangkal daun tumpul (*obtusus*) pada varietas selayer biji (SB), JC-selayer (JS), selayer-selayer (SS), pameloma putih (P), keprok batu (B), siam (SI), santang madu (SM), dan purut (NN). Pangkal daun runcing (*acutus*) pada varietas jeruk *Japanshe citroen* (JC), pameloma merah (M) dan dekopon (D). Pangkal daun tumpul (*obtusus*)-membulat (*rotundatus*) pada varietas pameloma gula-gula (G), dan pangkal daun membulat (*rotundatus*) pada varietas nipis (N).

Susunan tulang daun (nervatio/ venation)

Tanaman jeruk memiliki susunan tulang daun menyirip (*penninervis*) yaitu daun dengan satu ibu tulang daun dari pangkal ke ujung dan merupakan terusan tangkai daun. Dari ibu tulang daun ke samping keluar tulang-tulang cabang, sehingga susunannya menyerupai sirip ikan.

Tepi daun (margo folii)

Tepi daun beringgit (*crenatus*) pada varietas selayer biji (SB), JC-selayer (JS), selayer-selayer (SS), *Japanshe citroen* (JC), pameloma merah (M), keprok batu (B), siam (SI), dekopon (D), nipis (N), dan purut (NN). Tepi daun

bergelombang (sinuate) pada varietas pamelu putih (P), pamelu gula-gula (G) dan santang maadu (SM).

Daging daun (intervenium), warna, permukaan, dan tata letak daun pada batang (phyllotaxis)

Semua varietas jeruk memiliki daging daun seperti kertas tipis (papyraceus/ chartaceus), warna daun hijau tua dengan permukaan daun licin (laevis) mengkilat (nitidus). Tata letak daun pada batang 1/3 yaitu daun tunggal tersebar (folia sparsa).

Lebar dan bentuk sayap pada tangkai daun

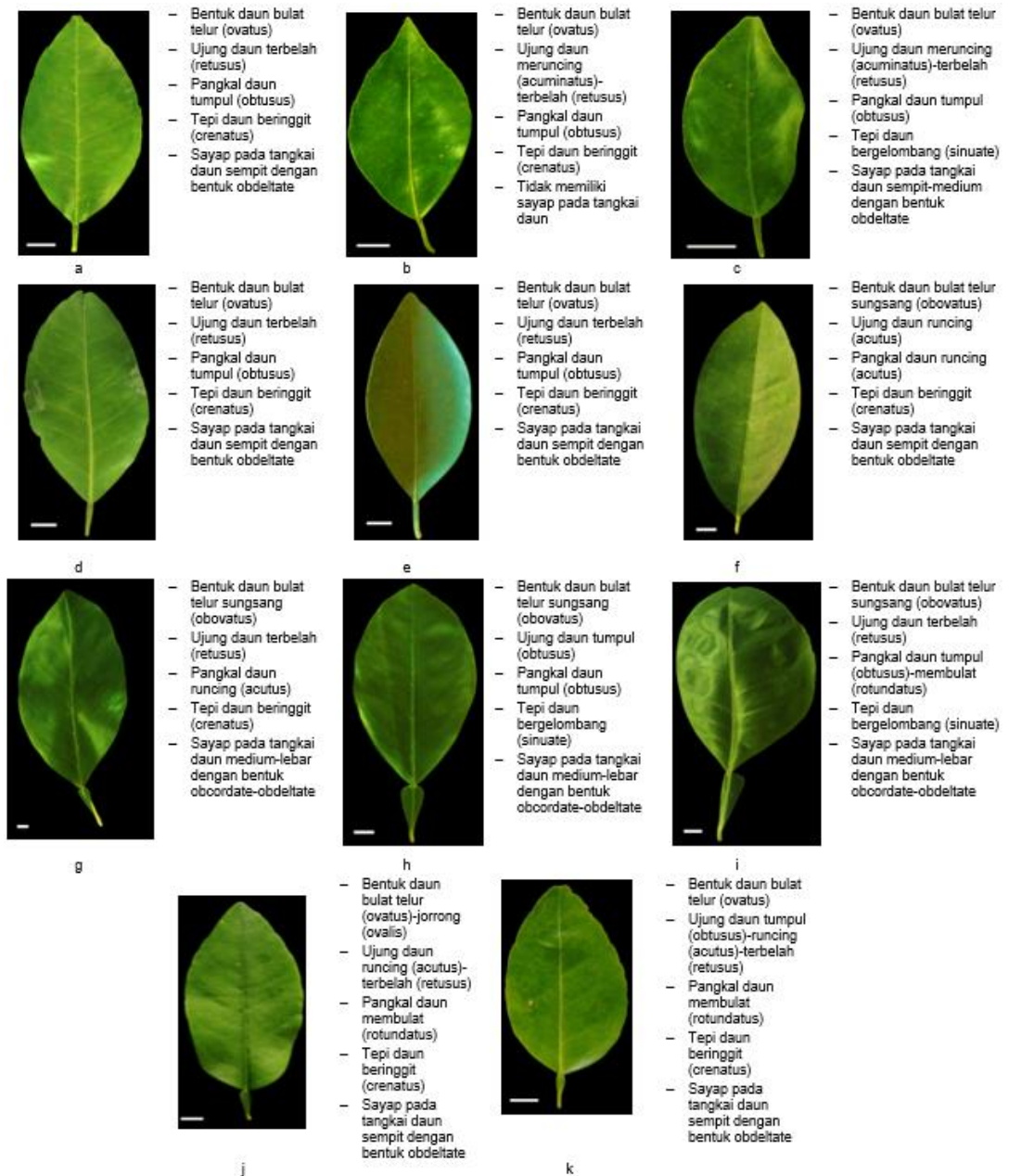
Semua varietas jeruk memiliki sayap pada tangkai daun kecuali pada varietas jeruk siam (SI). Sayap pada tangkai daun berukuran medium-lebar dengan bentuk obcordate-obdeltate pada varietas pamelu merah (M), pamelu putih (P) dan pamelu gula-gula (G), bersayap sempit dengan bentuk obdeltate pada varietas selayar biji (SB), JC-selayar (JS), selayar-selayar (SS), *Japanshe citroen* (JC), keprok batu (B), dekopon (D), nipis (N), dan purut (NN). Daun bersayap sempit-medium dengan bentuk obdeltate pada varietas jeruk santang madu (SM).

Tinggi pohon dan diameter batang

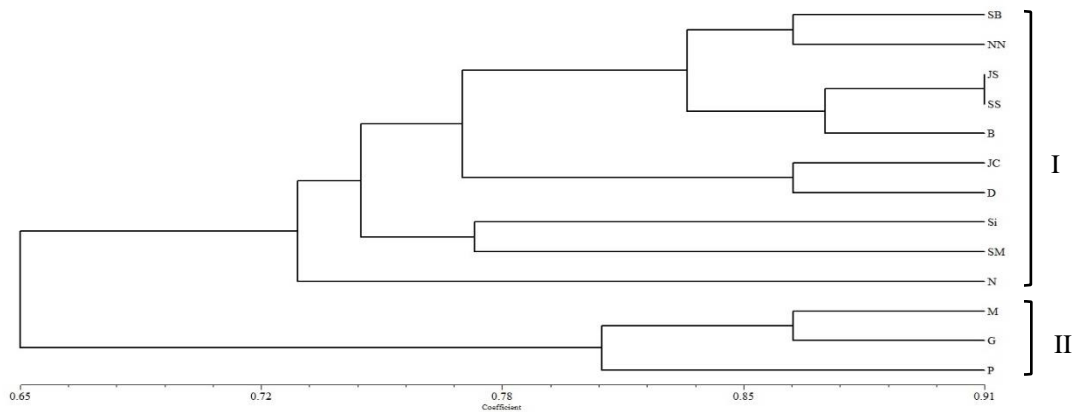
Tinggi tanaman varietas jeruk berkisar 1.75-8.83 m dengan diameter 2.30-21.34 cm. Pohon tertinggi pada varietas jeruk selayar biji (SB), JC-selayar (JS), selayar-selayar (SS) ± 8 m dengan diameter ± 9 cm, terpendek pada pohon jeruk santang madu (SM) 1.75 m dengan diameter 2.60 cm.

Panjang, lebar, tebal dan panjang tangkai daun

Panjang daun bervariasi antar varietas berkisar 1-13.4 cm dengan lebar 1.5-9.2 cm. Daun terpanjang pada varietas jeruk pamelu merah (M), pamelu putih (P), pamelu gula-gula (G) ± 13 cm dengan lebar ± 7.5 cm.



Gambar 5. Variasi fenotip daun dari 13 varietas tanaman jeruk. a) selayar [selayar biji (SB), selayar-selayar (SS), JS (JC-selayar)]; b) siam (SI); c) santang madu (SM); d) keprok batu (B); e) dekopon (D); f) *Japansche citroen* (JC); g) pamelo merah (M); h) pamelo putih (P); i) pamelo gula-gula (G); j) jeruk nipis (N); k) jeruk purut (NN).



Gambar 6. Dendrogram yang dihasilkan melalui analisis kluster fenotip 13 varietas jeruk (selayar biji (SB), purut (NN), JC-selayar (JS), selayar-selayar (SS), keprok batu (B), *Japanshe citroen* (JC), dekopon (D), siam (SI), santang madu (SM), 0020nipsis (N), pamelomerah (M), pamelogula-gula (G), dan pameloputih (P)).

Hasil dendrogram menampilkan dua kluster pada koefisien kemiripan 65% yaitu kluster I terdiri dari varietas selayar biji (SB), purut (NN), JC-selayar (JS), selayar-selayar (SS), keprok batu (B), *Japanshe citroen* (JC), dekopon (D), siam (SI), santang madu (SM), dan nipis (N). Sedangkan kluster II terdiri dari varietas pamelomerah (M), pamelogula-gula (G) dan pameloputih (P). Kluster I pada koefisien kemiripan 0.74 terbagi menjadi 2 sub-kluster yaitu sub-kluster 1 dan sub-kluster 2. Sub kluster 1 terdiri dari varietas selayar biji (SB), purut (NN), JC-selayar (JS), selayar-selayar (SS), keprok batu (B), *Japanshe citroen* (JC), dekopon (D), siam (SI), dan santang madu (SM). Sedangkan sub-kluster 2 yaitu varietas nipis (N). Sub-kluster 1 pada koefisien kemiripan 0.75 terbagi menjadi 2 sub-kluster yaitu sub-kluster 1.1 dan 1.2. Sub-kluster 1.1 terdiri dari selayar biji (SB), purut (NN), JC-selayar (JS), selayar-selayar (SS), keprok batu (B), *Japanshe citroen* (JC), dan dekopon (D). Sedangkan sub-kluster 1.2 terdiri dari siam (SI), dan santang madu (SM). Sub-kluster 1.1 dan 1.2 memiliki kemiripan 75%.

Tabel 5. Analisis fenotip karakter kualitatif dan kuantitatif dari 13 varietas jeruk di Sulawesi Selatan

No.	Deskripsi	Selayar Biji (SB)	JC-Selayar (JS)	Selayar-Selayar (SS)	Japansche Citroen (JC)	Pamelo Merah (M)	Pamelo Putih (P)	Pamelo Gula-gula (G)	Batu 55 (B)	Siam (SI)	Santang madu (SM)	Dekopon (D)	Nipis (N)	Purut (NN)
Karakter Kualitatif														
1.	Bentuk pohon	<i>Ellipsoid</i>	<i>Ellipsoid</i>	<i>Ellipsoid</i>	<i>Obloid</i>	<i>Ellipsoid</i>	<i>Ellipsoid</i>	<i>Ellipsoid</i>	<i>Ellipsoid</i>	<i>Obloid</i>	<i>Obloid</i>	<i>Ellipsoid</i>	<i>Obloid</i>	<i>Ellipsoid</i>
2.	Bentuk batang	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)	Bulat (teres)
3.	Arah tumbuh batang	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)	Tegak lurus ke atas (erectus)
4.	Percabangan pada batang	Simpodial	Simpodial	Simpodial	Simpodial	Simpodial	Simpodial	Simpodial	Simpodial	Simpodial	Simpodial	Simpodial	Simpodial	Simpodial
5.	Arah tumbuh cabang	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)	Tegak (fastigiatus)
6.	Perlekatan helaian daun (lamina)	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>	<i>Brevipetiolate</i>
7.	Bentuk daun (circumscription)	Bulat telur (ovatus)	Bulat telur (ovatus)	Bulat telur (ovatus)	Bulat telur sungsang (obovatus)	Bulat telur sungsang (obovatus)	Bulat telur sungsang (obovatus)	Bulat telur sungsang (obovatus)	Bulat telur (ovatus)	Bulat telur (ovatus)	Bulat telur (ovatus)	Bulat telur (ovatus)	Bulat telur (ovatus)-jorong (ovalis)	Bulat telur (ovatus)
8.	Ujung daun (apex folii)	Terbelah (retusus)	Terbelah (retusus)	Terbelah (retusus)	Tumpul (obtusus)	Terbelah (retusus)	Tumpul (obtusus)	Terbelah (retusus)	Terbelah (retusus)	Meruncung (acuminatus)-terbelah (retusus)	Meruncung (acuminatus)-terbelah (retusus)	Tumpul (obtusus)	Runcing (acutus)-terbelah (retusus)	Tumpul (obtusus)-runcing (acutus)-terbelah (retusus)
9.	Pangkal daun (basis folii)	Tumpul (obtusus)	Tumpul (obtusus)	Tumpul (obtusus)	Runcing (acutus)	Runcing (acutus)	Tumpul (obtusus)	Tumpul (obtusus)-membulat (rotundatus)	Tumpul (obtusus)	Tumpul (obtusus)	Tumpul (obtusus)	Runcing (acutus)	Membulat (rotundatus)	Tumpul (obtusus)
10.	Susunan tulang-tulang daun (nervatio/venation)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)	Menyirip (penninervis)
11.	Tepi daun (margo folii)	Beringgit (creanatus)	Beringgit (creanatus)	Beringgit (creanatus)	Beringgit (creanatus)	Beringgit (creanatus)	Bergelombang (sinuate)	Bergelombang (sinuate)	Beringgit (creanatus)	Beringgit (creanatus)	Bergelombang (sinuate)	Beringgit (creanatus)	Beringgit (creanatus)	Beringgit (creanatus)
12.	Daging daun (intervenium)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)	Seperti kertas tipis, tetapi cukup tegar (papyraceus/chartaceus)
13.	Warna daun	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua	Hijau tua
14.	Permukaan daun	Licin (lavis), mengkilat	Licin (lavis), mengkilat	Licin (lavis), mengkilat	Licin (lavis), mengkilat	Licin (lavis), mengkilat	Licin (lavis), mengkilat	Licin (lavis), mengkilat (nitidus)	Licin (lavis), mengkilat	Licin (lavis), mengkilat (nitidus)	Licin (lavis), mengkilat (nitidus)	Licin (lavis), mengkilat	Licin (lavis), mengkilat	Licin (lavis), mengkilat

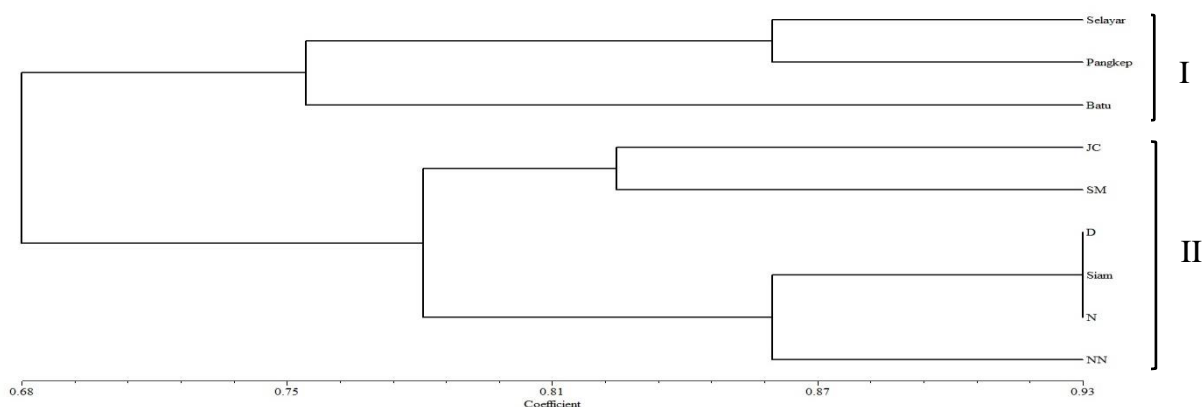
No.	Deskripsi	Selayar Biji (SB)	JC-Selayar (JS)	Selayar-Selayar (SS)	Japansche Citroen (JC)	Pamelo Merah (M)	Pamelo Putih (P)	Pamelo Gula-gula (G)	Batu 55 (B)	Siam (SI)	Santang madu (SM)	Dekopon (D)	Nipis (N)	Purut (NN)
Karakter Kualitatif														
		(nitidus)	(nitidus)	(nitidus)	(nitidus)	(nitidus)	(nitidus)	(nitidus)	(nitidus)			(nitidus)	(nitidus)	(nitidus)
15.	Tata letak daun pada batang (phyllotaxis)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)	1/3, daun tunggal tersebar (folia sparsa)
16.	Sayap pada tangkai daun	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Tidak ada	Ada	Ada	Ada	Ada
17.	Lebar sayap pada tangkai daun	Narrow	Narrow	Narrow	Narrow	Medium-broad	medium-broad	Medium-broad	Narrow	-	Narrow-medium	Narrow	Narrow	Narrow
18.	Bentuk sayap tangkai daun	Obdeltate	Obdeltate	Obdeltate	Obdeltate	Obcordate-obdeltate	Obcordate-obdeltate	Obcordate-obdeltate	Obdeltate	-	Obdeltate	Obdeltate	Obdeltate	Obdeltate
Karakter Kuantitatif														
No.	Deskripsi	Selayar Biji (SB)	JC-Selayar (JS)	Selayar-Selayar (SS)	Japansche Citroen (JC)	Pamelo Merah (M)	Pamelo Putih (P)	Pamelo Gula-gula (G)	Batu 55 (B)	Siam (SI)	Santang madu (SM)	Dekopon (D)	Nipis (N)	Purut (NN)
19.	Rata-rata tinggi pohon (m)	8.83	4.07	4.57	3.3	5.74	2.02	6.60	3.97	4.32	1.75	1.95	5.04	6.08
20.	Rata-rata diameter batang (cm)	9.45	6.84	7.91	8.2	16.45	8.81	21.34	8.83	13.67	2.60	2.30	10.10	13.91
21.	Panjang daun (cm)	3.9-8.8	4.9-8.1	4.6-6.8	7.6 - 11.5	7-13.4	5.8-13.3	7.5-11.4	5.4-8.6	3.5-8.3	4-10	3.5-8	6.1-10.4	1-7
22.	Lebar daun (cm)	2.1-4.6	3.1-4.3	1.9-3.6	3.8 – 5.5	4.4-9.2	3.4-9.2	4.9-8.8	2.6-4.7	2.1-4.5	1.8-5.6	1.5-2.5	4-6.8	1.8-4.2
23.	Tebal daun (mm)	0.35-0.75	0.45-0.75	0.45-0.65	0.2-0.3	0.2-0.4	0.2-0.3	0.2-0.3	0.01-0.2	0.03-0.04	0.03-0.04	0.03-0.04	0.035-0.2	0.02-0.04
24.	Panjang tangkai daun (cm)	0.3-1.2	0.9-1.1	0.5-0.9	0.3-0.9	1.1-3.2	1.8-4.5	1-4.1	0.7-1.9	0.7-1.9	0.8-2.1	0.5-0.8	1-2.9	0.4-1.5

Keterangan: SB = selayar biji; JS = JC-selayar; SS = selayar-selayar; JC = *Japansche citroen*; M = pamelo merah; P = pamelo putih; G = pamelo gula-gula; B = keprok batu; SI = siam; SM = santang madu; D = dekopon; N = nipis; NN = purut.

2.4.2 Keragaman Anatomi

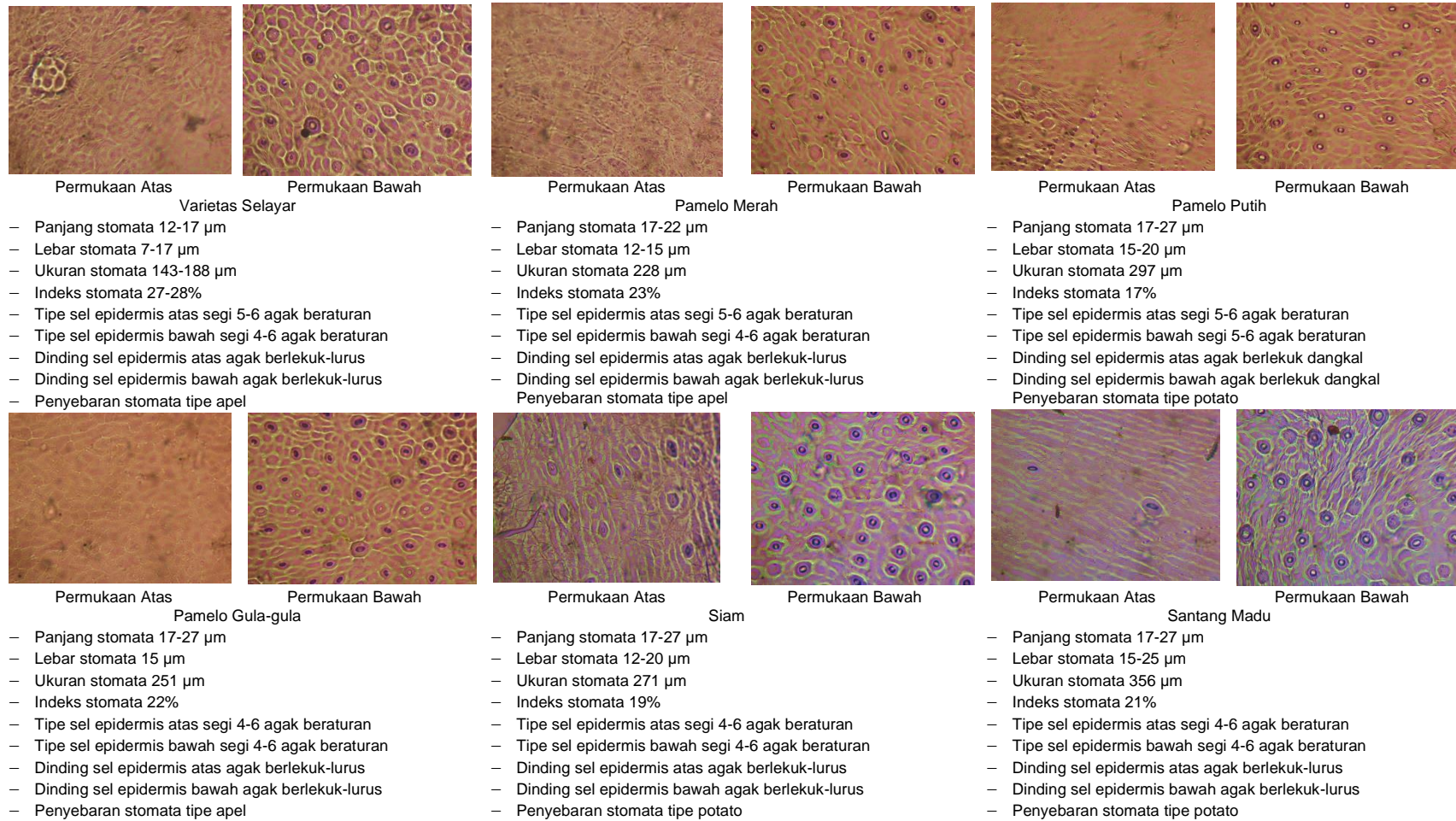
Hasil pengamatan anatomi daun dari 13 varietas tanaman jeruk terlihat semua varietas yang diamati memiliki tipe stomata *anomocytic* yaitu tipe stomata dengan sel penjaga dikelilingi oleh sejumlah sel tertentu yang tidak berbeda dengan sel epidermis lainnya dalam bentuk maupun ukuran. Sel penutup stomata berbentuk ginjal, terdapat trikoma sebagai derivat sel epidermis atas, dan penyebaran stomata tidak beraturan. Karakter anatomi yang berbeda antarvarietas terletak pada ukuran stomata, indeks stomata, tipe sel epidermis atas dan bawah, serta dinding sel epidermis atas dan bawah.

Panjang stomata berkisar 12.5-30 μm , lebar stomata 7.5-22.5 μm . Indeks stomata berkisar 16.07-29.44%, indeks stomata terendah pada varietas purut (NN) (16.07%) dan tertinggi pada varietas jeruk keprok batu 55 (B) (29.44%). Tipe sel epidermis atas berbentuk segi 4-6 agak beraturan pada varietas *Japanshe citroen* (JC), pamelu gula-gula (G), keprok batu (B), nipis (N), purut (NN), siam (SI), santang madu (SM), dan dekopon (D), sedangkan bentuk segi 5-6 agak beraturan pada varietas selayar biji (SB), JC-selayar (JS), selayar-selayar (SS), pamelu merah (M), dan pamelu putih (P). Tipe sel epidermis bawah berbentuk segi 4-6 agak beraturan pada semua varietas kecuali varietas pamelu putih (P) berbentuk segi 5-6 agak beraturan. Dinding sel epidermis atas agak berlekuk-lurus pada semua varietas kecuali varietas pamelu putih (P) berlekuk dangkal. Dinding sel epidermis bawah agak berlekuk-lurus pada semua varietas kecuali varietas pamelu putih (P) berlekuk dangkal.

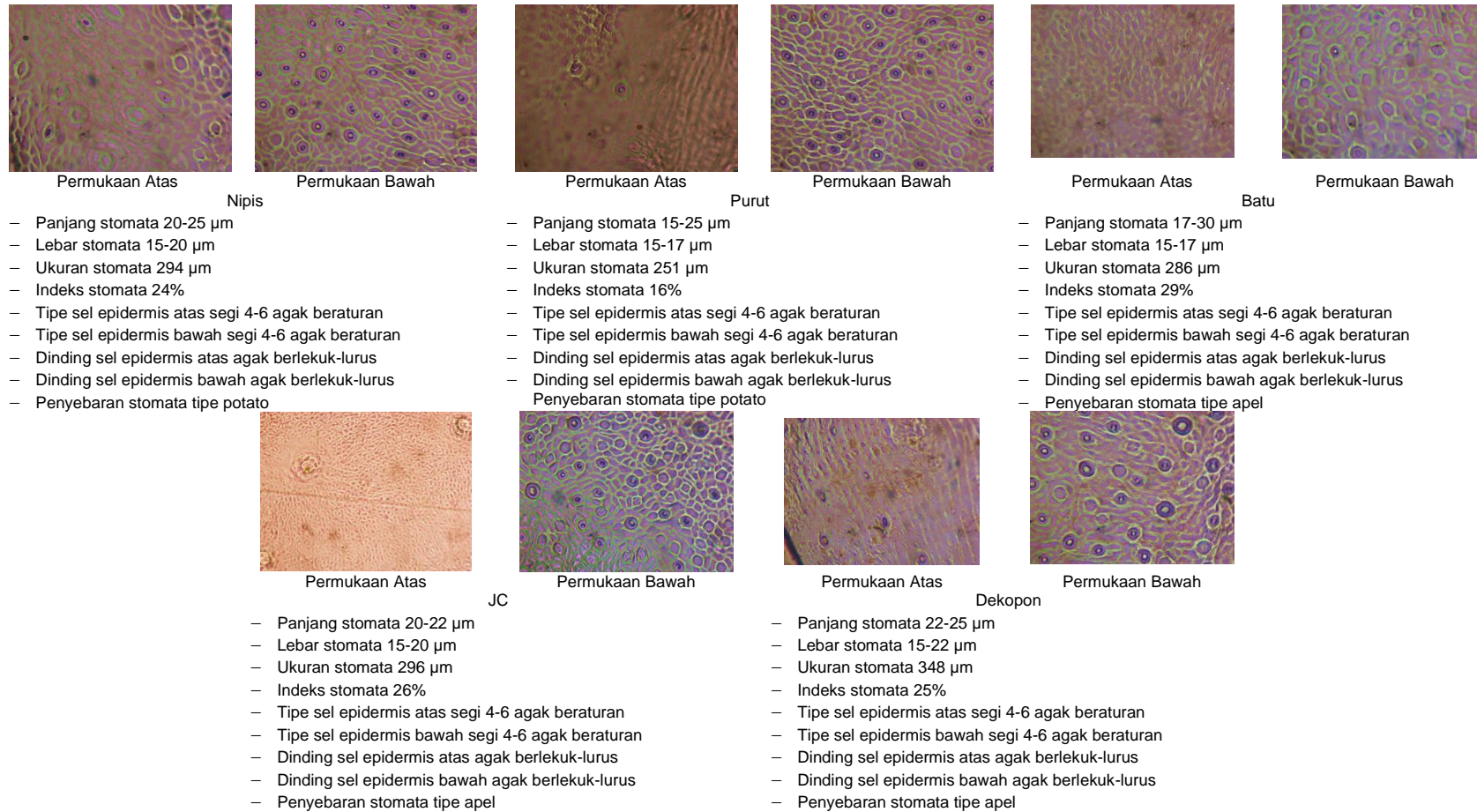


Gambar 7. Dendrogram yang dihasilkan melalui analisis kluster anatomi dari 13 varietas jeruk. (selayar [selayar biji (SB), JC-selayar (JS), selayar-selayar (SS)]; pangkep [pamelu merah (M), pamelu putih (P), pamelu gula-gula (G)]; keprok batu (B); *Japanshe citroen* (JC); santang madu (SM); dekopon (D); siam (SI); nipis (N); purut (NN)).

Hasil dendrogram menampilkan dua kluster pada koefisien kesamaan 68% yaitu kluster I terdiri dari varietas keprok selayar, pamelu pangkep dan keprok batu. Sedangkan kluster II terdiri dari varietas *Japanshe citroen* (JC), santang madu (SM), dekopon (D), siam (SI), nipis (N), dan purut (NN). Kluster II pada koefisien kesamaan 0.79 terbagi menjadi 2 sub-kluster yaitu sub-kluster 1 dan sub-kluster 2. Sub kluster 1 terdiri dari varietas *Japanshe citroen* (JC) dan santang madu (SM), sedangkan sub-kluster 2 terdiri dari varietas dekopon (D), siam (SI), nipis (N) dan purut (NN). Sub-kluster 1 dan 2 memiliki kemiripan 79%.



Gambar 8. Karakter anatomi stomata daun jeruk dari 13 varietas di Sulawesi Selatan.
Keterangan: Panjang, lebar dan ukuran stomata diamati dengan perbesaran 400x.
Index stomata diamati dengan perbesaran 200x.



Gambar 8. Karakter anatomi stomata daun jeruk dari 13 varietas di Sulawesi Selatan (Lanjutan).
Keterangan: Panjang, lebar dan ukuran stomata diamati dengan perbesaran 400x.
Index stomata diamati dengan perbesaran 200x.

Tabel 6. Analisis karakter anatomi dari 13 varietas jeruk di Sulawesi Selatan

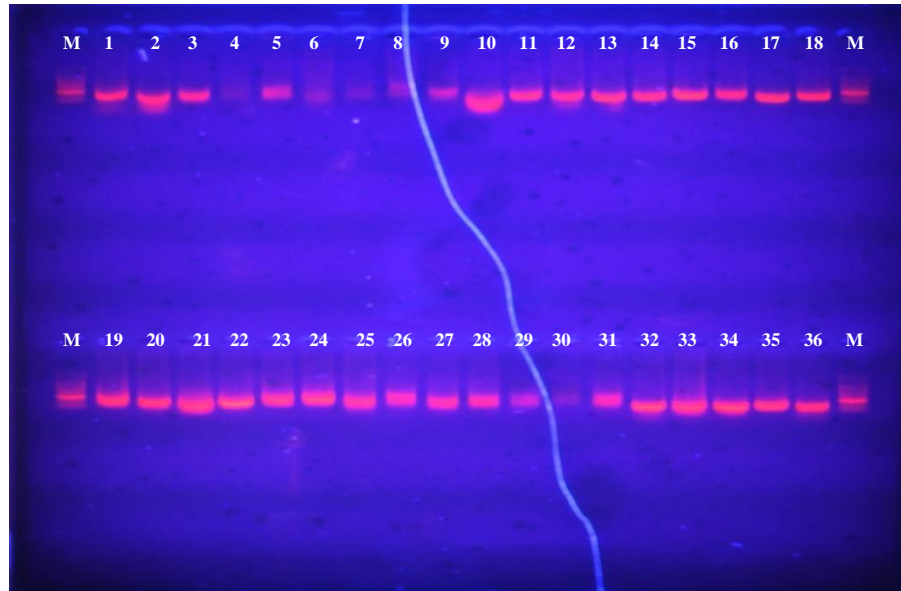
No.	Uraian	SB	JS	SS	JC	M	P	G	B	N	NN	SI	SM	D
1.	Letak stomata	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)	Abaxial (bawah)
2.	Tipe stomata	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic	Anomocytic
3.	Panjang stomata (μm)	12.5-17.5	17.5	15-17.5	20-22.5	17.5-22.5	17.5-27.5	17.5-27.5	17.5-30	20-25	15-25	17.5-27.5	17.5-27.5	22.5-25
4.	Lebar stomata (μm)	7.5-15	10-15	12.5-17.5	15-20	12.5-15	15-20	15	15-17.5	15-20	15-17.5	12.5-20	15-25	15-22.5
	Ukuran stomata (μm)	143.19	184.33	187.63	296.25	228.36	297.24	251.81	286.38	294.28	251.20	271.07	356.12	348.09
5.	Indeks stomata (%)	27.01	27.68	27.02	25.88	23.19	17.45	22.20	29.44	24.40	16.07	18.69	21.33	24.80
6.	Tipe sel epidermis atas	Segi 5-6 agak beraturan	Segi 5-6 agak beraturan	Segi 5-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 5-6 agak beraturan	Segi 5-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan
7.	Tipe sel epidermis bawah	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 5-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan	Segi 4-6 agak beraturan
8.	Dinding sel epidermis atas	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Berlekuk dangkal	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus
9.	Dinding sel epidermis bawah	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Berlekuk dangkal	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus	Agak berlekuk s/d lurus
10.	Bentuk sel penutup stomata	Bentuk Ginjal	Bentuk Ginjal	Bentuk Ginjal	Bentuk ginjal	Bentuk Ginjal	Bentuk Ginjal	Bentuk Ginjal	Bentuk Ginjal	Bentuk Ginjal	Bentuk Ginjal	Bentuk Ginjal	Bentuk Ginjal	Bentuk Ginjal
11.	Letak trikoma	Sel epidermis atas	Sel epidermis atas	Sel epidermis atas	Sel epidermis atas	Sel epidermis atas	-	-	Sel epidermis atas	Sel epidermis atas	Sel epidermis atas	Sel epidermis atas	Sel epidermis atas	Sel epidermis atas
12.	Bentuk trikoma	Pulsate	Pulsate	Pulsate	Pulsate	Pulsate	-	-	Pulsate	Pulsate	Pulsate	Pulsate	Pulsate	Pulsate
13.	Pembukaan stomata (μm)	2.5-5	2.5	2.5-5	2.5-5	2.5-5	2.5-5	2.5	2.5-5	2.5-7.5	2.5	2.5-5	2.5	2.5-5
14.	Penyebaran stomata	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan
15.	Tipe penyebaran stomata	Tipe apel	Tipe apel	Tipe apel	Tipe apel	Tipe apel	Tipe potato	Tipe apel	Tipe apel	Tipe potato	Tipe potato	Tipe potato	Tipe potato	Tipe apel

Keterangan: SB = Selayar Biji; JS = JC-Selayar; SS = Selayar-Selayar; JC = Japansche Citroen; M = Pamelu Merah; P = Pamelu Putih; G = Pamelu Gula-Gula; B = Keprok Batu 55; SI = Siam; SM = Santang Madu; D = Dekopon; N = Nipis; NN = Purut

2.4.3 Keragaman Genotipik

2.4.3a Kualitas dan Kuantitas DNA

Kualitas yang dihasilkan dari isolasi DNA menggunakan prosedur Geneaid Genomic DNA Mini Kit terlihat pada Gambar 9. Kualitas DNA yang diperoleh cukup baik. Fragmen DNA muncul pada semua sampel dengan ketebalan yang bervariasi.



Gambar 9. Elektroforegram DNA tanaman jeruk hasil isolasi menggunakan prosedur Geneaid Genomic DNA Mini Kit. M=marker; 1-3=selayar biji (SB); 4-6=JC-selayar (JS); 7-9=selayar-selayar (SS); 10-12=JC; 13-15=pamelo merah (M); 16-18=pamelo putih (P); 19-20=pamelo gula-gula (G); 21-23=dekopon (D); 24-25=siam; 26-27=santang madu (SM); 28-30=keprok batu (B); 31-33=nipis (N); 34-36=purut (NN).

Kualitas DNA yang baik juga didukung oleh kuantitas DNA dengan konsentrasi tinggi rata-rata 39.93-85.20 ng/ μ g (Tabel 7).

Tabel 7. Konsentrasi DNA hasil isolasi

No.	Sampel	Konsentrasi (ng/ μ g)			Rata-Rata (ng/ μ g)
		1	2	3	
1.	Selayar biji (SB)	40.2	38.0	41.6	39.93
2.	JC-selayar (JS)	42.6	42.8	41.6	42.33
3.	Keprook batu (B)	Low	Low	Low	-
4.	Pamelo merah (M)	88.2	80.6	86.8	85.20
5.	Pamelo putih (P)	Low	Low	Low	-
6.	Pamelo gula-gula (G)	73.4	83.8	74.8	77.33
7.	Siam (SI)	41.6	36.0	42.6	40.07
8.	Nipis (N)	42.8	41,6	38.0	40.40

2.4.3b Seleksi Primer

Hasil seleksi dari 23 primer RAPD disajikan pada Tabel 8.

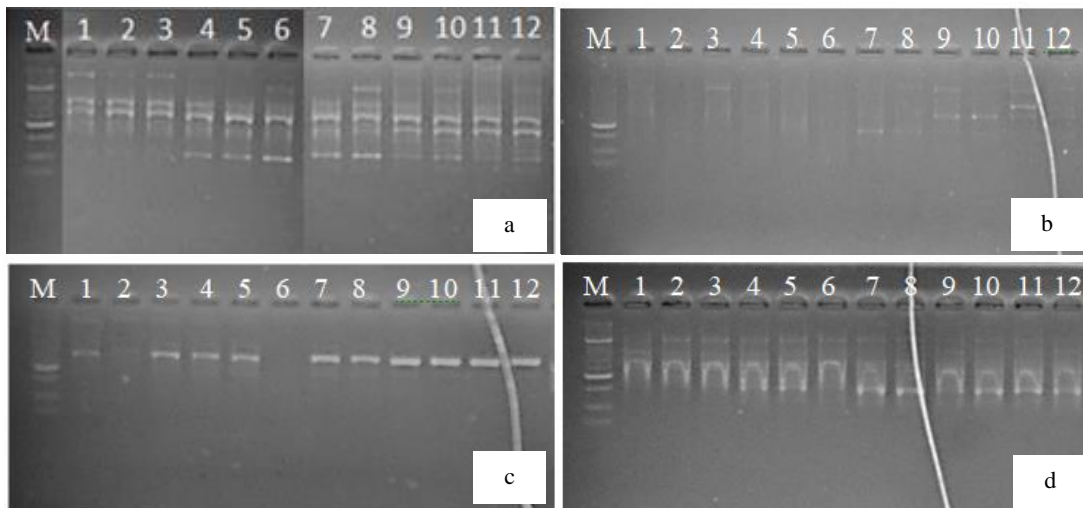
Tabel 8. Primer RAPD dan produk amplifikasi DNA varietas jeruk

No.	Primer	Sekuen Primer 5'-3'	T _m (°C)	T _a (°C)	Jumlah Sampel Teramplifikasi	Poli- morfik	Mono- morfik	Kualitas
1.	OPA-05	AGG GGT CTT G	32.6	35.4	12	1	1	Polimorfik dan Jelas
2.	OPA-09	GGG TAA CGC C	37.4	35.6	12	3	-	Polimorfik dan Jelas
3.	OPA-12	TCG GCG ATA G	34.0	-	10	-	1	Monomorfik
4.	OPA-17	GAC CGC TTG T	35.7	40.2	9	4	-	Polimorfik dan Tidak Jelas
5.	OPC-09	CTC ACC GTC C	36.2	35.6	11	4	-	Polimorfik dan Jelas
6.	OPC-17	TTC CCC CCA G	37.4	40.2	10	4	-	Polimorfik dan Tidak Jelas
7.	OPD-07	TTG GCA CGG G	40.9	-	12	-	5	Monomorfik
8.	OPE-04	GTG ACA TGC C	33.2	30.4	12	1	3	Polimorfik dan Jelas
9.	OPH-04	GGA AGT CGC C	37.5	40.3	12	4	1	Polimorfik dan Jelas
10.	OPH-15	AAT GGC GCA G	37.1	35.4	12	5	1	Polimorfik dan Jelas
11.	OPN-14	TCG TGC GGG T	43.2	43.8	11	7	-	Polimorfik dan Jelas
12.	OPN-16	AAG CGA CCT G	35.1	34.5	12	3	1	Polimorfik dan Jelas
13.	OPR-08	CCA TTC CCC A	33.2	33.8	11	6	-	Polimorfik dan Jelas
14.	OPR-20	TCG GCA CGC A	44.5	45.1	12	3	1	Polimorfik dan Jelas
15.	OPW-06	AGG CCC GAT G	39.3	37.6	12	3	3	Polimorfik dan Jelas
16.	OPW-09	GTG ACC GAG T	33.9	37.6	12	4	1	Polimorfik dan Jelas
17.	OPX-07	GAG CGA GGC T	39.5	41.2	12	8	-	Polimorfik dan Jelas
18.	OPX-11	GGA GCC TCA G	35.4	36.0	12	4	1	Polimorfik dan Jelas
19.	OPX-13	ACG GGA GCA A	37.5	-	12	-	-	Smear
20.	OPX-16	CTC TGT TCG G	31.6	-	12	-	-	Smear
21.	OPX-17	GAC ACG GAC C	36.8	36.2	12	2	2	Polimorfik dan Jelas
22.	UBC-18	GGG CCG TTT A	35.0	32.3	12	6	-	Polimorfik dan Jelas
23.	UBC-51	CTA CCC GTG C	36.9	41.3	12	6	-	Polimorfik dan Jelas

Hasil seleksi primer menampilkan primer tersebut mampu menghasilkan produk amplifikasi pada DNA sampel. Pita polimorfik dihasilkan oleh 19 primer yaitu OPA-05, OPA-09, OPA-17, OPC-09, OPC-17, OPE-04, OPH-04, OPH-15, OPN-14, OPN-16, OPR-08, OPR-20, OPW-06, OPW-09, OPX-07, OPX-11, OPX-17, UBC-18, and UBC-51. Pita monomorfik

dihasilkan primer OPA-12 dan primer OPD-07 dengan jumlah pita masing-masing 1 dan 5, sedangkan primer OPX-13 dan OPX-16 menghasilkan pita DNA *smear*.

Jumlah pita DNA polimorfik berkisar antara 1-8 dengan ukuran fragmen DNA berkisar 150-500 bp. Pada Gambar 10a menampilkan pita DNA polimorfik paling banyak dihasilkan pada primer OPX-07 sebanyak 8 dengan kualitas pita yang jelas. Primer OPA-17 dan OPC-17 menghasilkan pita polimorfik namun kualitas pita yang kurang jelas (Gambar 10b). Pita monomorfik dihasilkan primer OPA-12 dengan ukuran alel yang sama dengan sampel lainnya yaitu 250 bp (Gambar 10c). Primer OPX-13 dan OPX-16 menghasilkan fragmen DNA kurang jelas dan terbentuk *smear* (Gambar 10d).



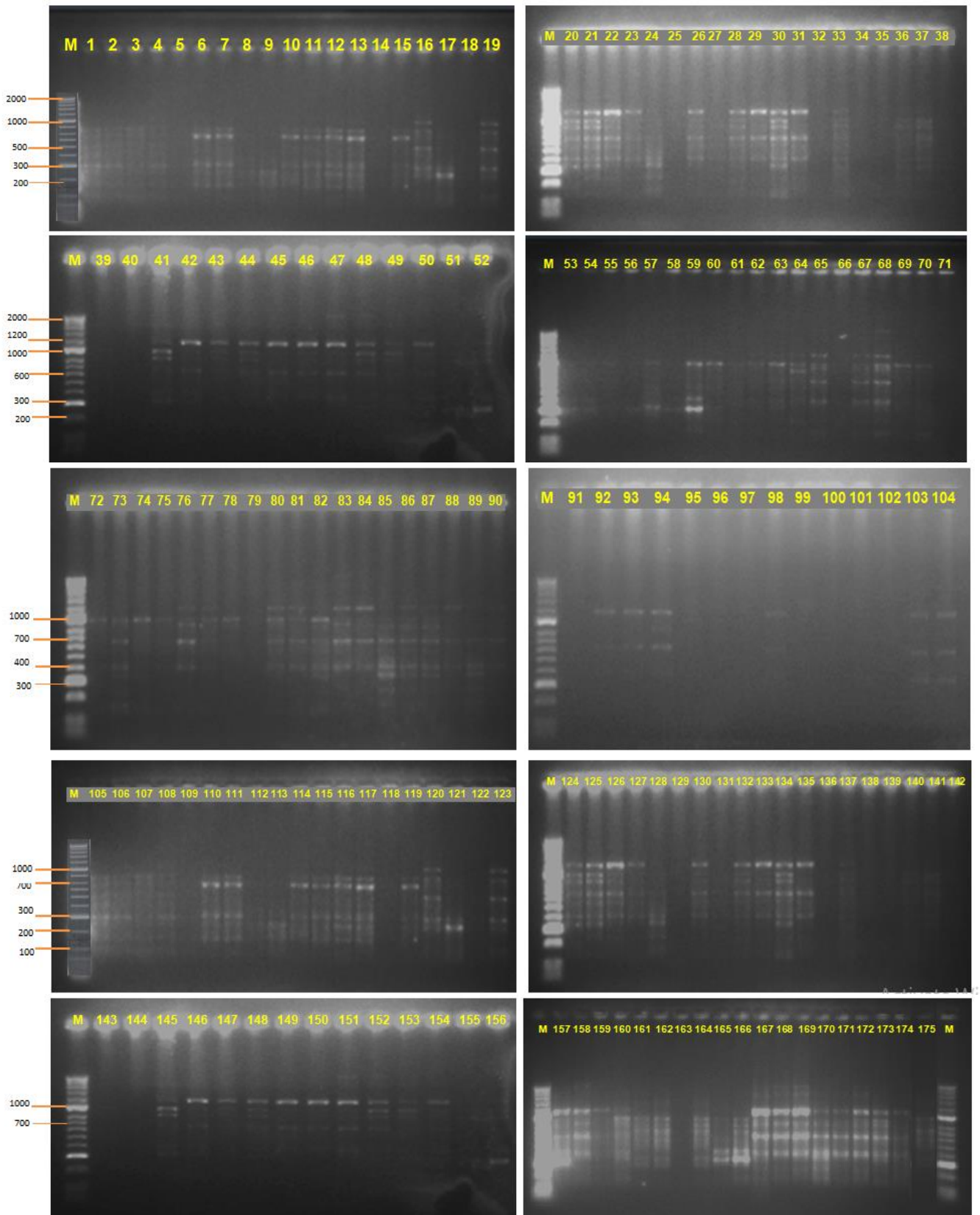
Gambar 10. Elektroforegram hasil amplifikasi seleksi primer. a) Amplifikasi DNA jeruk menggunakan primer OPX-07; b) Amplifikasi DNA jeruk pada primer OPC-17; c) Amplifikasi DNA pada primer OPA-12; d) Amplifikasi DNA jeruk menggunakan primer OPX-13. M=marker; 1=selayar biji (SB); 2=JC-selayar (JS); 3=selayar-selayar (SS); 4=JC; 5=pamelo merah (M); 6=pamelo putih (P); 7=pamelo gula-gula (G); 8=dekopon (D); 9=siam (SI); 10=santang madu (SM); 11=keprok batu (B); 12= nipis (N).

2.4.3c Analisis RAPD

Primer yang digunakan sebanyak 19 merupakan primer hasil seleksi (Tuwo et al., 2021) yang dapat dilihat pada Tabel 9. Total 132 fragmen teramplifikasi dari 19 primer yang digunakan, dimana semua fragmen DNA yang dihasilkan merupakan polimorfik. Masing-masing primer menghasilkan 6.95 fragmen teramplifikasi, minimum dihasilkan 2 pada primer OPC-17 dan maksimum 12 pada primer OPH-15 (Gambar 11). Ukuran produk amplifikasi berkisar 200-2000 bp. Nilai *Polymorphic Information Content* (PIC) berkisar 0.143 pada primer OPX-11 hingga 0.388 pada primer OPH-04 dengan rata-rata 0.271.

Tabel 9. Hasil analisis RAPD

Primer	Primer sequences (5'-3')	Ta (°C)	Fragment size (bp)	Number of band	Number of fragment polymorphic	% fragment polymorphic	PIC
OPA-05	AGG GGT CTT G	35.4	400-1100	12	1	8%	0.220
OPA-09	GGG TAA CGC C	35.6	200-1100	12	3	25%	0.330
OPA-17	TCG GCG ATA G	40.2	100-1100	9	4	44%	0.249
OPC-09	GAC CGC TTG T	35.6	300-1000	11	4	36%	0.451
OPC-17	CTC ACC GTC C	40.2	300-500	10	4	40%	0.352
OPE-04	GTG ACA TGC C	30.4	400-1300	12	1	8%	0.378
OPH-04	GGA AGT CGC C	40.3	250-1600	12	4	33%	0.388
OPH-15	AAT GGC GCA G	35.4	200-1200	12	5	42%	0.196
OPN-14	TCG TGC GGG T	43.8	200-1800	11	7	64%	0.258
OPN-16	AAG CGA CCT G	34.5	250-1100	12	3	25%	0.291
OPR-08	CCA TTC CCC A	33.8	300-2000	11	6	55%	0.192
OPR-20	TCG GCA CGC A	45.1	250-1200	12	3	25%	0.178
OPW-06	AGG CCC GAT G	37.6	250-1400	12	3	25%	0.274
OPW-09	GTG ACC GAG T	37.6	200-700	12	4	33%	0.220
OPX-07	GAG CGA GGC T	41.2	200-1600	12	8	67%	0.288
OPX-11	GGA GCC TCA G	36.0	350-1000	12	4	33%	0.143
OPX-17	GAC ACG GAC C	36.2	350-1000	12	2	17%	0.350
UBC-18	GGG CCG TTT A	32.3	350-1000	12	6	50%	0.198
UBC-51	CTA CCC GTG C	41.3	200-1500	12	6	50%	0.188
Total				220	78		
Rata-rata						36%	0.271



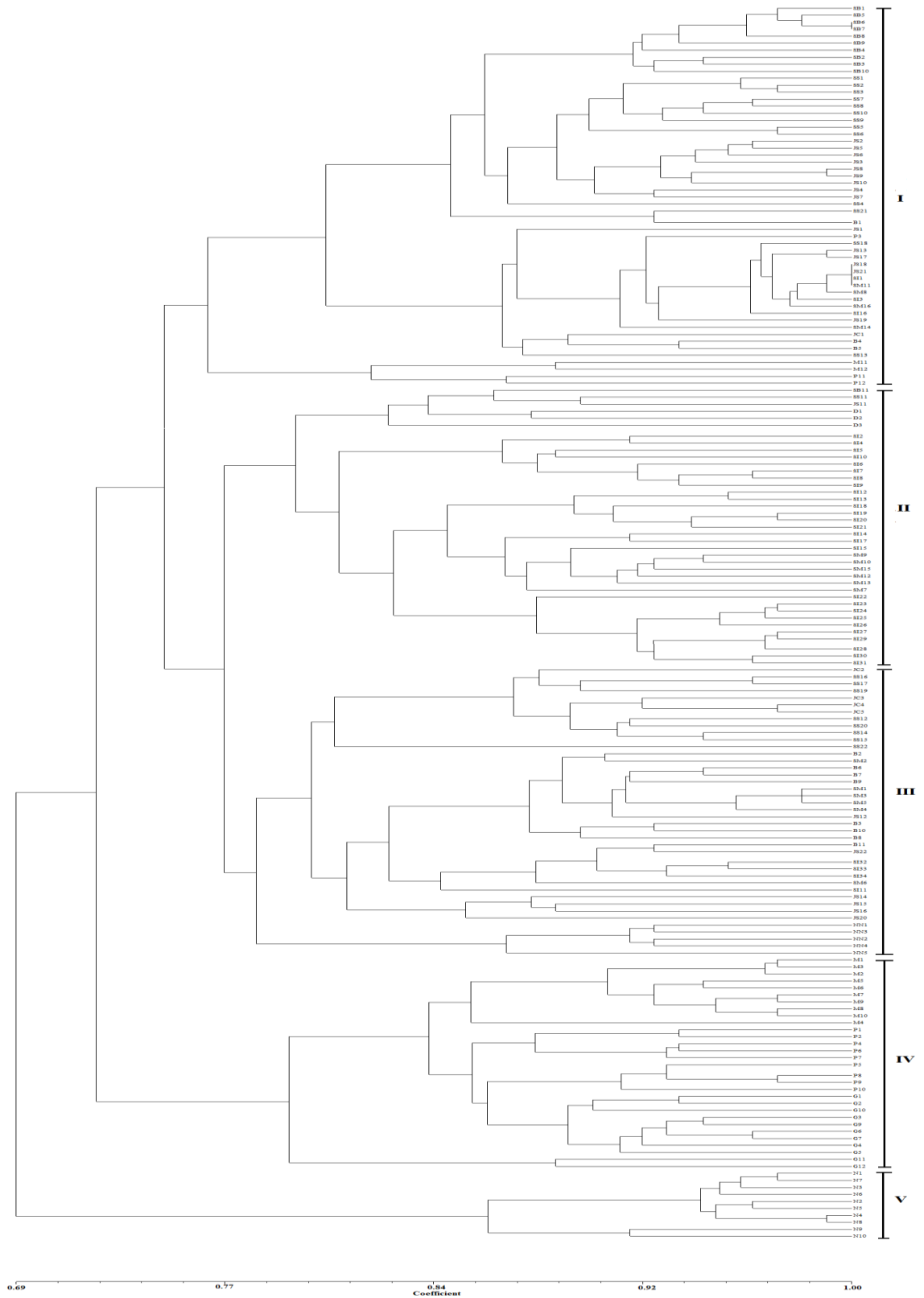
Gambar 11. Pola pita RAPD pada 175 sampel jeruk dengan primer OPA-15. M=marker; 1-10 = Selayar Biji (SB); 11-20 = Selayar-Selayar (SS); 21-30 = JC-Selayar (JS); 31-40 = Pamelu Merah (M); 41-50 = Pamelu Putih (P); 51-60 = Pamelu Gula-gula (G); 61-70 = *Japanche Ctroen* (JC); 71-90 = Keprok Batu (B); 91-110 = Siam (SI); 111-130 = Nipis (N); 131-140 = Purut (NN); 141-160 = Santang Madu (SM); 161-175 = Dekopon (D).

Keragaman genetik dapat dilihat berdasarkan nilai heterozigositas. Nilai heterozigositas merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mengukur tingkat keragaman genetik dalam suatu populasi. Adapun rata-rata nilai heterozigositas (H_e) adalah 0.236 (Tabel 10). Nilai heterozigositas tertinggi diperoleh pada jenis M yaitu 0.299 dan terendah diperoleh pada jenis JS yaitu 0.167. Nilai H_e dari masing-masing populasi varietas jeruk cukup beragam dengan kisaran 0.167-0.299. Rata-rata nilai heterozigositas populasi jeruk sebesar 0.236.

Hasil analisis kluster 175 genotip varietas jeruk menggunakan 19 primer dapat dilihat pada gambar 12. Pada tingkat kesamaan 0.69, seluruh genotip jeruk yang dianalisis dapat dipisahkan ke dalam 2 kelompok utama. Kelompok 1 dapat dibagi lebih lanjut ke dalam sub-kelompok dengan jarak genetik berbeda. Berdasarkan jarak genetik pada koefisien kesamaan genetik 0.77 membagi 5 kelompok yang mempunyai hubungan genetik terpisah. Kelompok 1 terdiri dari 54 genotip (SB, SS, JS, B, P, JSI, SI, SM, JC, M), kelompok 2 terdiri dari 40 genotip (SB, SS, JS, D, SI, MSI, SI, SM), kelompok 3 terdiri dari 41 genotip (JC, SS, B, SM, JS, NN), kelompok 4 terdiri dari 30 genotip (M, P, G), dan kelompok 5 terdiri dari 10 genotip (N) (Tabel 11).

Tabel 10. Hasil pengukuran nilai heterozigositas

No.	Kode Sampel (Varietas)	Heterozigositas (H_e)
1	SB (Selayar Biji)	0.204
2	SS (Selayar-Selayar)	0.202
3	JS (JC-Selayar)	0.167
4	M (Pamelo Merah)	0.299
5	P (Pamelo Putih)	0.268
6	G (Pamelo Golla-Golla)	0.290
7	JC (Jeruk JC)	0.211
8	SM (Santang Madu)	0.195
9	B (Keprok Batu)	0.233
10	SI (Siam)	0.229
11	N (Nipis)	0.268
12	NN (Purut)	0.289
13	D (Dekopon)	0.212
Rata-rata		0.236



Gambar 12. Dendrogram yang dihasilkan dari analisis kluster UPGMA pada 175 genotip varietas jeruk. Skala yang ditunjukkan pada bagian bawah adalah perhitungan kesamaan genetik.

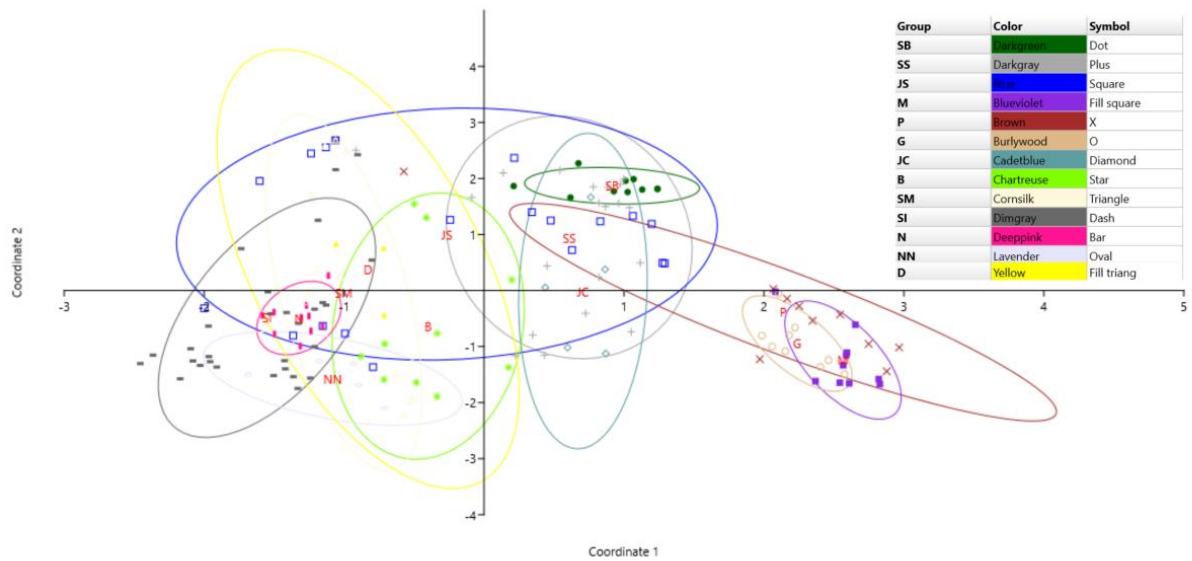
Tabel 11. Pengelompokan 175 genotip varietas jeruk pada koefisien kesamaan genetik 70%

Klaster	Genotip
I	SB1, SB5, SB6, SB7, SB8, SB9, SB4, SB2, SB3, SB10, SS1, SS2, SS3, SS7, SS8, SS10, SS9, SS5, SS6, JS2, JS5, JS6, JS3, JS8, JS9, JS10, JS4, JS7, SS4, SS21, B1, JS1, P3, SS18, JSI3, JSI17, JSI18, JSI21, SI1, SM11, SM8, SI3, SM16, SI16, JSI9, SM14, JC1, B4, B5, SS13, M11, M12, P11, P12
II	SB11, SS11, JS11, D1, D2, D3, SI2, SI4, SI5, SI10, SI6, SI7, SI8, SI9, SI12, SI13, SI18, SI19, MSI9, SI20, SI21, SI14, SI17, SI15, SM9, SM10, SM15, SM12, SM13, SM7, SI22, SI23, SI24, SI25, SI26, SI27, SI29, SI28, SI30, SI31
III	JC2, SS16, SS17, SS19, JC3, JC4, JC5, SS12, SS20, SS14, SS15, SS22, B2, SM2, B6, B7, B9, SM1, SM3, SM5, SM4, JS12, B3, B10, B8, B11, JS22, SI32, SI33, SI34, SM6, SI11, JS14, JS15, JS16, JS20, NN1, NN2, NN3, NN4, NN5
IV	M1, M3, M2, M5, M6, M7, M9, M8, M10, M4, P1, P2, P4, P6, P7, P5, P8, P9, P10, G1, G2, G10, G3, G9, G6, G7, G4, G5, G11, G12
V	N1, N7, N3, N6, N2, N5, N4, N8, N9, N10

Keterangan:

SB=selayar biji; SS=selayar-selayar; JS=JC-selayar; JC=*Japansche citroen*; M=pamelo merah; P=pamelo putih; G=pamelo gula-gula; B=keprok batu; SI=siam; SM=santang madu; D=dekopon; N=nipis; NN=purut.

Analisis koordinat utama (*Principal Coordinate Analysis/ PCoA*) merupakan analisis yang digunakan untuk mengetahui kedekatan individu berdasarkan kemiripan karakter melalui penyederhanaan dimensi. Pada Gambar 13 menampilkan hasil analisis koordinat utama yang berasal dari data biner RAPD. Analisis PCoA menghasilkan genotip jeruk mengelompok berdasarkan jenisnya pada varietas jeruk pamelo merah (M), putih (P) dan gula-gula (G) serta varietas jeruk nipis (N). Hal ini berarti masing-masing varietas jeruk berbeda dengan yang lainnya. Kelompok pamelo memiliki keragaman yang tinggi dibandingkan dengan varietas lainnya, hal ini terlihat dari kedudukan sebaran titik pada kelompok tanaman yang lebih menyebar jika dibandingkan dengan kelompok varietas lainnya yang cenderung menggerombol.



Gambar 13. Hasil analisis koordinat utama PCoA (*Principal Coordinates Analysis*) terhadap 175 genotip tanaman jeruk.

2.5 Pembahasan

2.5.1 Karakter Fenotip

Hasil analisis fenotip 13 varietas tanaman jeruk terlihat ada kesamaan dan perbedaan karakter yang sama antarvarietas. Karakter fenotip yang sama adalah habitus tanaman jeruk umumnya pohon dengan arah tumbuh batang tegak lurus ke atas (*erectus*), percabangan pada batang simpodial (batang pokok sukar ditentukan), arah tumbuh cabang tegak (*fastigiatus*) sudut antara batang dan cabang amat kecil yang hampir sejajar dengan batang pokok, perlekatan helaian daun adalah *brevipetiolate* (tangkai daun lebih pendek dari helaian daun), susunan tulang-tulang daun menyirip (*penninervis*), daging daun seperti kertas tipis (*papyraceus/ chartaceus*), warna daun hijau tua, permukaan daun licin (*laevis*) mengkilat (*nitidus*), tata letak daun pada batang 1/3 yaitu daun tunggal tersebar (*folia sparsa*). Karakter fenotip yang berbeda terdapat pada karakter bentuk pohon dan daun (bentuk daun, ujung daun, pangkal daun, tepi daun, ada tidaknya sayap pada tangkai daun, dan lebar sayap pada tangkai daun).

Hasil karakter fenotip dari 13 varietas tanaman menampilkan beberapa karakter yang sama dan juga terdapat beberapa karakter yang berbeda. Daun merupakan bagian vegetatif tanaman yang paling tinggi keragamannya. Untuk pelepasan varietas tanaman, morfologi daun merupakan bagian pengamatan penting bagi tanaman buah-buahan tahunan termasuk tanaman jeruk seperti bentuk daun, tipe daun, sifat torehan, ujung daun, belahan daun, warna daun, tipe daun, dan ukuran daun (Direktorat Jendral Hortikultura, 2006).

Perbedaan karakter fenotip yang tampak pada spesies yang berbeda disebabkan oleh keragaman genotipnya. Perbedaan genetik ini tidak hanya nampak antarspesies, bahkan di dalam satu spesies juga terdapat keragaman gen. Dengan adanya keragaman gen inilah sifat-sifat di dalam satu spesies bervariasi yang dikenal dengan istilah varietas bahkan sampai pada asesi (Aviarganugraha, 2012). Perbedaan karakter juga dipengaruhi oleh faktor eksternal seperti lingkungan sekitar dan tempat tumbuhnya tanaman tersebut. Fenotip merupakan hasil interaksi antara genotip dan lingkungan, fenotip digunakan untuk mendeteksi adanya keragaman tanaman secara morfologi (Fatmawati, dkk., 2017). Lingkungan merupakan salah

satu faktor utama dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang menyebabkan jenis tanaman yang sama dapat berpeluang mengalami perbedaan tampilan morfologis hingga fisiologis. Faktor lingkungan menentukan keragaman dari suatu populasi tanaman pada sebuah daerah, ketinggian, curah hujan, dan kelembaban (Ismail, 2004; Rezkianti et al., 2016).

Berdasarkan hasil analisis klaster dari karakter fenotip, dendrogram menampilkan sub-klaster 1.1 dan sub-klaster 1.2 memiliki kemiripan 75%. Sub-klaster 1.1 terdiri dari selayer biji (SB), purut (NN), JC-selayer (JS), selayer-selayer (SS), keprok batu (B), *Japansche citroen* (JC), dan dekopon (D). Sub-klaster 1.2 terdiri dari varietas siam (SI) dan santang madu (SM). Hal ini berarti varietas dari dua sub-klaster memiliki banyak persamaan karakter, persamaan tersebut antara lain bentuk batang, arah tumbuh batang, percabangan pada batang, arah tumbuh cabang, perlekataan helaian daun, bentuk daun, pangkal daun, susunan tulang daun, tepi daun, daging daun, warna daun, permukaan daun, dan tata letak daun.

2.5.2 Karakter Anatomi

Hasil pengamatan anatomi menampilkan letak stomata hanya dijumpai pada permukaan bawah (abaxial). Jumlah stomata yang lebih banyak pada permukaan bawah daun merupakan suatu mekanisme adaptasi pohon terhadap lingkungan, sehingga mengurangi transpirasi (Larcher, 1995). Indeks stomata, panjang dan lebar stomata menunjukkan variasi antarvarietas. Hal ini disebabkan oleh faktor eksternal seperti pencahayaan, suhu, kelembaban dan air (Adelina, dkk., 2017). Jumlah dan ukuran stomata dipengaruhi oleh genotip dan lingkungan. Sel-sel penutup yang mengelilingi stomata mengendalikan pembukaan dan penutupan stomata. Penutupan stomata penting untuk mencegah kehilangan air pada waktu persediaan air terbatas sekaligus membatasi pengambilan CO₂ untuk fotosintesis. Stomata membuka pada waktu siang hari dan menutup pada waktu malam hari. Proses membuka dan menutup stomata dipengaruhi oleh tekanan turgor pada sel penutup. Bertambah dan berkurangnya ukuran *aperture* sel penjaga adalah akibat dari perubahan tekanan turgor pada sel penjaga. Indeks stomata rendah umumnya memiliki transpirasi rendah sehingga dapat tumbuh di lahan kering, dan memiliki tingkat ketahanan lebih baik terhadap kekeringan (Sumadji dan Purbasari, 2018).

Berdasarkan hasil analisis klaster dari karakter anatomi, dendrogram menampilkan sub-klaster 1 dan sub-klaster 2 memiliki kemiripan 79%. Sub klaster 1 terdiri dari varietas *Japanshe citroen* (JC) dan santang madu (SM), sedangkan sub-klaster 2 terdiri dari varietas dekopon (D), siam (SI), nipis (N) dan purut (NN). Sub-klaster 1 dan sub-klaster 2 memiliki persamaan pada tipe sel epidermis atas dan bawah segi 4-6 agak beraturan, dinding sel epidermis atas dan bawah agak berlekuk-lurus, dan penyebaran stomata tipe potato (SM, D, SI, N, NN) dan tipe apel (JC, D).

2.5.3 Kualitas dan Kuantitas DNA

Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) merupakan unsur yang cukup esensial dalam riset molekuler. Teknik isolasi yang tepat sangat menentukan kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan. Proses isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen seluler lainnya seperti protein, RNA, dan lemak. Pada dasarnya beberapa metode isolasi DNA memiliki prinsip yang sama, namun dapat dilakukan modifikasi untuk menghancurkan inhibitor yang ada di dalam masing-masing sumber spesimen. Optimasi prosedur tersebut dapat dilakukan terhadap suhu dan lama inkubasi yang digunakan dalam proses isolasi DNA (Langga et al., 2012).

Isolasi DNA dilakukan mengikuti prosedur Geneaid Genomic DNA Mini Kit. Prosedur ini terdiri dari lima tahap. Tahap pertama adalah disosiasi jaringan dengan menggerus sampel daun jeruk hingga menjadi serbuk halus. Tahap ini bertujuan menghancurkan dinding sel dan melepaskan komponen seluler. Tahap kedua adalah lisis dengan *buffer* ekstraksi (GP1 dan GP2). *Buffer* GP2 berfungsi sebagai *buffer* penetral. Proses ini menghancurkan membran sel ke dalam *buffer* ekstraksi yang umumnya berhasil dengan menggunakan deterjen seperti

sodium dodecyl sulphate (SDS) atau *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB). Sel tanaman dilindungi oleh membran dan dinding sel. Membran sel terdiri dari ikatan antara protein dan lemak, sedangkan dinding sel tersusun atas polisakarida. Membran dan dinding sel harus dihancurkan untuk mengeluarkan DNANYa. Penghancuran sel dapat dilakukan secara mekanik, kimiawi maupun enzimatik. Proses penghancuran sel dipengaruhi oleh kuantitas dan kualitas sampel serta teknik penghancurannya (Fernih, 2013).

Larutan yang diperoleh pada tahap kedua selanjutnya divorteks untuk menghomogenkan larutan kemudian dilakukan sentrifugasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal, sehingga substansi yang lebih berat berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan terletak di atas (Faatih, 2009). DNA pada saat sentrifugasi akan berada pada pelet, sehingga pada proses ini bagian pelet diambil, sedangkan supernatannya dibuang (Farmawati, dkk., 2015). Tahap ketiga adalah pengikatan DNA dengan buffer GP3 yang terlebih dahulu ditambahkan isopropanol. Bufer GP3 berfungsi mengikat DNA ke *buffer* serta *spin column*, isopropanol berfungsi untuk mengendapkan DNA. Tahap keempat adalah pencucian dengan larutan W1 *buffer*, untuk menghilangkan sisa-sisa protein yang menempel pada DNA dan juga mencuci garam-garam *buffer* sebelumnya. Tahap kelima adalah elusi DNA dengan menggunakan *buffer* elusi atau TE (Tris-EDTA) yang bertujuan untuk melarutkan kembali DNA untuk dipreservasi. DNA yang diisolasi juga harus dilindungi dari nuklease endogen, sehingga EDTA umumnya disertakan dalam *buffer* ekstraksi ion magnesium, kofaktor yang diperlukan untuk nuklease. Isolasi DNA seringkali mengandung sejumlah besar RNA, protein, dan polisakarida yang dapat mengganggu proses ekstraksi dan sulit untuk dipisahkan. Sebagian besar protein dihilangkan dengan cara denaturasi dan presipitasi dari ekstrak dengan kloroform. RNA biasanya dihilangkan dengan cara perlakuan ekstrak dengan RNase yang dipanaskan (Poerba dan Widjaya, 2009).

Hasil dari uji kualitas DNA menentukan langkah selanjutnya untuk tahapan PCR. Kualitas DNA yang diperoleh cukup baik ditandai dengan tidak adanya fragmen-fragmen *smear* yang hadir di bawah fragmen utama. Fragmen-fragmen *smear* merupakan kumpulan potongan-potongan DNA pendek terbentuk pada saat isolasi. Fragmen DNA muncul pada semua sampel, meskipun memiliki ketebalan yang bervariasi. Ketebalan fragmen yang berbeda menyebabkan perbedaan konsentrasi DNA. Fragmen DNA yang tebal dan padat menunjukkan DNA dengan konsentrasi tinggi dan integritas yang baik. Pada beberapa sampel terlihat kualitas dengan fragmen DNA tipis, tetapi proporsi DNA dengan fragmen utama masih terlihat sangat jelas pada sebagian besar sampel. Dengan demikian, DNA tergolong baik untuk digunakan pada analisis selanjutnya. Kualitas DNA yang baik juga didukung oleh kuantitas DNA dengan konsentrasi tinggi rata-rata 39.93-85.20 ng/ μ g (Tabel 7). Jumlah ini dianggap sangat mencukupi sebagai material untuk kegiatan analisis kekerabatan berbasis PCR yang akan dilakukan selanjutnya. Konsentrasi DNA yang disarankan adalah 10 ng hingga 1 μ g per μ l untuk reaksi PCR (Sambrook dan Russell, 2001). Beberapa teknik dan prosedur isolasi DNA telah dipublikasikan, namun tidak selalu dapat diaplikasikan pada jenis bahan tanaman yang berbeda karena genus atau bahkan spesies tanaman bersifat sangat spesifik, sehingga modifikasi metode standar diperlukan dalam mengisolasi DNA (Dewi Retnaningati, 2020).

2.5.4 Seleksi Primer

Primer yang digunakan sangat penting untuk dapat membedakan varietas atau kultivar suatu spesies dalam analisis keragaman genetik. Oleh karena itu, seleksi primer merupakan langkah penting dalam analisis genetik. Konsentrasi primer yang optimal untuk amplifikasi DNA spesies tanaman yang berbeda tergantung pada jenis primer dan spesies tanaman. Pemilihan primer dan jumlah primer yang digunakan untuk mengamplifikasi cetakan DNA akan sangat penting untuk menghasilkan pita polimorfik karena pemilihan ini dapat menentukan penempelan primer ke urutan komplementer dari cetakan DNA (Tingey et al.,

1994). Polimorfisme RAPD adalah hasil dari perubahan basa nukleotida yang mengubah situs pengikatan primer, penyisipan atau penghapusan dalam daerah amplifikasi (Williams et al., 1990). Polimorfisme biasanya ditandai dengan ada atau tidak adanya produk amplifikasi dari satu lokus (Tingey et al., 1994). Perbedaan polimorfisme mungkin disebabkan oleh perbedaan jumlah variasi genetik yang ada di antara aksesori yang berbeda.

Pada penelitian ini, seleksi primer dilakukan terhadap 23 primer. Seleksi primer dilakukan untuk menentukan suhu penempelan yang tepat untuk memilih primer polimorfik (Larekeng, 2020) dan merupakan langkah dasar untuk studi molekuler terutama dalam analisis keragaman genetik (Gusmiaty, dkk., 2021). Salah satu faktor terpenting yang mempengaruhi kualitas PCR adalah kualitas primer. Secara umum, semakin lama produk PCR semakin sulit untuk memilih primer yang efisien dan semakin banyak informasi urutan DNA yang tersedia, semakin baik peluang untuk menemukan pasangan primer yang optimal (Rychlik, 1995). Hasil seleksi primer menghasilkan 19 primer polimorfik dengan fragmen DNA terlihat jelas, sebanyak dua primer diantaranya menghasilkan fragmen DNA kurang jelas. Dua primer monomorfik dan dua primer lainnya membentuk *smear*. Fragmen *smear* diakibatkan oleh adanya penumpukan beberapa fragmen DNA berbeda ukuran tetapi tidak terlalu besar, sehingga saling tumpang tindih secara kontinu. Dengan demikian, sulit dibedakan perbedaan ukuran masing-masing fragmen DNA (Jumsari, dkk., 2007). Menurut Larekeng et al. (2019), alel polimorfik yang diamati pada masing-masing primer pada setiap sampel berbeda ukuran dan jumlahnya, dimana alel polimorfik adalah alel yang dapat membedakan individu. Primer yang menghasilkan pita jelas dan terang dapat digunakan dalam analisis selanjutnya. Primer polimorfik dibutuhkan dalam analisis keragaman genetik tanaman yang memperlihatkan keragaman pola pita yang dihasilkan dari proses amplifikasi (Gusmiaty, dkk., 2021).

Primer OPX-07 menghasilkan paling banyak pita polimorfik sebanyak delapan. Ini berarti bahwa primer tersebut memiliki pasangan basa komplementer dengan DNA genom sehingga memiliki lebih banyak tempat perlekatan (Salamena et al., 2018). Primer OPA-05 dan primer OPE-04 menghasilkan hanya satu pita polimorfik. Jumlah pita dapat berbeda antara primer pada setiap sampel yang disebabkan oleh perbedaan sekuens primer dan sampel DNA. Setiap urutan primer memiliki situs penempelan spesifik dalam genom. Lebih banyak situs penempelan homolog dari primer dalam genom sampel, lebih banyak fragmen DNA akan dihasilkan (Wen et al., 2014; Larekeng 2019; Mustafa, dkk., 2020). Selain polimorfisme, kualitas fragmen DNA juga merupakan faktor penting dalam pemilihan primer. Primer yang menghasilkan fragmen DNA tidak jelas tidak digunakan dalam analisis keragaman genetik, karena dapat salah dalam menginterpretasikan data (William et al., 1990; Larekeng, 2019).

2.5.5 Analisis RAPD

Aplikasi marka molekuler menjadi strategi yang tepat untuk menganalisis keragaman genetik spesies dan varietas jeruk. Penanda molekuler seperti RAPD telah digunakan secara luas dalam karakterisasi plasma nutfah, studi keragaman genetik, sistematis dan analisis filogenetik (Weising et al., 2005). RAPD telah terbukti cukup efisien dalam mendeteksi variasi genetik (Williams et al., 1990). Untuk tujuan identifikasi keragaman genetik, primer yang digunakan sangat penting untuk dapat membedakan kultivar atau varietas spesies (Poerba dan Ahmad, 2010). Amplifikasi total genom DNA jeruk dari 175 genotip telah dilakukan menggunakan 19 primer (Gambar 9). Setiap primer menghasilkan jumlah fragmen DNA yang berbeda. Fragmen yang muncul memiliki ukuran basa dan intensitas fragmen yang bervariasi. Perbedaan intensitas fragmen DNA dipengaruhi oleh sebaran situs penempelan primer pada genom, kemurnian dan konsentrasi genom dalam reaksi. Banyaknya fragmen yang dihasilkan oleh setiap primer tergantung pada sebaran situs yang homolog pada genom (Williams et al., 1990). Adanya perbedaan pola fragmen DNA (jumlah dan ukuran) menggambarkan adanya genom tanaman yang sangat kompleks (Grattapaglia et al., 1992).

Penanda genetik meskipun banyak dan baru dikembangkan, namun penggunaan RAPD sebagai penanda genetik masih menjadi pilihan untuk memperkirakan status keragaman genetik secara cepat. Fitur terpenting dari teknik RAPD adalah deteksi polimorfisme tinggi (Al-Janabi, 2016). Hasil penelitian diperoleh persentase fragmen DNA polimorfik sebesar 36%. Hal ini menunjukkan bahwa penanda RAPD yang digunakan memiliki tingkat polimorfisme sedang (30-60%) (Yazidi et al., 2015; Tawfik et al., 2019; Slameto, 2023). Profil RAPD menunjukkan bahwa setiap primer dapat menghasilkan fragmen DNA utama (*strong band*) yang dapat digunakan sebagai penanda RAPD untuk mendeteksi perbedaan di antara 13 varietas. Pita polimorfik dapat menggambarkan keadaan genom tanaman, semakin banyak pita polimorfik, semakin tinggi keragaman genetiknya (Primrose dan Twyman, 2006).

Keberhasilan suatu primer dalam mengamplifikasi DNA cetakan ditentukan oleh ada tidaknya homologi sekuen nukleotida primer dengan sekuen nukleotida cetakan. Faktor lain yang juga mempengaruhi adalah kuantitas dan kualitas DNA, konsentrasi $MgCl_2$, enzim *Taq DNA polymerase*, serta suhu perlekatan (Wibowo, 2010). Kualitas penanda RAPD dievaluasi melalui nilai PIC. Primer RAPD menghasilkan nilai PIC 0.143 sampai 0.388, artinya semua primer yang digunakan pada penelitian ini sesuai untuk karakterisasi genetik jeruk. Klasifikasi PIC menurut Botstein et al. (1980), sangat informatif jika $PIC > 0.5$; cukup informatif jika $0.5 > PIC > 0.25$ dan sedikit informatif jika $PIC < 0.25$. Penanda RAPD dapat direkomendasikan untuk digunakan dalam program pemuliaan jeruk. Sampai saat ini, RAPD masih digunakan secara luas untuk menilai keragaman genetik pada berbagai spesies tanaman (Marwa hamouda, 2019; Mazumder et al., 2020; Siti Samiyarsih et al., 2020; Abdul Rehman et al., 2021; Sri Ramadiana et al., 2021; Pangestika et al., 2021; Wangiyana et al., 2022). Pada tanaman jeruk, penanda RAPD telah digunakan untuk identifikasi varietas, pemetaan dan penilaian keragaman genetik serta program pemuliaan lainnya (Bidisha et al., 2013). Aplikasi RAPD terbukti dalam mengkarakterisasi varietas jeruk yang dapat memisahkan dan membedakan setiap varietas satu sama lain (Al-Janabi, 2016). Pemanfaatan RAPD berhasil dalam menganalisis hubungan filogenetik dan keragaman genetik antarvarietas jeruk (K. Shahzadi et al., 2016).

Penanda DNA yang populer digunakan untuk mengungkap keragaman genetik dan hubungan kekerabatan adalah penanda RAPD dan juga merupakan salah satu dari banyak teknik yang digunakan dalam penelitian biologi molekuler. RAPD dianggap sebagai penanda DNA sederhana karena perancangannya tidak diperlukan informasi sebelumnya dari data sekuens DNA (Hisada et al., 1997), simpel dalam preparasinya (Abbas et al., 2009), cepat, mudah untuk dianalisis, mudah didistribusikan ke seluruh genom (Sarwat et al., 2008), dan dapat dilakukan pada setiap tahap perkembangan tanaman (Fernandez et al., 2006). Selain itu, tingkat kemurnian DNA yang dibutuhkan tidak perlu terlalu tinggi dengan kata lain teknik ini toleran terhadap tingkat kemurnian (Prana et al., 2003). Penanda RAPD merupakan penanda molekuler yang efektif dan andal untuk penilaian keakuratan variasi genetik (Bidyaleima, dkk., 2019). RAPD menghasilkan jumlah lokus genetik yang lebih banyak dibandingkan markah fenotip dan biokimia (Yonemoto et al., 2006). Salah satu kelemahan penanda RAPD adalah reproduibilitasnya yang rendah (Jones et al., 1997). Namun, hal ini dapat diminimalkan dengan mengoptimalkan kondisi PCR, reproduibilitas primer yang terseleksi diuji dengan mengulang amplifikasi PCR sebanyak dua kali di bawah kondisi amplifikasi yang sama (Poerba dan Widjaya, 2009), memilih primer yang sesuai (Aminah et al., 2017), dan ekstraksi yang optimal (Arianto et al., 2018).

2.5.6 Keragaman Genetik

Salah satu parameter yang digunakan untuk mengetahui keragaman genetik adalah variasi genetik atau nilai heterozigositas (H_e) (Finkeldey, 2005). Keragaman genetik tertinggi terdapat pada populasi jeruk varietas pameloma merah (M) dengan nilai H_e 0.299. Keragaman genetik terendah terdapat pada populasi santang madu (SM) dengan H_e sebesar 0.195. Hal ini

kemungkinan disebabkan karena populasi SM berasal dari induk yang sama. Keragaman genetik yang rendah diperkirakan dapat berdampak negatif terhadap kelangsungan hidup spesies dan hal ini menjadi perhatian utama kegiatan konservasi (Milot et al., 2007).

Adapun rata-rata nilai H_e pada total genotip yang diuji sebesar 0.236. Dominan marker seperti RAPD hanya dapat memproduksi dua alel pada masing-masing lokus. Sehingga, nilai H_e maksimum adalah 0.5 (Weising, 2005). Berdasarkan hasil analisis nilai H_e , keragaman genetik jeruk di Sulawesi Selatan tergolong sedang. Sesuai kriteria nilai H_e jika nilai $H_e > 0.30$ tergolong tinggi, nilai H_e antara 0.20-0.30 tergolong sedang, dan jika nilai $H_e < 0.20$ tergolong rendah (Na'iem, 2001). Suatu populasi dengan keragaman genetik yang tinggi memiliki kemampuan untuk mempertahankan diri dari penyakit dan perubahan iklim yang ekstrim, dengan demikian, populasi tersebut dapat hidup dalam kondisi yang berkelanjutan selama beberapa generasi (Larekeng, 2020). Tingginya keragaman genetik pada populasi pamelu merah (M) kemungkinan dipengaruhi oleh jumlah individu per populasi yang tinggi dibandingkan dengan lokasi lainnya (Wahyudi Arianto et al., 2018). Tingginya keragaman juga diduga karena terjadinya kecenderungan kawin silang dan penyerbukan dibantu oleh agen pollinator yang berperan besar terhadap keberhasilan penyerbukan. Pada kondisi tersebut peluang terjadinya *inbreeding* menjadi lebih kecil. Perkawinan silang (*outcrossing*) dapat menyebabkan terjadinya pencampuran materi genetik dari satu pohon induk dengan pohon induk lainnya (Hamrick dan Godt, 1989; Kinho, dkk., 2016).

Populasi dengan keragaman genetik yang tinggi sangat berharga karena menyediakan kumpulan gen yang beragam untuk konservasi genetik dan program pemuliaan tanaman (Zulfahmi et al., 2021). Menurut Azman, dkk., (2020) bahwa populasi yang memiliki keragaman genetik tinggi dapat disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu i) keragaman genetik sudah tinggi sejak awal populasi terbentuk, ii) populasi belum banyak terganggu oleh aktivitas manusia, sehingga kondisinya lebih terjaga, dan iii) terjadinya perkawinan acak antarindividu yang mengakibatkan rekombinasi genetik dan peningkatan keragaman genetik dalam populasi. Sebaliknya, keragaman genetik rendah pada populasi menunjukkan bahwa populasi tersebut berada dalam kondisi terancam, terfragmentasi, dan rusak oleh aktivitas manusia. Keragaman genetik suatu tanaman menjadi dasar bagi pemulia tanaman untuk mendeteksi plasma nutfah dengan tujuan perbaikan sifat, analisis viabilitas, kemurnian *rootstock* yang dapat meningkatkan kualitas dan kuantitas produksi buah (Li et al., 2010).

Pemahaman hubungan filogenetik dan variabilitas genetik memegang peranan penting dan kunci dalam menentukan kekerabatan, karakterisasi plasma nutfah dan penetapan program pemuliaan jeruk (Herrero et al., 1996). Analisis hubungan kekerabatan bertujuan untuk mengelompokkan (*clustering*) antarpopulasi tanaman berdasarkan karakter yang sama untuk mengetahui kekerabatan yang jauh atau dekat (Azizah, dkk., 2019). Untuk menentukan hubungan genetik antara 13 varietas jeruk, data skoring digunakan untuk menghitung matriks kesamaan yang selanjutnya digunakan dalam analisis kluster untuk menghasilkan dendrogram.

Dendrogram (Gambar 12) menghasilkan pemisahan varietas jeruk ke dalam beberapa kluster yang sebagian mengelompok berdasarkan populasinya. Sebagian populasi juga mengelompok secara acak karena pola penyebarannya tidak dipengaruhi oleh sebaran geografis. Hal ini terlihat bahwa populasi yang terdapat pada daerah Kabupaten Selayar ternyata mengelompok dengan varietas asal kabupaten lain yaitu Sidrap, Bantaeng dan Luwu Utara. Berdasarkan jarak genetik dari Nei (1972), pada koefisien kemiripan 0.77 membagi 175 genotip jeruk menjadi 5 kelompok yang memiliki hubungan genetik terpisah. Hasil pengelompokan menunjukkan beberapa genotip yang termasuk dalam varietas jeruk pamelu berada pada kelompok yang sama, yaitu varietas pamelu merah (M), pamelu putih (P) dan pamelu gula-gula (G). Hasil analisis PCoA juga menghasilkan varietas jeruk pamelu varietas M, P dan G mengelompok secara terpisah seperti terlihat pada Gambar 13. PCoA dapat digunakan untuk konfirmasi lebih lanjut mengenai keragaman genetik. Hal yang sama juga

terlihat pada genotip jeruk nipis (N) yang mengelompok sendiri. Namun demikian, tidak semua genotip varietas jeruk dengan tetua yang sama berada dalam satu kelompok yang mengelompok secara acak, seperti varietas jeruk selayar selayar biji (SB), selayar-selayar (SS), JC-selayar (JS), *Japanshe citroen* (JC), siam (SI), santang madu (SM), dekopon (D), keprok batu 55 (B), dan jeruk purut (NN). Hal ini kemungkinan disebabkan tanaman jeruk memiliki heterozigositas yang tinggi, sehingga genotip hasil persilangan mempunyai sifat yang berbeda, meskipun berasal dari kombinasi tetua persilangan yang sama.

Dendrogram menghasilkan 5 kelompok utama yang jelas. Kelompok pertama terdiri dari 54 genotip, kelompok dua terdiri dari 40 genotip, kelompok tiga terdiri dari 41 genotip, kelompok empat terdiri dari 30 genotip, dan kelompok lima terdiri dari 10 genotip. Terdapat pencampuran antarvarietas yang dikumpulkan dari 3 wilayah (Selayar, Luwu Utara dan Bantaeng) yang tampak pada kelompok I, II dan III. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh pemulia jeruk menggunakan material tanaman yang diinginkan dan dicangkokkan atau disambung ke beberapa tanaman yang berbeda atau diperbanyak dan dijual ke tempat yang berbeda. Kelompok IV dan V hanya terdiri dari varietas yang dikumpulkan dari Pangkep dan Sidrap.

Hubungan kekerabatan diantara genotip yang diuji berkisar 0.69 hingga 1, yang berarti 13 varietas memiliki tingkat kekerabatan dekat sampai berkerabat jauh. Semua genotip dapat dibedakan di antara varietas satu dengan yang lainnya. Jarak genetik yang tinggi menunjukkan bahwa hubungan antara varietas cukup jauh dan nilai jarak genetik yang kecil menunjukkan bahwa hubungan kekerabatannya dekat. Jarak genetik digunakan dalam mendeteksi hubungan kekerabatan antarpopulasi dan antarspesies. Berdasarkan hasil analisis penanda RAPD, genotip jeruk yang memiliki kekerabatan paling dekat adalah genotip SB6 dan SB7 dengan koefisien kesamaan 100% diikuti genotip JS8 dan JS9, serta JS13 dan JS17, dengan nilai kesamaan genetik masing-masing >99%. Genotip SB6 dan SB7 mempunyai nilai kesamaan genetik yang tinggi karena diduga merupakan genotip yang sama. Kedua genotip tersebut merupakan genotip varietas jeruk keprok yang berasal dari Selayar. Demikian juga dengan genotip JS13 dan JS17 yang memiliki nilai kesamaan genetik >99% keduanya tergolong varietas jeruk yang dibudidayakan melalui penyambungan jeruk batang bawah JC dan batang atas keprok selayar.

Genotip P9 dan SI5 memiliki nilai kekerabatan paling jauh (nilai kesamaan sebesar 57%). Kedua genotip tersebut tergolong ke dalam tipe yang berbeda. Genotip SI5 merupakan varietas jeruk siam asal Luwu Utara yang dicirikan dengan kulit buah berwarna hijau kekuningan dan mengkilat, tekstur permukaan kulit buah halus, sedangkan P9 merupakan jeruk pamelu putih asal Pangkep dengan ciri buah berukuran besar dengan diameter rata-rata 15-22 cm, bahkan ada pula yang berukuran lebih dari 30 cm, kulit buah cukup tebal yaitu 2.1-3.73 cm dan kerekatan dengan daging buah sangat kuat. Semakin jauh jarak genetik antargenotip, akan memiliki efek heterosis yang tinggi. Meskipun demikian, untuk menghasilkan rekombinan yang baik perlu dipertimbangkan juga karakter agronomisnya.

Salah satu faktor yang mempengaruhi pola variasi genetik di alam adalah mekanisme penyerbukan (*mating system*) pada tumbuhan (Sedgley dan Griffin 1989), mekanisme ini bergantung pada struktur bunga, mutasi, migrasi dan sistem perkawinan (Finkeldey, 2005; Hamid, dkk., 2008; Yulianti, dkk., 2011). Variasi genetik merupakan kunci penting bagi konservasi keanekaragaman hayati (Thomat et al., 1999), karena jika terjadi kehilangan variasi genetik maka akan menghambat suatu spesies untuk merespon seleksi alam (Janat Gul et al., 2021). Variasi genetik yang diamati diantara sampel diambil dari beberapa daerah dengan kondisi ekologi yang berbeda dan ketinggian yang bervariasi. Jarak geografis dan kondisi ekologi memegang peranan penting dalam variabilitas (Janat Gul et al., 2021). Adanya keragaman genetik yang tinggi pada populasi yang diteliti dapat disebabkan oleh perbedaan sumber asal benih atau karena pengaruh mutasi dan persilangan alam (Vidal et al., 2019).

2.6 Kesimpulan

Karakterisasi fenotip dan anatomi dari 13 varietas jeruk di Sulawesi Selatan menunjukkan keragaman. Nilai keragaman genetik (H_e) jeruk di Sulawesi Selatan tergolong sedang (0.236). Keragaman genetik sedang tetap memiliki variasi genetik dalam populasi, namun variasinya tidak terlalu luas. Walaupun demikian, keragaman genetik yang tergolong sedang tetap berperan penting dalam perbaikan sifat-sifat tanaman melalui pemuliaan tanaman. Analisis kluster berdasarkan koefisien kemiripan 77% membagi 175 genotip jeruk menjadi 5 kelompok. Genotip berkerabat paling dekat adalah genotip SB6 dan SB7 dengan koefisien kesamaan 100% diikuti genotip JS8 dan JS9, serta JS13 dan JS17, dengan nilai kesamaan genetik masing-masing >99%. Genotip P9 dan S15 memiliki nilai kekerabatan paling jauh dengan nilai kemiripan sebesar 57%. Diagram dendrogram dapat menjadi dasar pertimbangan memilih sifat tanaman yang dikehendaki dalam memperbaiki sifat-sifat tanaman melalui kegiatan pemuliaan tanaman baik persilangan konvensional maupun rekayasa genetika.