

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Jeruk merupakan tanaman hortikultura yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Potensi pengembangan usaha tani jeruk dapat memberikan keuntungan maksimal bagi petani karena jeruk memiliki nilai ekonomis tinggi. Selain memiliki nilai ekonomis yang tinggi, jeruk juga kaya manfaat diantaranya dapat meningkatkan kekebalan tubuh, mencegah tubuh dari serangan penyakit flu, mencegah infeksi pada telinga dan dapat membantu mengusir radikal bebas. Banyak jenis jeruk yang dimanfaatkan oleh manusia baik sebagai bahan pangan, wewangian, maupun untuk industri.

Peningkatan jeruk impor di Indonesia menyebabkan jeruk lokal kurang diminati sehingga potensi pengembangan jeruk lokal perlu mendapat perhatian khusus. Salah satu jenis jeruk lokal yang potensial untuk dikembangkan ialah Siam Madu. Siam Madu memiliki kulit yang tipis sekitar 2 mm, permukaannya halus dan licin, mengkilap serta kulit menempel lebih lekat dengan dagingnya serta memiliki rasa yang manis. Pengembangan potensi jeruk Siam Madu masih memiliki beberapa kendala untuk bersaing dengan jeruk impor. Kendala tersebut ialah jumlah biji pada jeruk Siam Madu cukup tinggi antara 10-15 biji per buah.

Untuk memperoleh jumlah biji yang sedikit pada jeruk Siam Madu, dibutuhkan teknologi pemindahan sifat tanpa biji (*seedless*) dari jeruk lain. Jenis jeruk tanpa biji salah satunya ialah jeruk Mandarin Satsuma. Selain itu Mandarin Satsuma juga memiliki warna cerah, bentuk besar serta rasa yang cukup enak. Jeruk Mandarin Satsuma bersifat *seedless* karena memiliki sifat steril.

Perbaikan sifat jeruk lokal Siam Madu perlu dilakukan agar mendapatkan karakter yang sesuai. Perbaikan sifat tidak dapat dilakukan dengan persilangan biasa karena jeruk memiliki tingkat heterozigositas yang tinggi sehingga kemungkinan penyusunan gen-gen dari karakter penting varietas terdahulu sangat sulit. Oleh karena itu perbaikan sifat dilakukan dengan teknologi fusi protoplas.

Fusi protoplas ialah fenomena fisik pada waktu penggabungan dua atau lebih protoplas yang bersentuhan dan melekat satu sama lain (Verma *et al.*, 2004). Idiotipe tanaman yang diharapkan ialah jeruk Siam yang berdaya saing tinggi dengan karakter tanpa biji, rasa manis, kulit mudah dikupas dan memiliki warna

yang menarik. Perbaikan varietas jeruk melalui teknologi fusi protoplas antara jeruk Siam Madu dengan Mandarin Satsuma telah dimulai sejak tahun 2006 di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Sub Tropik (BALITJESTRO) yang bekerjasama dengan Balai Besar Biogen Bogor.

Tanaman hasil fusi protoplas umumnya memiliki berbagai kemungkinan diantaranya adanya transfer gen, pencampuran, penggabungan ulang genom dan sitoplasma. Fusi protoplas dapat menimbulkan manipulasi ploidi kromosom. Manipulasi ploidi yang biasanya terjadi akibat fusi protoplas ialah allopoliploid. Allopoliploid ialah keadaan dimana yang terlibat ialah set-set kromosom non-homolog (Elord *et al.*, 2002). Teknologi fusi protoplas untuk mendapatkan tanaman allopoliploid sudah diterapkan pada tanaman kapas, tembakau, kubis, tebu, apel dan gandum (Suryo, 2007). Pada *solonaceae* juga telah dilakukan pemindahan gen ketahanan melalui pemuliaan allopoliploid.

Kondisi sitogenetik tanaman hasil fusi protoplas jeruk Siam Madu dengan Mandarin Satsuma belum diketahui sehingga perlu adanya pengamatan perubahan sitologi sebagai indikasi keberhasilan pemuliaan. Pengamatan sitologi dilakukan pada tingkat ploidi yang dimiliki oleh setiap individu tanaman melalui flowcytometry. Penelitian ini dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropik.

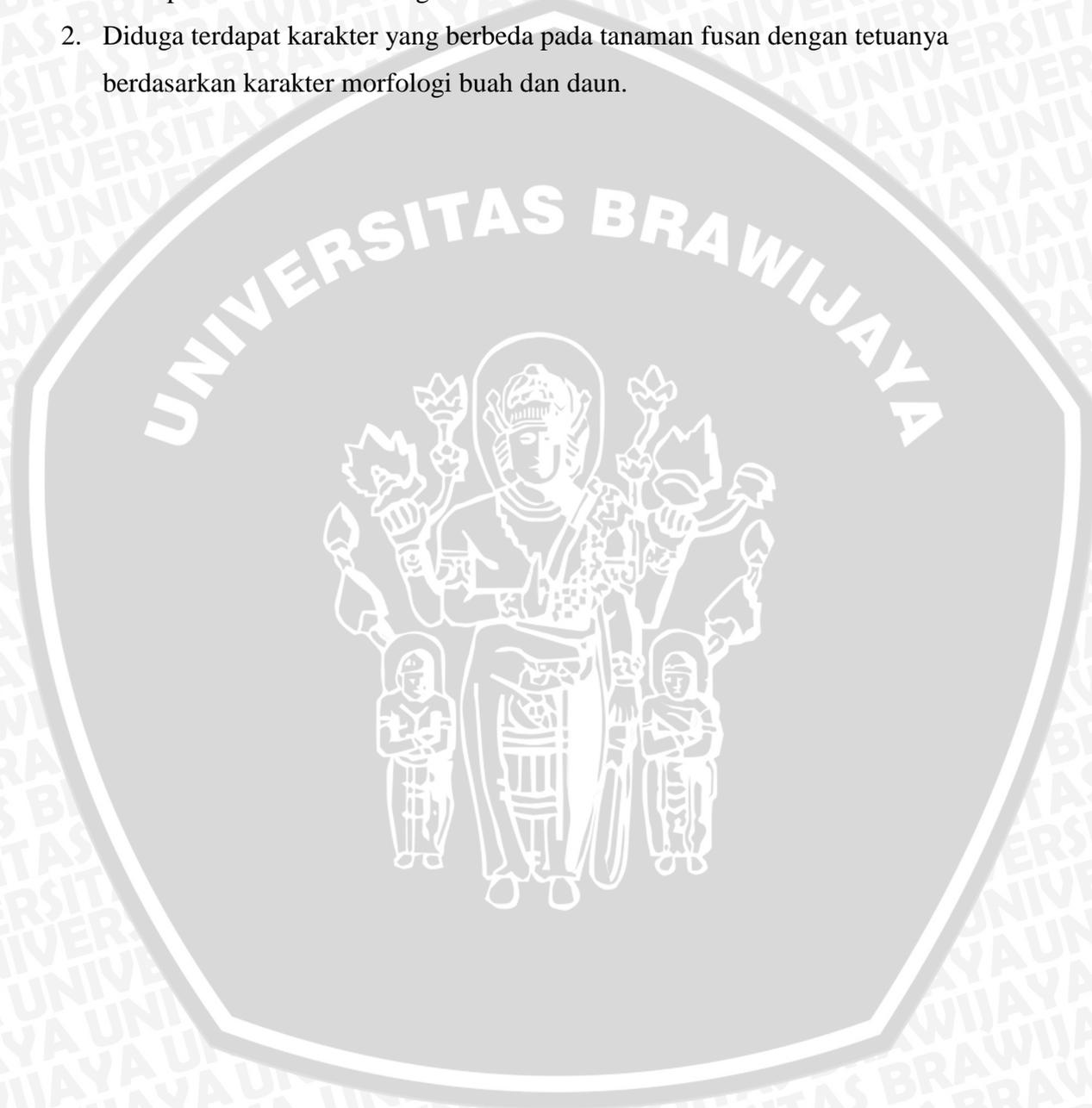


1.2 Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan tanaman fusan dengan sifat *seedless*.
2. Mendapatkan suatu karakter morfologi fisik buah dan daun tanaman fusan.

1.3 Hipotesis

1. Terdapat tanaman fusan dengan sifat *seedless*.
2. Diduga terdapat karakter yang berbeda pada tanaman fusan dengan tetuanya berdasarkan karakter morfologi buah dan daun.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jeruk Siam Madu dan Mandarin Satsuma

Klasifikasi botani tanaman jeruk ialah divisi spermatophyta, kelas dicotyledonae, ordo rutales, famili rutaceae, genus Citrus, spesies *Citrus* sp. Jenis jeruk lokal yang banyak dibudidayakan di Indonesia ialah jeruk Siam Madu (*Citrus nobilis* Lour). Jeruk Siam Madu (*Citrus nobilis* Lour) mendominasi produk jeruk di Indonesia dan merupakan jeruk lokal yang komersial. Namun, jeruk ini memiliki bagian yang tidak dikonsumsi paling tinggi diantara jenis lainnya. Bagian itu berupa seresah yang tidak dimakan, kulit buah dan biji. Jeruk siam memiliki biji yang relatif banyak (15-20 biji per buah), memiliki kulit buah tipis dan sulit dikupas serta warnanya tidak begitu menarik. Salah satu jenis jeruk siam ialah Siam Madu yang memiliki keunggulan-keunggulan diantaranya banyak kadar air, vitamin C tinggi tetapi kulitnya tipis (Sukarmin, 2008).

Pada umumnya varietas jeruk Siam memiliki bentuk dan ukuran daun yang bisa di bedakan dari jenis jeruk lainnya. Bentuk daunnya oval dan berukuran sedikit lebih besar dari jeruk keprok Garut. Ukuran daunnya sekitar 7.5 cm x 3.9 cm dan memiliki sayap daun kecil yang berukuran 0.8 x 0.2 cm bahkan tidak bersayap. Ujung daunnya agak terbelah, sedangkan bagian pangkalnya meruncing. Bentuk buahnya bulat dengan ukuran idealnya sekitar 5.5 cm x 5.9 cm. Jeruk Siam memiliki ciri khas yang tidak dimiliki jeruk keprok lainnya karena mempunyai kulit yang tipis sekitar 2 mm, permukaannya halus dan licin, mengkilap serta kulit menempel lebih lekat dengan dagingnya. Ukuran buah sedang, warna daging buah oranye dan warna kulit buah kekuningan (Deptan, 1994).



Gambar 1. Jeruk Siam Madu (Anonimuous, 2012)

Jeruk Mandarin Satsuma (*Citrus unshiu* Marc) merupakan jeruk introduksi yang memiliki sifat partenokarpi yang tinggi (*seedless*) secara alami, mudah dikupas dan memiliki warna menarik, memiliki bentuk kecil tetapi rasanya kurang menarik (Spiegel Roy dan Goldschmidt, 1996). Jeruk Mandarin Satsuma memiliki warna kulit buah kuning jingga (Soesono, 1983). Ukuran buah juga bervariasi, kecil sampai besar (diameter 5–9 cm), bentuk buah glubose sampai oblate, bagian basal mempunyai tonjolan (collar) rendah sampai tinggi, pada bagian apeks dengan kulit menjorok ke dalam buah, bagian dalam bagian ini kosong sehingga mudah dikupas, permukaan kulit halus, aksis besar dan berongga, flavedo berwarna oranye sampai kemerahan, lembut dan berair (*juicy*), bau sedang sampai menyengat, tanpa biji atau berbiji sedikit 3 - 7 biji per buah, biji kecil dan memanjang.



Gambar 2. Jeruk Mandarin Satsuma (Anonymous, 2012)

2.2 Fusi Protoplas

Protoplas diistilahkan sebagai sel tanaman tanpa dinding sel, karena dinding selnya telah dihilangkan baik secara mekanik maupun secara enzimatik. Istilah protoplas pertama kali diperkenalkan oleh Hanstein (1880) yang menunjukkan zat hidup tanpa dinding sel (Fahn, 1991). Protoplas dapat digunakan sebagai bahan manipulasi genetik dan perbaikan tanaman. Tanaman yang didapat dari regenerasi protoplas menunjukkan keragaman genetik yang tinggi untuk mendapatkan hibrida somatik (Narayaswamy, 1994).

Fusi protoplas ialah fenomena fisik pada waktu penggabungan dua atau lebih protoplas yang bersentuhan dan melekat satu sama lain (Verma *et al.*, 2004). Fusi protoplas ialah penyatuan dua protoplas (isi sel) atau lebih menjadi satu individu baru yang sanggup tumbuh dan berkembang biak sebagai satu individu baru (Daisy *et al.*, 2012).

Penggunaan fusi protoplasma dapat bermanfaat untuk mentransfer gen sehingga dapat bermanfaat untuk menghasilkan varietas tanaman baru sesuai dengan yang diinginkan. Fusi protoplas memungkinkan penggabungan ciri-ciri sitoplasma pada tanaman yang telah diketahui bahwa kloroplas dan mitokondria diwariskan secara maternal pada hibridisasi seksual (Cheng *et al.*, 2003).

2.3 Pemuliaan Jeruk Menggunakan Fusi Protoplas

Perbaikan sifat genetik suatu tanaman dapat dilakukan secara konvensional misalnya dengan persilangan seksual atau secara inkonvensional. Pemuliaan tanaman secara konvensional melalui persilangan seksual adakalanya tidak dapat diaplikasikan karena kendala genetik seperti adanya inkompatibilitas seksual antara tetua yang akan dipersilangkan atau adanya sterilitas pada salah satu tetua. Kasus tersebut sering terjadi pada persilangan tanaman berkerabat jauh seperti persilangan antar species (interspesifik) atau antar genus (intergenerik) (Masnenah, 2013).

Persilangan inkonvensional salah satunya ialah fusi protoplas. Fusi protoplas dapat terjadi secara spontan atau dapat di induksi secara kimiawi atau fisik dengan energi listrik. Secara kimia dapat diinduksi menggunakan larutan garam tertentu (NaNO_3 , NaCl , KNO_3 , dan KCl), PEG (Poli Etilen Glikol) sebagai bahan penginduksi terjadinya fusi protoplas. Fusi protoplas dapat juga dilakukan menggunakan dextran sulfat, dimetil sulfoksida (DMSO) dan Concanavalisa A (Grosser *and* Gmitter, 1990). Selain itu teknologi fusi protoplas juga dapat dilakukan dengan cara menggabungkan seluruh genom dari spesies yang sama (intra-spesies), atau antarspesies dari genus yang sama (inter-spesies), atau antargenus dari satu famili (inter-genus). Penggunaan fusi protoplas memungkinkan diperolehnya hibrida-hibrida dengan tingkat heterosigositas yang tinggi walaupun tingkat keberhasilannya sangat ditentukan oleh genotipenya (Mollers *et al.*, 1992).

Manipulasi genetik melalui fusi protoplas dikembangkan untuk memungkinkan terjadinya fusi antara protoplas tanpa inti yang disebut tanaman sibrida dan tahap-tahap hibridisasi somatik (Makmur, 1992): (1) mengisolasi protoplas dari jaringan induk, (2) merangsang fusi antara protoplas dari dua spesies atau genera yang berbeda (3) memisahkan fusiprotoplas yang mempunyai

sifat dikehendaki dari protoplas kedua spesies induk, (4) meregenerasi tanaman hibrida dari fusi protoplas.

Hasil fusi protoplas terdiri dari 3 kemungkinan : (1) menghasilkan hibrid atau kombinasi dua genom lengkap. Terjadi apabila berasal dari dua genom yang sama maka dinamakan homokaryon namun bila berasal dari genom yang berbeda maka dinamakan heterokaryon. (2) Menghasilkan *asymmetric hybrid* atau *partial hybrid*. Terjadi apabila hanya sebagian genom yang berpindah dari sel donor ke sel resipien (terjadi eliminasi kromosom). Hal ini dapat terjadi pada inti dan mitokondria. (3) Menghasilkan sibrid. Hanya organel yang mengalami perpindahan tanpa diikuti oleh perpindahan inti. Memungkinkan terjadinya sifat resisten herbisida dan cytoplasmic male sterility (George, 2008).

(Calixto *et al.*, 2004) mendapatkan hibrida somatik dari *Citrus sinensis* dengan *Citrus grandis* yang toleran terhadap virus *Citrus tristeza*, *Phytophthora* dan berpotensi digunakan sebagai batang bawah. Teknologi fusi protoplas juga berhasil mendapatkan tanaman jeruk yang seedless hasil fusi protoplas antara *C. unshiu Marc* dengan *C. grandis* dan *C. sinensis*.

2.4 Karakterisasi Tanaman Fusi Protoplas

Karakterisasi meliputi sifat kualitatif dan kuantitatif. Karakter kualitatif ialah wujud fenotipe yang saling berbeda antara satu dengan yang lain secara kualitatif dan masing-masing dapat dikelompokkan dalam bentuk kategori. Biasanya karakter ini dikendalikan oleh satu atau beberapa gen. Karakterisasi berfungsi sebagai informasi guna memprediksi keturunan hasil persilangan ataupun yang lainnya (Rochmah, 2001).

Karakter pada tanaman hasil fusi protoplas beragam. Dalam satu pohon dapat menunjukkan karakter yang berbeda. Seperti pada daun tanaman hasil fusi. Karakter tersebut dapat terjadi karena adanya peleburan protoplas. Karakter yang berbeda pada tiap tanaman menunjukkan keunikan tersendiri yang selanjutnya akan diseleksi untuk mendapatkan karakter yang diinginkan. Karakteristik pada tanaman hasil fusi protoplas memiliki ukuran buah yang lebih besar dikarenakan ukuran selnya yang lebih besar dari tetuanya.

Pada tanaman hasil fusi protoplas antara Mandarin Satsuma dengan jeruk manis, karakter morfologi daun merupakan hal yang umum untuk diperbarui

seperti jaringan daun dari jeruk manis. Keduanya meregenerasi dan pada morfologi daun jeruk manis memiliki sayap daun sedangkan pada mandarin Satsuma tidak memiliki sayap daun (Yamamoto dan Shoso, 1995). Karakteristik jeruk Satsuma Mandarin yang tanpa biji dapat dijadikan sebagai bahan untuk fusi protoplas agar mendapatkan karakteristik tanpa biji pada tanaman hasil fusi protoplas yang baru.

2.5 Ploidi pada Tanaman Hasil Fusi Protoplas

Pada tanaman hasil fusi protoplas, kemungkinan yang terjadi ialah poliploid. Poliploid dibedakan menjadi dua yaitu allopoliploid dan autopoliploid. Allopoliploid terjadi dari hasil persilangan antara tanaman dengan genom berbeda. Allopoliploid dapat terjadi melalui persilangan interspesifik/intergeneric dan melalui hibridisasi somatic dengan cara fusi protoplas. Autopoliploid yaitu penggandaan langsung pada kromosom di alam dapat terjadi secara spontan namun amat jarang terjadi.

Tanaman hasil fusi protoplas bersifat allopoliploid. Allopoliploid yang terlibat ialah set-set kromosom non-homolog (Elord *et al.*, 2002). Allopoliploid ialah keadaan sel yang mempunyai satu atau lebih genom dari genom normal $2n = 2x$, dimana pasangan kromosomnya tidak homolog. Allopoliploid terbentuk dari hibridisasi antara spesies atau genus yang berlainan genom (hibridisasi interspesies). Tanaman F₁-nya akan steril, karena tidak ada atau hanya beberapa kromosom homolog. Bila terjadi penggandaan kromosom spontan atau diinduksi, maka tanaman menjadi fertil.

Untuk mendapatkan tanaman-tanaman allopoliploid yang fertil ada dua kemungkinan yaitu: (1) Tanaman hibrid interspesifik yang steril tanpa mengalami reduksi kromosom (meiosis) dapat membentuk gamet-gamet yang bila bersatu akan menghasilkan tanaman allopoliploid yang fertil. Cara yang terjadi secara alamiah ini sangat jarang terjadi di alam. (2) Tanaman hibrida interspesifik yang steril itu dilipat gandakan kromosomnya dengan perlakuan zat kimia tertentu seperti kolkhisin. Karena jumlah kromosom berlipat dua, maka dapat membentuk pasangan-pasangan kromosom selama meiosis, sehingga tanaman yang terbentuk sifat allopoliploid yang fertil. Cara ini umum dilakukan oleh para ahli pemuliaan tanaman.

Pada allopoliploid ditemukan macam allopoliplod segmental (sebagian kromosom homolog) menyebabkan steril sebagian, dan allopoliploid (semua kromosom tidak homolog) menyebabkan steril penuh. Allopoliploid segmental memiliki segmen kromosom homologous dan homoeologus (homolog parsial) yang selama meiosis dapat terjadi bivalen dan multivalen, sehingga pewarisannya campuran disomik-polisomik (Vandepoel *et al.*, 2003).

Tanaman dengan allopoliploid dapat dihasilkan dengan hibridisasi somatik atau fusi protoplas. Dengan teknologi fusi protoplas dapat dilakukan introgresi gen sifat baik dari jeruk Mandarin Satsuma ke jeruk Siam Madu. Hasil introgresi gen dari fusi protoplas tersebut dihasilkan hibrida dengan level ploidi $2n=4x=36$ (Allotetraploid). Hibrida tersebut juga dapat digunakan sebagai tetua yang akan disilangkan dengan jeruk Siam ($2n$) untuk mendapatkan hibrida yang triploid ($2n=3x$) yang mempunyai sifat parthenocarp yang tinggi.

Pada kultur biji jeruk mandarin Kinow yang mempunyai tingkat ploidi yang berbeda (tetraploid, triploid dan diploid) memperoleh persentase perkecambahan mulai dari 12.5-90.3% pada media MP3 dengan penambahan 1 mg/l GA_3 . Pada jeruk Siam madu (*Citrus nobilis L.*) dan Mandarin Satsuma (*Citrus unshiu Marc*) memiliki jumlah kromosom 18 ($2n = 2x = 18$). Sedangkan untuk tanaman hasil fusi protoplas memiliki hasil yang bervariasi yaitu lebih dari 18 kromosom (Widiyanti, 2010). Keragaman dalam jumlah kromosom dapat berupa penambahan atau pengurangan satu atau lebih set kromosom dalam sel yang akan mempengaruhi fenotipe tanaman (Stansfield, 1991).

Penelitian mengenai fusi protoplas pada *Citrus sinensis* dengan *Citrus grandis* sudah pernah dilakukan di Amerika. Hingga saat ini, teknologi fusi protoplas sudah banyak digunakan di negara-negara maju untuk merakit kultivar unggul baru atau hibrida baru tanaman jeruk seperti fusi protoplas antara *C. sinensis* dengan *C. lansium* (Fu *et al.*, 2003), *C. unshiu Marc.* dengan *C. grandis* dan *C. sinensis* (Cai *et al.*, 2007) dan transfer sitoplasma *C. unshiu* untuk mendapatkan alloplasmic melalui fusi protoplas asimetris (Xu *et al.*, 2006).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai dengan bulan September 2013. Tempat penelitian di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropik (BALITJESTRO) yang beralamatkan di Jl. Raya Tlekung Nomor 1 Junrejo, Kota Batu, Jawa Timur dan di laboratorium pemuliaan tanaman di BALITJESTRO.

3.2 Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan selama penelitian ialah penggaris, timbangan analitik, cawan petri, pipet, gelas ukur dan flowcytometer (alat untuk menganalisis ploidi).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah tanaman jeruk hasil fusi protoplas serta tanaman induk jeruk Siam Madu dan Mandarin Satsuma, daun muda, buffer ekstraksi (Tris-MgCl₂ buffer), larutan pewarna 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Tanaman hasil fusi protoplas yang digunakan ialah FS 1, FS 2, FS 4, FS 5, FS 6, FS 7, FS 8, FS 9, FS 10, FS 11, FS 12, FS 14, FS 17, FS 18, FS 19, FS 20, FS 21, FS 22, FS 23, FS 24, FS 26, FS 27, FS 29, FS 30, FS 31, FS 32, FS 41, FS 49, FS 56, FS 57, FS 58, FS 64, FS 69, FS 71, FS 76, FS 80, FS 83, FS 84, FS 87, FS 96, FS 97, FS 101, FS 103, FS 107, FS 112 dan FS I 2. Tanaman hasil fusi protoplas yang diamati berjumlah 46 tanaman.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan ialah :

1. Pengumpulan data sekunder

Data sekunder didapatkan dari literatur berupa buku, jurnal maupun artikel ilmiah yang memuat tentang tanaman jeruk atau segala sesuatu yang menyangkut budidaya, karakterisasi jeruk dan ploidi.

2. Pengumpulan data primer

Data primer didapatkan dari penelitian atau percobaan dan pengamatan di lapang yang sesuai dengan topik permasalahan. Pengumpulan data primer dilakukan pada saat di lapang dan di laboratorium pemuliaan BALITJESTRO.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Karakterisasi Jeruk F1 Hasil Fusi Protoplas

Karakterisasi pada jeruk dilakukan pada tanaman jeruk yang telah berumur tiga tahun. Karakterisasi dilakukan dengan pengamatan karakter kualitatif dan kuantitatif. Pengamatan pada karakter kualitatif meliputi: bentuk buah, bentuk pangkal buah, bentuk ujung buah, warna kulit, permukaan kulit, warna daging kulit, warna pulp, tekstur pulp, cita rasa juice, kadar juice dan sebagainya. Karakter kualitatif pada daun ialah warna daun, tipe daun, sayap daun, bentuk sayap, tepi daun dan bentuk anak tulang daun.

Pengamatan karakter kuantitatif ialah panjang daun, lebar daun, diameter buah, tebal kulit buah, tebal daging kulit buah, diameter axis, jumlah biji, bobot biji, panjang biji, lebar biji dan sebagainya. Pengamatan karakter kuantitatif dapat dilihat pada lampiran 1.

Pengambilan sampel berasal dari tanaman jeruk yang berumur 3 tahun. Pada pengamatan daun, prosedurnya ialah dengan mengambil daun ke 10 dari pucuk daun. Masing-masing diambil 3 helai daun dari empat sisi. Pengambilan sampel buah masing-masing diambil 10 buah pada satu tanaman. Buah yang dipilih ialah yang sudah masak sempurna. Pada pengamatan karakter biji, biji yang tergolong seedless memiliki biji ber nas antara 0-4 biji.

Tabel 1. Karakter Kualitatif Daun

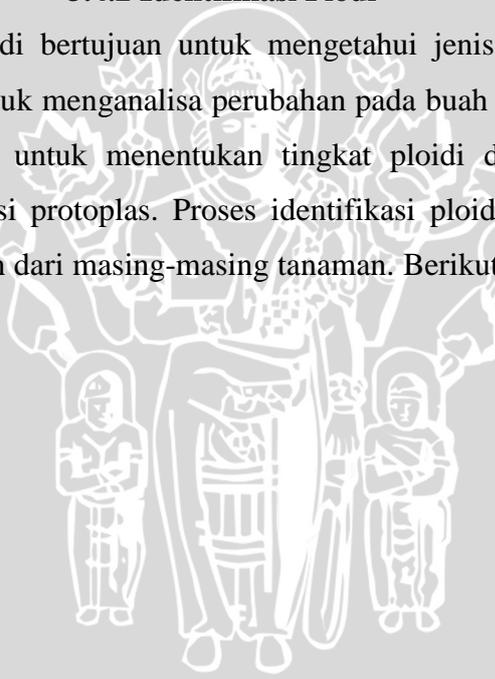
No	Uraian	Kelompok	
1.	Warna daun	Hijau muda	[0]
		Hijau tua	[1]
2.	Tipe daun	Daun tunggal	[0]
		Trifolia	[1]
3.	Sayap daun	Tanpa sayap	[0]
		Bersayap	[1]
4.	Bentuk anak tulang daun	Melengkung (kurva)	[0]
		Lurus	[1]

Tabel 2. Karakter Kualitatif Buah

No	Uraian	Kelompok	
1.	Warna kulit	Hijau kekuningan	[0]
		Orange	[1]
2.	Keeratan antar juring	Tidak rekat/lepas	[0]
		Sangat rekat	[1]
3.	Keeratan epicarp pada mesocarp	Lemah	[0]
		Kuat	[1]
4.	Axis buah	Padat	[0]
		Berlubang	[1]
5.	Tampak melintang axis	Bulat/lingkaran	[0]
		Tak beraturan	[1]
6.	Keseragaman warna pulp	Seragam	[0]
		Tidak	[1]

3.4.2 Identifikasi Plodi

Identifikasi ploidi bertujuan untuk mengetahui jenis ploidi dan jumlah ploidi yang berguna untuk menganalisa perubahan pada buah serta daun. Analisis tingkat ploidi berguna untuk menentukan tingkat ploidi dari setiap individu tanaman jeruk hasil fusi protoplas. Proses identifikasi ploidi dilakukan dengan mengambil sampel daun dari masing-masing tanaman. Berikut ialah langkah kerja identifikasi ploidi :



Daun muda (0,3 – 0,5 cm²) dari plantlet 36 tanaman hasil fusi protoplas



dipotong dan diiris menjadi berukuran lebih kurang 1mm.



dimasukkan di cawan petri yang mengandung 100µl buffer ekstraksi



Irisan potongan daun dimasukkan dalam 400µl larutan pewarna 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)



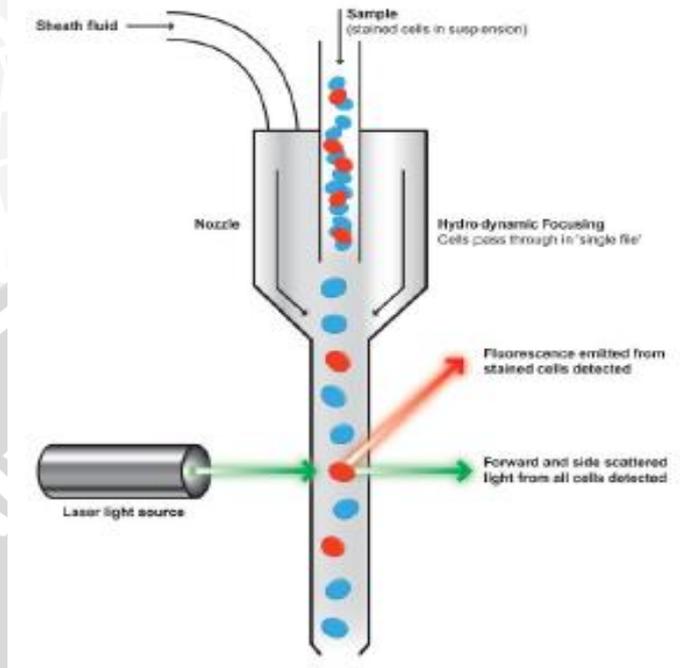
Suspensi disaring dengan *miliopore filter* 30µm



Dianalisis dengan flowcytometry.

Penggunaan alat flowcytometry mempermudah mendiagnosa ploidi sehingga dapat dibedakan regeneran hasil fusi dengan non fusi. Cara kerjanya ialah ketika sel dalam buffer dijalankan melalui cytometer, hidrodinamis difokuskan menggunakan selubung cairan melalui nozzle yang sangat kecil. Pada beberapa cytometers ukuran nosel ini dapat disesuaikan menurut ukuran sampel, tetapi dalam kisaran mikro. Aliran cairan sel melewati sinar laser satu per satu. Laser akan menstimulasi molekul neon yang kemudian akan mengirimkan foton dari panjang gelombang yang lebih panjang. Ada sejumlah pemindai untuk mendeteksi cahaya yang tersebar dari sel-sel. Biasanya ada satu di depan berkas cahaya dan beberapa ke sisi (sisi pencar). Neon detektor bekerja untuk deteksi lampu neon yang dipancarkan dari sel-sel/partikel. Setelah melewati sensor, maka

akan terlihat grafik pada monitor yang menunjukkan tingkat perubahan sel. Cara kerja flowcyrometry seperti pada gambar 3.



Gambar 3. Cara Kerja Flowcitometry

3.5 Analisis Data

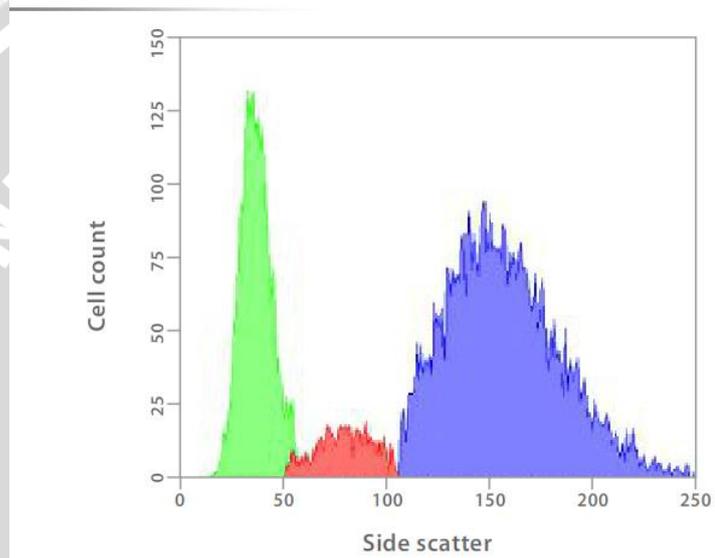
3.5.1 Analisis Karakter Morfologi Jeruk

Pada pengamatan karakter kualitatif, beberapa karakter hasilnya akan di klusterkan. Hasil skoring dalam bentuk data biner. Data biner selanjutnya akan dibuat dendogram dengan bantuan software NTSYS 2.1. Data kualitatif di binerkan agar mempermudah proses pengerjaan dalam karakterisasi. Pengamatan pada karakter kuantitatif hasilnya dibandingkan dengan tetuanya.

3.5.2 Analisis Ploidi

Analisis data ploidi dilakukan dengan alat flowcitometry. Flowcitometry ialah alat yang digunakan untuk menganalisis ekspresi permukaan sel dan molekul intraseluler, karakteristik dan mendefinisikan jenis sel yang berbeda dalam populasi sel heterogen, menilai kemurnian sub populasi terisolasi dan menganalisis ukuran sel dan volume. Analisa dengan flowcitometry menggunakan sinar laser.

Side Scatter Histogram



Gambar 4. Histogram Perubahan Sel

Hasil analisa flowcitometry berupa histogram yang menunjukkan adanya perubahan sel. Dari contoh grafik tersebut dapat diketahui adanya perbedaan dari grafik tersebut. Peak tertinggi menunjukkan sel $2n$ sedangkan yang rendah serta lebih lebar atau pada gate 100, 200 dst menunjukkan perubahan sel. Tanaman hasil fusi protoplas yang sudah mengalami perubahan genetik, menunjukkan jumlah kromosom yang berbeda dari tetuanya. Contoh analisis percobaan pada sel menggunakan perangkat lunak flowcitometry untuk penanda pada plot histogram dan mengukur persentase sel dengan $<2n$, $2n$, $4n$ dan $>4n$ kandungan DNA.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Karakterisasi Jeruk Hasil Fusi Protoplas Berdasarkan Karakter

Kuantitatif

Karakterisasi jeruk hasil fusi protoplas meliputi karakter kuantitatif dan kualitatif. Pengamatan dilakukan pada morfologi buah dan daun. Hal ini penting dilakukan untuk mengetahui perbedaan karakter antara jeruk hasil fusi protoplas dengan tetuanya. Karakter pada setiap tanaman hasil fusi protoplas umumnya menunjukkan perbedaan dengan tetuanya. Adapun karakter jeruk hasil fusi protoplas ialah :

4.1.1.1 Karakter Kuantitatif Buah

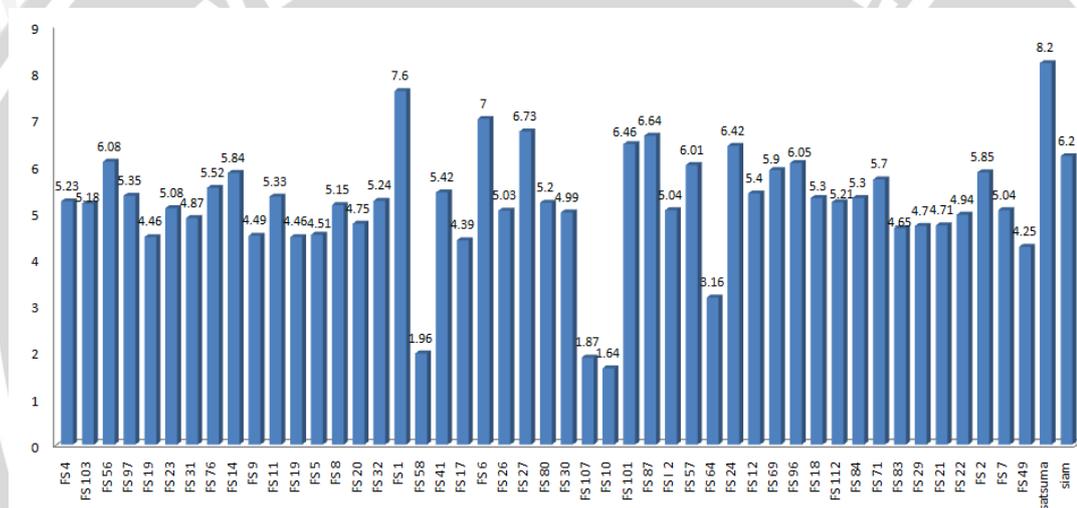
Pengamatan yang dilakukan pada karakter kuantitatif buah meliputi diameter melintang, tinggi buah, tebal kulit, jumlah juring, tebal daging kulit, berat buah dan jumlah buah. Pada masing-masing tanaman hasil fusi protoplas atau disebut juga dengan fusan, memiliki karakter beragam.

Diameter melintang buah hasil fusi protoplas berkisar antara 1,6 cm hingga 7,6 cm. Pada lampiran 2 dapat diketahui bahwa FS 10 memiliki diameter melintang yang paling rendah dibandingkan fusan lainnya yaitu 1,64 cm. Sedangkan untuk yang tertinggi FS 1 (7,6 cm). Satsuma Mandarin memiliki diameter 8,2 cm. Siam Madu memiliki diameter melintang sebesar 6,2 cm (Gambar 5).

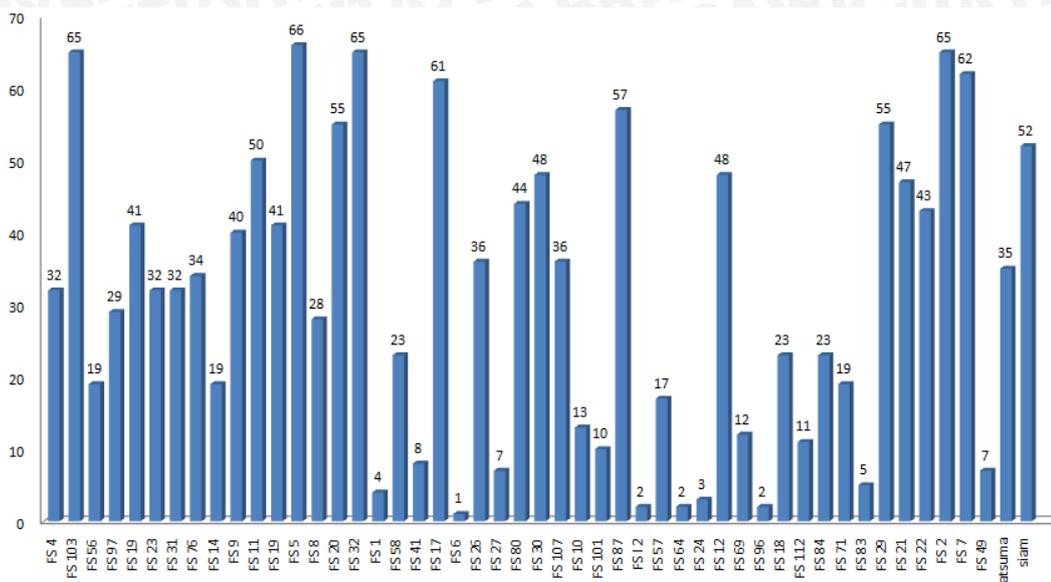
Karakter jeruk Satsuma Mandarin memiliki ukuran buah yang lebih besar daripada jeruk yang lainnya. Oleh sebab itu Mandarin Satsuma dipilih menjadi tetua fusi protoplas. Mandarin Satsuma memiliki ukuran diameter melintang buah 8,2cm dan diameter tinggi 7,28cm. Jumlah buah per pohon pada tanaman fusan berkisar antara 1 sampai 66 buah per pohon. Produksi terendah pada FS 5.

Tebal kulit jeruk fusan berkisar antara 0,2mm - 5,68mm. Parental jeruk yaitu Satsuma Mandarin dan Siam Madu memiliki tebal kulit buah 1,74mm dan 3,36mm. Hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar 6. Pada histogram tersebut dapat diketahui bahwa FS 107 memiliki ketebalan kulit yang paling tebal yaitu 5,68mm. Sedangkan yang memiliki kulit paling tipis ialah FS 6 yaitu 0,2mm.

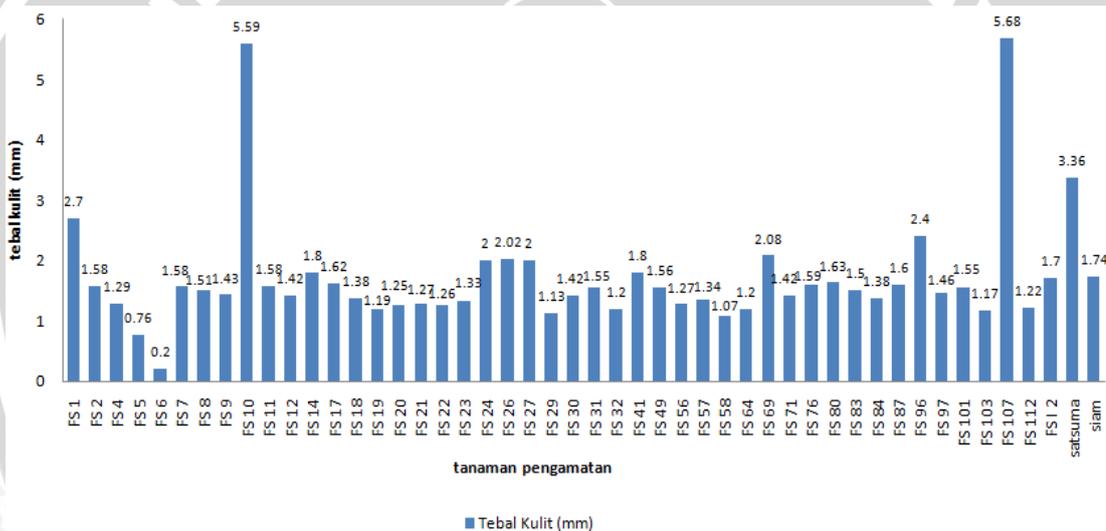
Pada pengamatan jumlah juring, memiliki nilai antara 8-11 juring. Pada pengamatan karakter berat buah, tanaman fusan memiliki berat berkisar antara 4,54 g –181,55 g. Berat buah kedua parentalnya ialah 93,1 g untuk Siam Madu dan 182,5 g untuk Satsuma Mandarin. Pada pengamatan karakter berat buah, berat buah berkisar antara 182,5 g – 4,54 g (gambar 7). Beberapa fusan yang memiliki berat buah melebihi parentalnya ialah FS 14 (93,51 g), FS 69 (98,54 g), FS 107 (99,98 g), FS 96 (106,33 g), FS 57 (107,42 g), FS 56 (107,76 g), FS 10 (120,28 g), FS 101 (124,59 g), FS 87 (126,53g), FS 27 (140,32 g) dan FS 6 (181,55 g). Karakter berat buah yang memiliki berat paling tinggi dibandingkan dengan tetuanya ialah FS 6(181,55 g). Satsuma Mandarin memiliki berat buah 182,5 g dan Siam Madu memiliki berat buah 93,1 g.



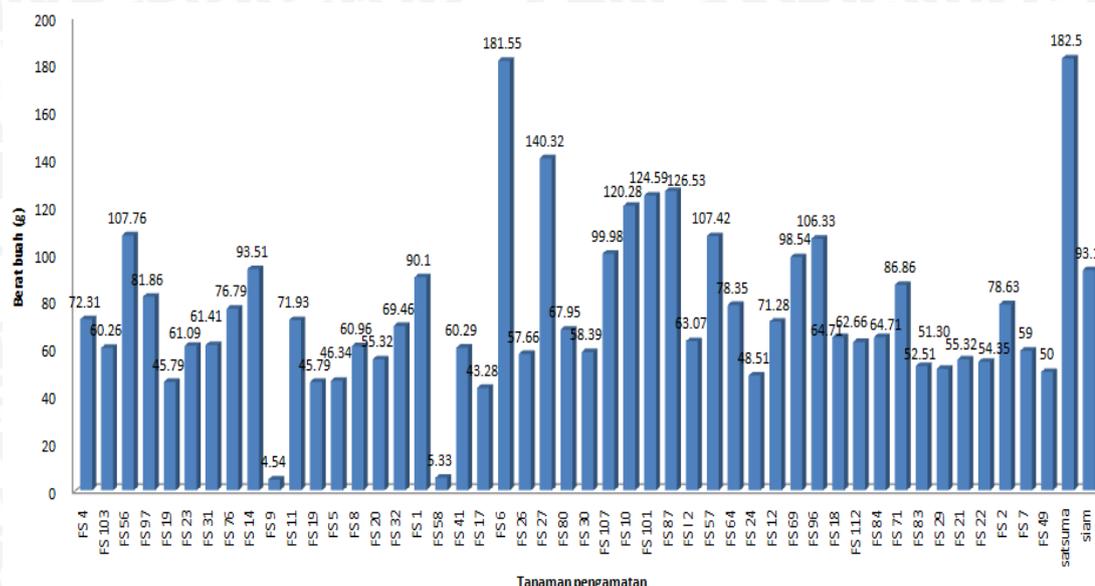
Gambar 5. Diameter Melintang Buah Jeruk Fusan beserta Tetuanya



Gambar 6. Jumlah Buah Per Pohon



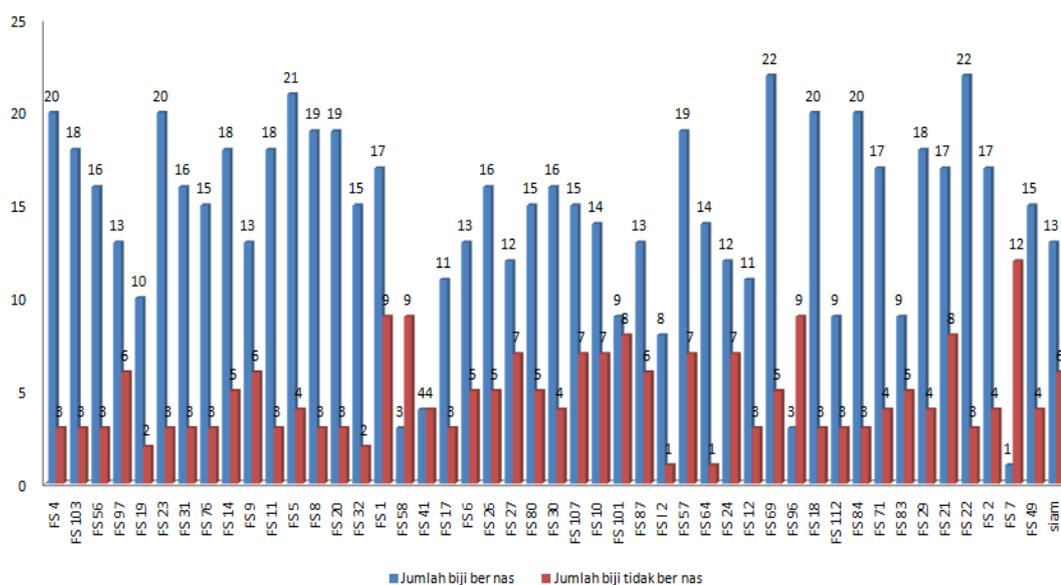
Gambar 7. Karakter Tebal Kulit Buah



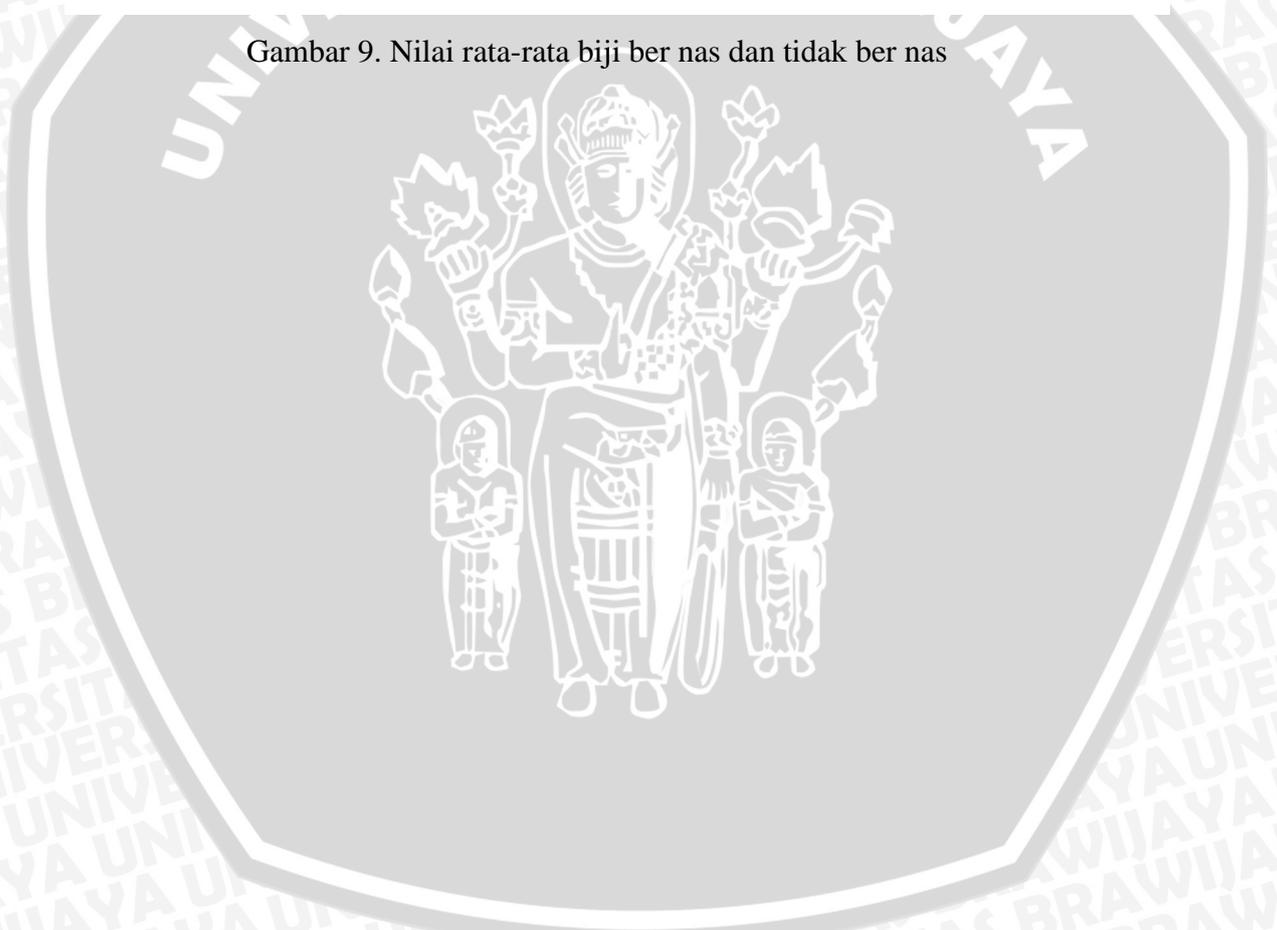
Gambar 8. Nilai Rata-Rata Berat Buah Tanaman Fusan dan Tetuanya

4.1.1.2 Karakter Kuantitatif Biji

Pengamatan biji meliputi jumlah biji ber nas dan tidak ber nas, panjang biji, bobot biji, lebar biji dan jumlah embrio per biji. Jeruk Satsuma Mandarin memiliki karakter *seedless* sehingga tidak dilakukan pengamatan biji. Jumlah biji ber nas berkisar 3 – 22 biji. FS 58, FS 96, FS7 dan FS 41 memiliki jumlah biji ber nas <5 yaitu 1- 4 biji (gambar 9). Sehingga FS 58, FS 41, FS7 dan FS 96 dapat digolongkan kedalam kelompok *seedless* sama seperti parentalnya yaitu Satsuma Mandarin yang memiliki sifat *seedless*. Jumlah embrio per biji berkisar antara 3-6 embrio. Bobot biji pada tanaman fusan memiliki kisaran nilai 0,05g – 0,51g. Bobot biji yang paling rendah di miliki oleh FS3 (0,05g) sedangkan yang tertinggi dimiliki oleh FS6 (0,51g). Berat atau tidaknya bobot biji dapat dipengaruhi oleh jumlah embrio, panjang dan lebar biji. Tanaman fusan rata-rata memiliki 4 embrio per biji. Pengukuran panjang biji berkisar antara nilai 8mm – 12,67mm dan lebar biji berkisar antara 4,88mm – 7,59mm.



Gambar 9. Nilai rata-rata biji ber nas dan tidak ber nas

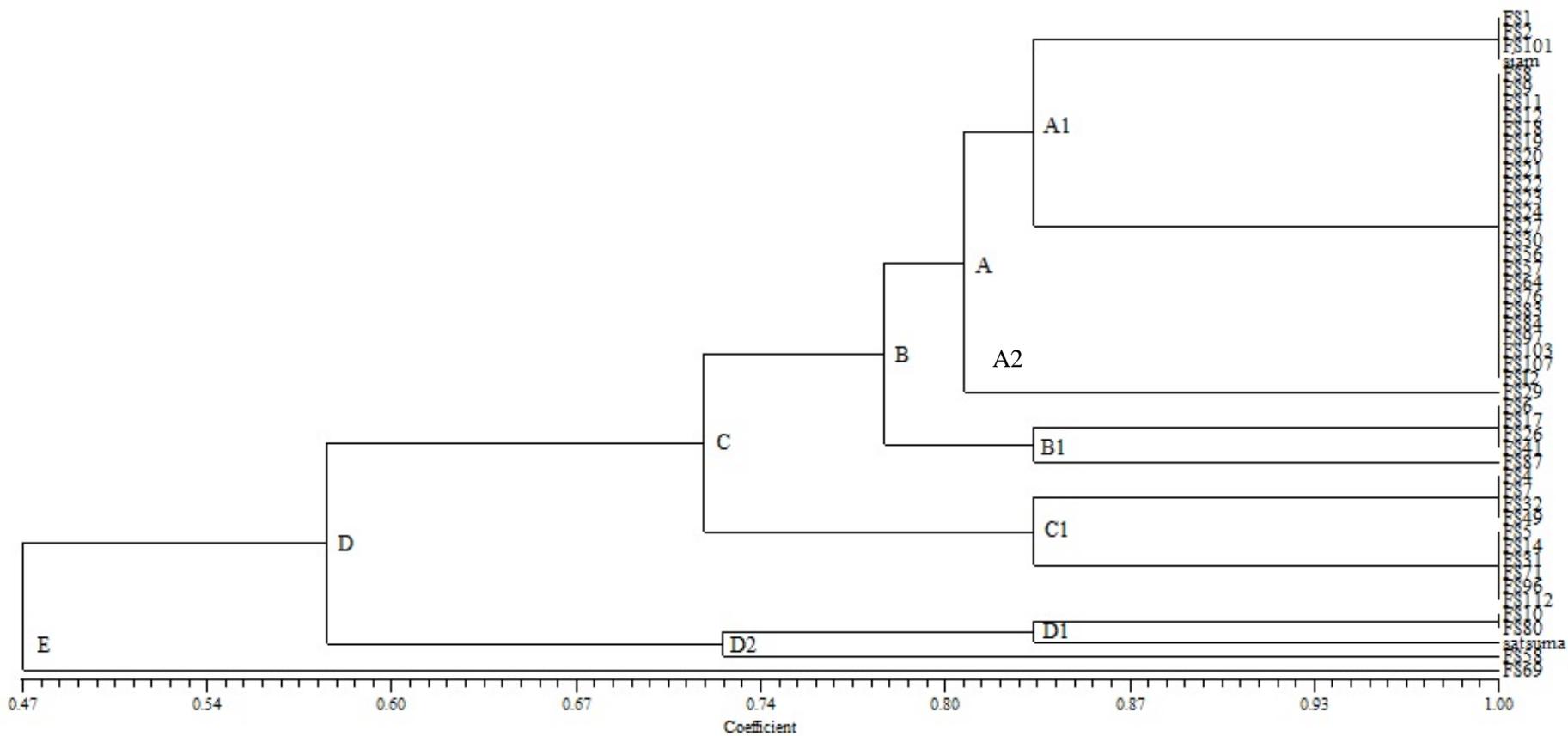


4.1.1.3 Karakter Kuantitatif Daun

Pada tabel 3 pengamatan kuantitatif daun (lampiran 2), parameter yang diamati ialah panjang dan lebar daun. Panjang daun pada asesi berkisar antara 3,03cm - 6,53cm. FS 9 memiliki panjang yang paling pendek yaitu 3,03 dan yang terpanjang ialah FS 56 (6,53). Untuk lebar daun berkisar antara nilai 1,6 cm – 3,48cm. Sedangkan untuk parentalnya memiliki panjang 9,2 cm dan lebar daun 4,3 cm. Pada tanaman fusan, memiliki nilai yang lebih rendah dari tetuanya (Satsuma Mandarin). Secara umum hasil karakter daun tanaman fusan memiliki ukuran panjang dan lebar yang beragam.

4.1.2 Analisis Karakter Kualitatif dengan Dendogram

Pengamatan karakter kualitatif menggunakan dendogram dengan system Clustering. Hal ini bertujuan untuk mempermudah melihat hubungan kekerabatan tanaman fusan dengan parentalnya. Berikut ini ialah dendogram buah, daun dan keseluruhan karakter morfologi 46 tanaman fusan beserta parentalnya. Anggota kluster untuk karakter buah di tampilkan pada tabel 3. Sedangkan untuk karakter daun dan karakter keseluruhan morfologi di tampilkan pada tabel 4 dan tabel 5. Selanjutnya karakter yang telah di clusterkan tersebut dianalisa dengan menggunakan program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSYS 2.1). Hasil dari clustering tersebut ditampilkan dalam bentuk dendogram. Dendogram untuk karakter buah, daun dan keseluruhan morfologi dapat dilihat pada gambar 10, 11 serta 12.

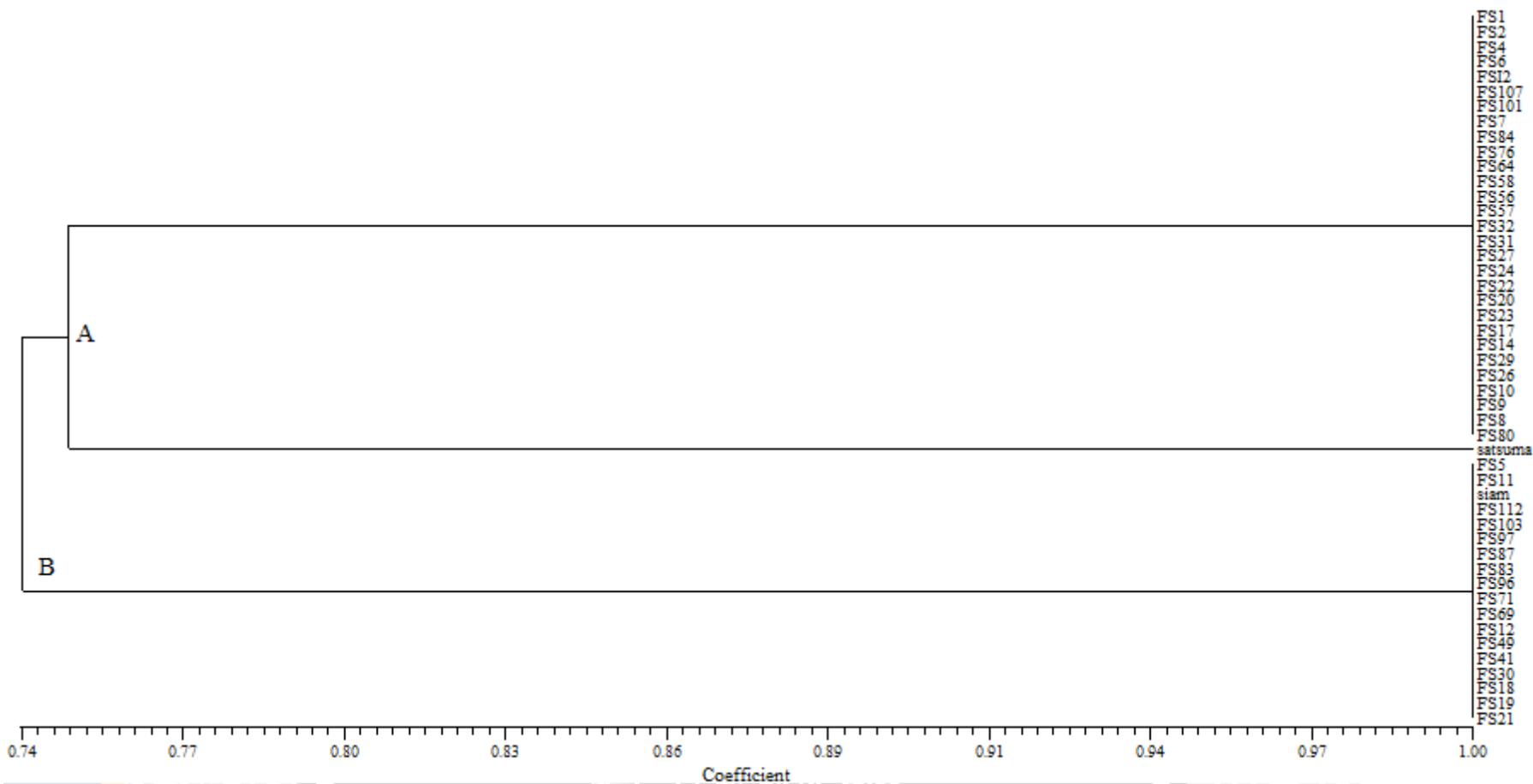


Gambar 10. Dendrogram karakter buah tanaman fusan dengan tetuanya

Tabel 3. Anggota cluster berdasarkan karakter buah

No	Cluster	Asepi
1.	A1	FS1, FS2, FS101, Siam, FS8, FS9, FS11, FS12, FS18, FS19, FS20, FS 21, FS22, FS23, FS24, FS27, FS30, FS56, FS57, FS64, FS76, FS 83, FS84, FS 97, FS 103, FS107, FSI2
	A2	FS29
	B1	FS6, FS17, FS26, FS41, FS87
	C1	FS4, FS7, FS32, FS49,FS5, FS14, FS31, FS71, FS96, FS112
	D1	FS10, FS80 dan Satsuma
	D2	FS58
	E	FS69

Berdasarkan hasil analisis dendogram, pengamatan karakter buah memiliki tingkat kedekatan 47%-100% dengan nilai jarak koefisien kemiripan antara 0,47 – 1,00. Semakin karakter tersebut mendekati angka 1 maka semakin memiliki kedekatan sempurna. Pada dendogram karakter buah (gambar 10) terdiri dari 5 cluster. Cluster tersebut terdiri dari cluster A, B, C, D dan E. Cluster A memiliki jarak koefisien kemiripan 0,807. Cluster B memiliki jarak koefisien kemiripan 0,789. Cluster C memiliki koefisien kemiripan 0,719. Cluster D memiliki koefisien kemiripan 0,586 dan cluster E memiliki jarak koefisien kemiripan sebesar 0,47. Pada sub cluster A1, B1, C1 dan D1 memiliki jarak koefisien kemiripan 0,835. Sedangkan pada sub cluster D2 memiliki jarak koefisien 0,726.



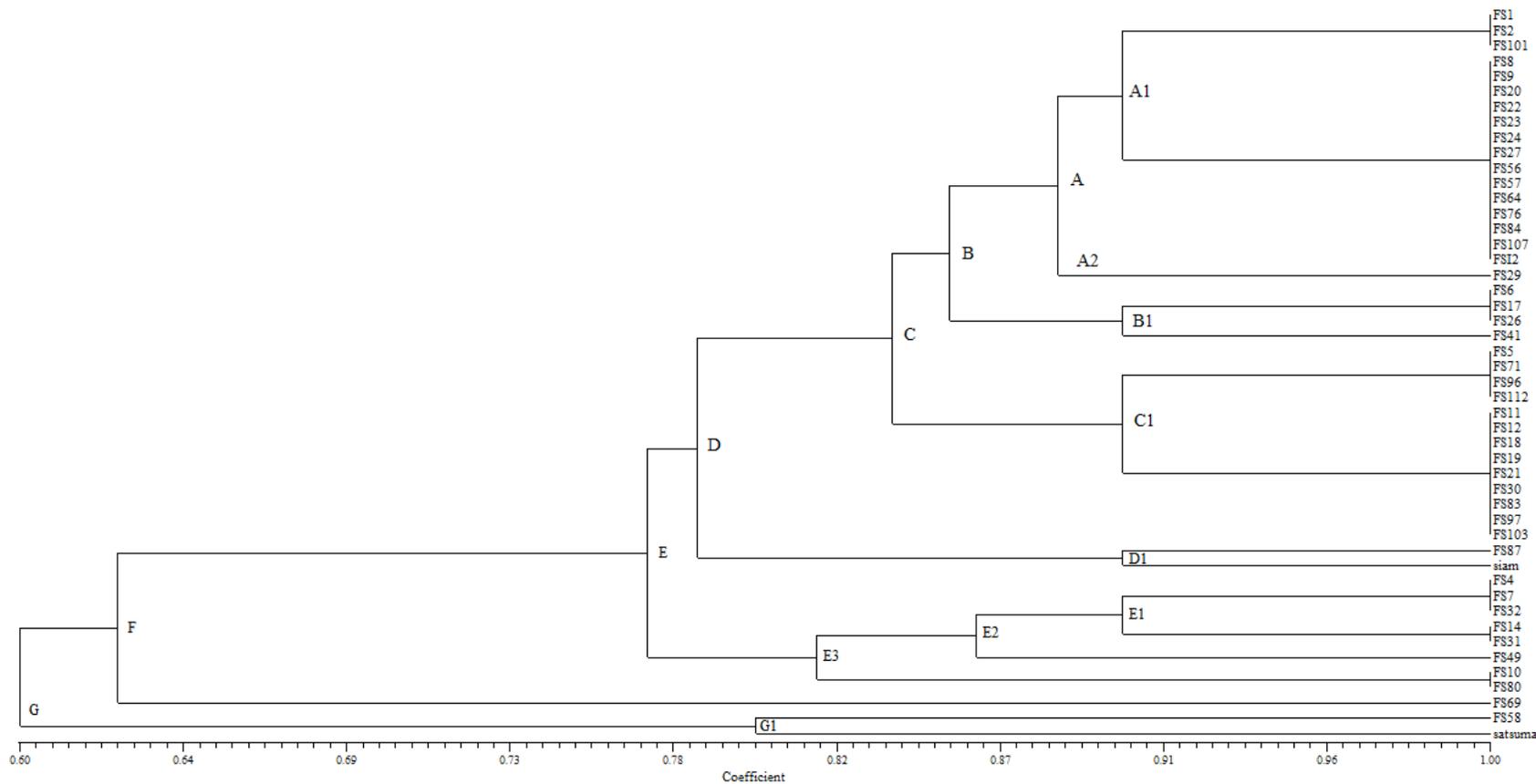
Gambar 11. Dendrogram karakter daun tanaman fusan dengan tetuanya

Tabel 4. Anggota cluster dari hasil pengamatan karakter daun

No	Cluster	Asepi
1	A	FS1, FS2, FS4, FS6, FS 7, FSI2, FS101, FS107, FS84, FS76, FS64, FS58, FS56, FS57, FS32, FS31, FS27, FS24, FS22, FS20, FS23, FS17, FS14, FS29, FS26, FS10, FS9, FS8, FS80, Satsuma
2	B	FS5, FS11, Siam,FS112, FS 103, FS97, FS87, FS83, FS96, FS71, FS69, FS12, FS49, FS41, FS30, FS18, FS19, FS 21

Berdasarkan hasil analisis dendogram, pengamatan karakter daun tidak memiliki banyak variasi. Pada dendogram karakter daun (gambar 11) terdiri dari 2 cluster. Cluster tersebut terdiri dari cluster A dan B. Cluster A memiliki jarak koefisien kemiripan 0,75. Sedangkan cluster B memiliki jarak koefisien kemiripan 0,74. Pada hasil dendogram, karakter daun menunjukkan variasi. Pada umumnya karakter daun tanaman fusan lebih mirip seperti Siam Madu dan Satsuma Mandarin.





Gambar 12. Dendrogram karakter kualitatif tanaman fusan dengan tetuanya

Tabel 5. Anggota cluster

No	Cluster	Aseki
1.	A1	FS1, FS2, FS101, FS8, FS9, FS20, FS22, FS23, FS24, FS27, FS56, FS57, FS64, FS76, FS84, FS107, FSI2
2.	A2	FS29
3.	B1	FS6, FS17, FS26, FS41
4.	C1	FS5, FS71, FS96, FS112, FS11, FS12, FS18, FS19, FS21, FS30, FS83, FS97, FS103
5.	D1	FS87 dan Siam Madu
7.	E1	FS4, FS7, FS32, FS14, FS31
8.	E2	FS49
9.	E3	FS10, FS80
10.	F	FS69
11.	G1	FS58, Satsuma Mandarin

Hasil pengamatan menunjukkan adanya keragaman penampilan fenotipik yang beragam. Berdasarkan analisis dendogram, angka satu pada dendogram menunjukkan anggota cluster memiliki kedekatan sempurna. Apabila semakin mendekati angka nol maka jarak kedekatannya semakin jauh. Berdasarkan analisis data dendogram, karakter morfologi dari 48 aksesori jeruk memiliki tingkat kedekatan 57-100% dengan jarak koefisien kemiripan antara 0,57 – 1,00. Menurut Wulansari *et al* (2015) Nilai koefisien kemiripan menunjukkan kesamaan individu dalam suatu populasi. Semakin tinggi nilai koefisien kemiripan antar individu, maka semakin dekat jarak genetik antara individu tersebut.

Pada dendogram (Gambar 12) terdiri dari 7 Cluster. Cluster A memiliki jarak koefisien kemiripan sebesar 0,884. Cluster B memiliki jarak koefisien kemiripan 0,855. Sedangkan cluster C memiliki jarak koefisien kemiripan 0,838. Cluster D memiliki jarak koefisien kemiripan sebesar 0,788. Cluster E memiliki jarak koefisien kemiripan 0,773. Cluster F memiliki jarak koefisien kemiripan 0,624. Cluster G memiliki jarak koefisien kemiripan 0,60.

Pada sub cluster A1, B1, C1, D1 dan E1 memiliki jarak koefisien kemiripan 0,902 sehingga pada jarak koefisien kemiripan 0,902 ada beberapa sub cluster termasuk jeruk Siam Madu sebagai tetuanya. Pada sub cluster E2 memiliki jarak koefisien kemiripan sebesar 0,865. Sub cluster E3 memiliki jarak koefisien kemiripan sebesar 0,816. Pada sub cluster G1 memiliki jarak koefisien kemiripan

sebesar 0,80. Semakin tinggi jarak koefisien kemiripan maka semakin mendekati kemiripan dengan tetuanya.

Pada sub cluster A1, B1, C1, D1, dan E1 memiliki jarak koefisien kemiripan 0,902 atau tingkat kemiripan 90,2%. Hal ini dikarenakan pada masing-masing sub cluster hanya memiliki satu karakter yang berbeda. Contohnya pada sub cluster A1 hanya berbeda pada tampak melintang axis. Pada FS 1 memiliki penampakan melintang axis bulat sedangkan pada FS 8 memiliki tampak melintang axis tidak beraturan. Pada sub cluster B1, perbedaan terdapat pada bentuk anak tulang yaitu pada FS 6, FS 17, FS 26 memiliki bentuk anak tulang daun melengkung atau kurva. FS 41 memiliki bentuk anak tulang daun lurus. Pada sub cluster C1, perbedaan terdapat pada kerekatan antar juring. Pada FS5, FS71, FS96, FS112 memiliki keamatan antar juring sangat rekat sedangkan pada FS11, FS12, FS18, FS19, FS21, FS30, FS83, FS97, FS103 memiliki kerekatan antar juring tidak lekat.

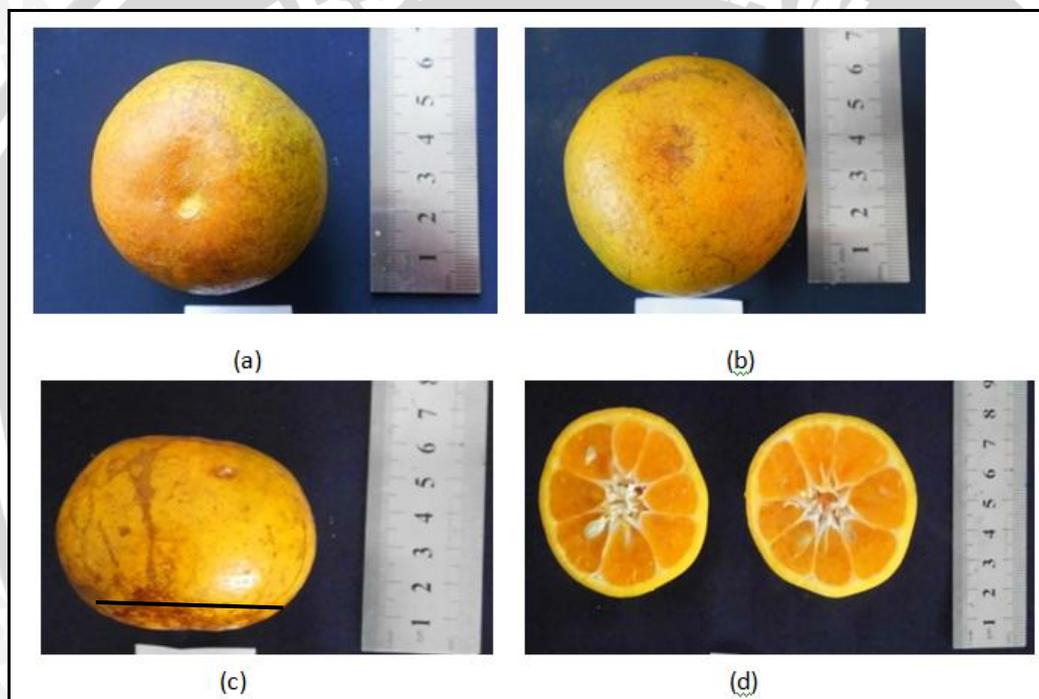
Persamaan cluster B dengan C1 (Cluster C) ialah 1) axis buah tidak beraturan, 2) keseragaman warna pulp seragam, 3) warna daun hijau tua, 4) tipe daun tunggal, 5) sayap daun tanpa sayap. Cluster C dengan D1 (cluster memiliki persamaan karakter yaitu 1) axis buah tidak beraturan, 2) keseragaman warna pulp seragam, 3) tipe daun tunggal, 4) sayap daun tidak ada.

Pada satu sub cluster D1, contohnya antara FS 87 dengan Siam Madu memiliki persamaan. Persamaan tersebut meliputi: 1) karakter kerekatan antar juring sangat rekat, 2) keamatan epicarp pada mesocarp lemah, 3) axis buah berlubang, 4) tampak melintang axis bulat/lingkaran 50 keseragaman warna pulp seragam, 6) warna daun hijau tua 7) Tipe daun tunggal, 8) tanpa sayap daun, 9) bentuk anak tulang daun lurus.

Persamaan antara cluster D dengan E3 (cluster E) ialah pada karakter 1) keseragaman warna pulp seragam, 2) tipe daun tunggal, 3) sayap daun tidak ada. Persamaan antara cluster E dengan FS69 ialah 1) Warna kulit hijau kekuningan, 2)Warna daun hijau tua, 3) tipe daun tunggal, 4) sayap daun tidak ada. Cluster F dengan G1 (cluster G) memiliki koefisien kemiripan 0,59 atau tingkat kedekatan 59%. Persamaan karakter pada cluster G ialah 1) warna daun hijau muda, 2) sayap daun tidak ada.

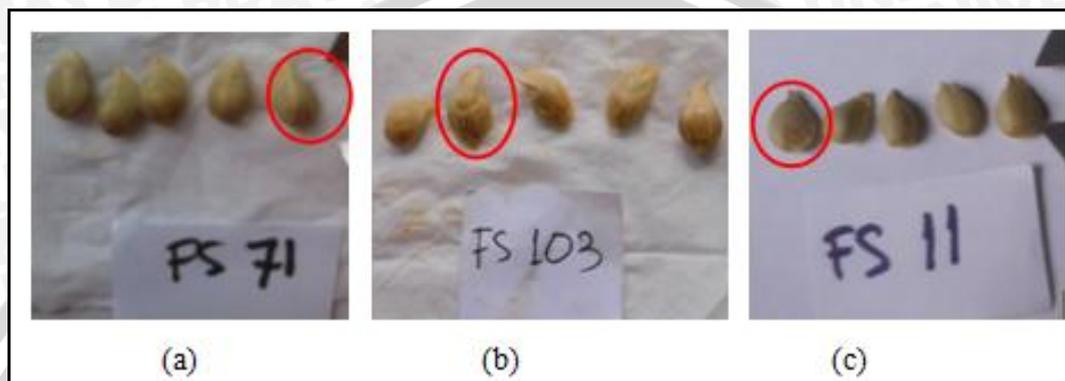
4.1.3 Analisis Karakter Kualitatif non Clustering

Karakter kualitatif buah yang diamati diantaranya ialah bentuk buah. Bentuk buah yang paling banyak ialah spheroid. Pangkal buah rata-rata memiliki bentuk truncate. Bentuk ujung buah yang paling banyak dijumpai ialah bentuk truncate. Bentuk buah, pangkal buah dan ujung buah dapat dilihat pada gambar 13. Pada pengamatan permukaan kulit buah, didominasi oleh permukaan kulit buah bertekstur halus. Sedangkan untuk warna pulp didominasi warna orange. Pada karakter tekstur pulp, sebagian besar memiliki tekstur pulp lembut. Namun beberapa juga memiliki karakter tekstur pulp yang keras seperti pada FS 56, FS 76, FS 1, FS 6, FS 87, FS I2, FS 57.



Gambar 13. Buah berbentuk spheroid (a) pangkal buah berbentuk truncate (b) ujung buah berbentuk truncate (c) warna orange pada pulp buah (d)

Pada pengamatan biji, karakter yang diamati diantaranya ialah bentuk biji. Karakter bentuk biji pada bahan pengamatan memiliki bentuk yang beragam. Pada jeruk hasil fusi protoplas, bentuk biji dari tanaman fusan ialah ovoid, semi-deltoid dan sferoid. Pada tanaman fusan, banyak dijumpai biji dengan bentuk sferoid. Sedangkan untuk karakter tekstur permukaan biji ialah halus, warna biji krem dan warna kotil hijau. Meski demikian, beberapa dijumpai dalam bentuk lainnya.



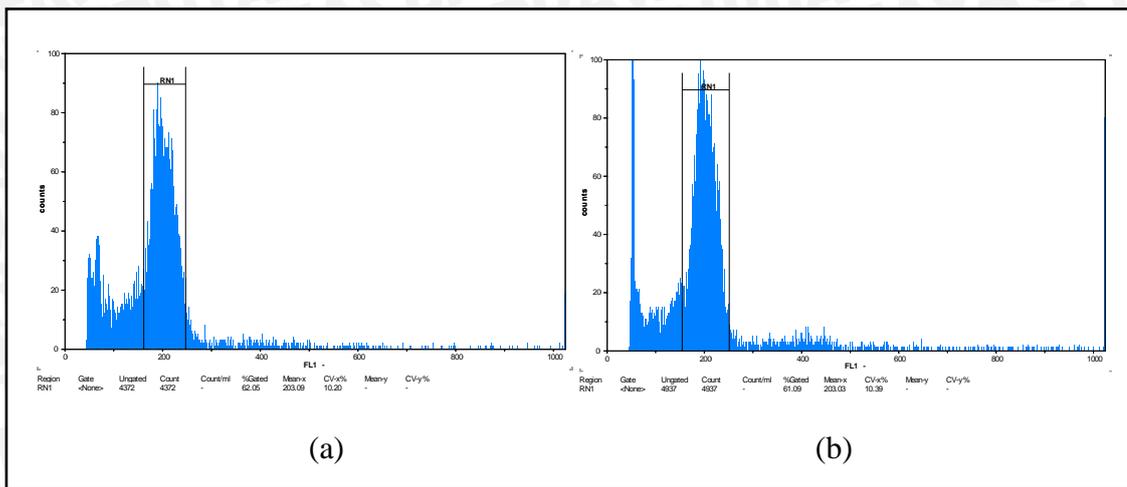
Gambar 14. Biji jeruk fusan berbentuk ovoid (a) biji berbentuk semi-deltoid (b) biji berbentuk sferoid (c)

4.1.4 Identifikasi Ploidi Menggunakan Flowcitometry

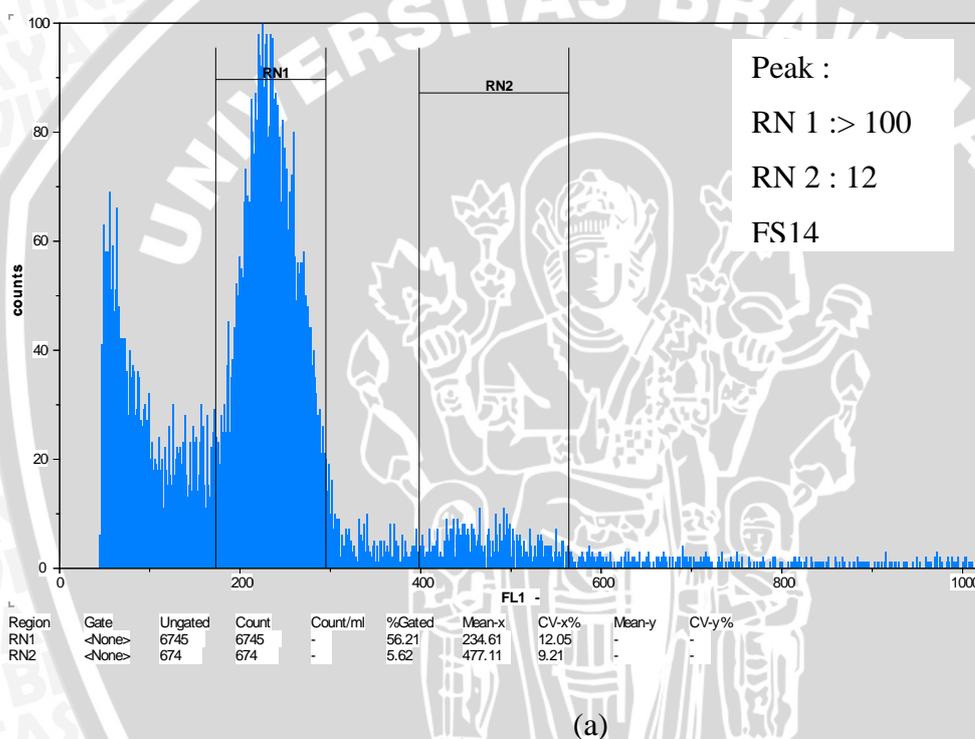
Identifikasi ploidi pada jeruk hasil fusi protoplas dapat diinterpretasikan dengan menggunakan alat flowcitometry. Bahan pengamatan untuk analisa ploidi ialah tanaman jeruk fusan dan ploidi pada 35 tanaman fusan memiliki peak yang beragam. Peak atau puncak masing-masing tanaman berbeda.

Pendekatan yang dilakukan untuk mengidentifikasi ploidi ialah dengan menggunakan peak yang terlihat pada histogram. Perbandingan peak yang tertinggi dengan terendah merupakan hasil dari identifikasi menggunakan flow citometry. Beberapa sampel tidak dapat muncul pada grafik analisa ploidi. Hal ini disebabkan oleh adanya sampel yang tidak terbaca oleh alat flowcitometry.

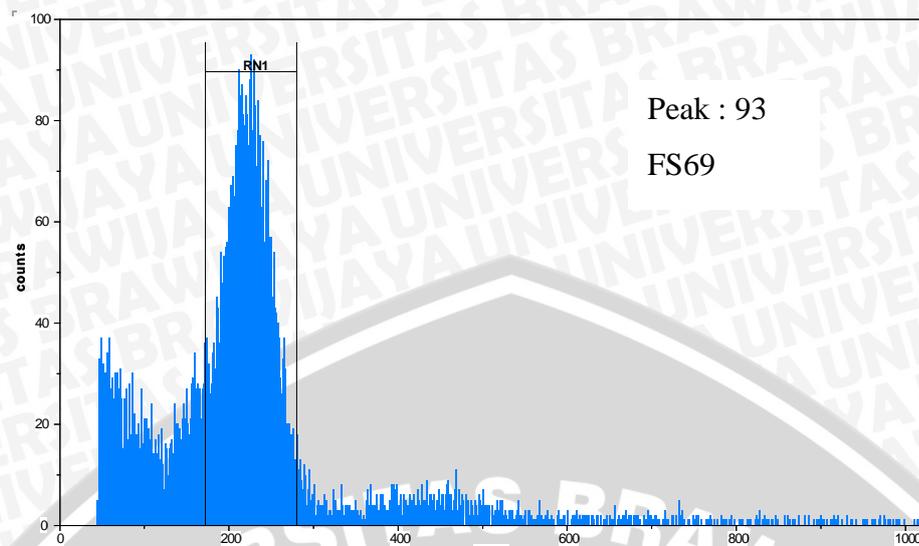
Pada hasil flowcitometry, gate 200 menunjukkan diploid. Sedangkan pada gate 400 menunjukkan tetraploid. Pada FS 14, terdapat dua gate. Gate 1 berada di kisaran 200 dan kedua di kisaran 400. Untuk peak pada FS14, memiliki peak 100 dan 12. Selain FS 14, tanaman fusan yang tergolong tertraploid ialah FS69. Pada FS 31 termasuk diploid.



Gambar 11. Hasil Flowcitometri Diploid FS 31(a) Flowcitometri Kontrol 2n(b)



(b)



Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	Mean-x	CV-x%	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	5568	5568	-	56.64	223.70	11.07	-	-

(c)



(d)

Gambar 15. Hasil Flowcitometry FS 14 Tetraploid (a) Jeruk FS14 (b) Flowcitometry FS 69 Tetraploid (c) Jeruk FS 69 (d)

4.2 Pembahasan

4.2.1 Karakter Morfologi Daun dan Buah Jeruk Tanaman Fusan

Fusi protoplasma antara jeruk Siam Madu dengan Satsuma Mandarin bertujuan untuk mendapatkan Jeruk Siam Madu tanpa biji dengan rasa yang enak. Selain itu, tujuan penelitian juga ingin mendapatkan karakter morfologi buah yang mudah dikupas dan warna yang menarik.

Beberapa karakter morfologi yang diamati yaitu bentuk buah, bentuk pangkal buah, bentuk ujung buah, warna kulit, permukaan kulit, warna daging kulit, warna pulp, tekstur pulp, cita rasa juice, kadar juice dan sebagainya. Karakter kualitatif pada daun ialah warna daun, tipe daun, sayap daun, bentuk sayap, tepi daun dan bentuk anak tulang daun.

Pada pengamatan cita rasa jus, cita rasa jus pada jeruk fusan yang paling dominan ialah cita rasa yang termasuk dalam katagori bagus (enak) (lampiran 4). Hal ini sesuai dengan yang diharapkan oleh peneliti bahwa tanaman fusan memiliki karakter rasa yang enak. Pada hasil pengamatan karakter morfologi buah, dapat digolongkan dalam kelompok yang identik dengan Siam Madu dan kombinasi antara Siam Madu dengan Satsuma Mandarin. Pada buah, tidak ada yang identik dengan Satsuma Mandarin. Karakter tersebut tersaji dalam tabel berikut :



Tabel 6. Pengamatan karakter morfologi buah pada tanaman fusan

Asesi	Warna kulit buah	Kerekatan antar juring	Keeratan epicarp	Axis buah	Tampak melintang axis	Keseragaman warna pulp	Ket
Satsuma Mandarin	Oranye	Sangat rekat	Lemah	Berlubang	Bulat	Seragam	Tetua
Siam Madu	Hijau kekuningan	Tidak rekat	Lemah	Berlubang	Bulat	Seragam	Tetua
FS1, FS2, FS101	Hijau kekuningan	Tidak rekat	Lemah	Berlubang	Bulat	Seragam	Identik Siam
FS8, FS9, FS11, FS12, FS18, FS19, FS20, FS 21, FS22, FS23, FS24, FS27, FS30, FS56, FS57, FS64, FS76, FS 83, FS84, FS 97, FS 103, FS107, FS12	Hijau kekuningan	Tidak rekat	Lemah	Berlubang	Tak beraturan	Seragam	Kombinasi
FS29	Hijau kekuningan	Tidak rekat	Kuat	Berlubang	Tak beraturan	Seragam	Kombinasi
FS6, FS17, FS26, FS41	Orange	Tidak rekat	Lemah	Berlubang	Tak beraturan	Seragam	Kombinasi
FS87	Orange	Tidak rekat	Lemah	Berlubang	Bulat	Seragam	Kombinasi
FS4, FS7, FS32, FS49	Hijau kekuningan	Sangat rekat	Kuat	Berlubang	Tak beraturan	Seragam	Kombinasi
FS5, FS14, FS31, FS71, FS96, FS112	Hijau kekuningan	Sangat rekat	Lemah	Berlubang	Tak beraturan	Seragam	Kombinasi
FS10, FS80	Hijau kekuningan	Sangat rekat	Lemah	Berlubang	Bulat	Seragam	Kombinasi
FS58	Orange	Sangat rekat	Lemah	Padat	Bulat	Seragam	Kombinasi
FS69	Hijau kekuningan	Tidak rekat	Kuat	Berlubang	Bulat	Tidak seragam	Kombinasi

Dari tabel diatas, buah yang identik dengan Siam Madu tidak dipilih atau tidak digunakan untuk seleksi selanjutnya. Berdasarkan tabel 6, diperoleh karakter buah tanaman fusan yang diinginkan yaitu pada FS87. Karakter FS87 merupakan kombinasi antara Siam Madu dengan Satsuma Mandarin. Karakter tersebut meliputi warna kulit buah orange, kerekatan antar juring tidak rekat, keeratan epicarp pada mesocarp lemah, axis buah berlubang, tampak melintang axis bulat, keseragaman warna seragam. Selain FS87, pada FS6, FS17, FS26, FS41, FS58 juga dapat dijadikan rekomendasi untuk bahan seleksi berikutnya karena memiliki karakter warna kulit orange dan keeratan epicarp lemah.

Salah satu faktor untuk meningkatkan nilai jual yaitu karakter warna buah. Warna buah orange dianggap lebih menarik. Warna orange pada FS87, FS6, FS17, FS26, FS41, FS58 diperoleh dari karakteristik warna kulit buah pada Satsuma mandarin. Menurut Soesono (1983), jeruk Satsuma Mandarin memiliki warna kulit buah kuning jingga atau orange.

Selain warna buah, keeratan epicarp juga menjadi salah satu karakter yang diinginkan. Keeratan epicarp berhubungan dengan mudah atau tidaknya buah untuk dikupas. Menurut Spiegel Roy dan Goldschmidt (1996), karakter pada Satsuma mandarin yaitu mudah dikupas dan memiliki warna menarik tetapi rasanya kurang menarik.

Pada pengamatan karakter kuantitatif biji, biji bernas pada FS 58, FS 41, FS7 dan FS 96 berkisar antara 1- 4 biji. Tanaman fusan yang memiliki jumlah biji <5 dapat dikategorikan sebagai *seedless*. Dari data tersebut, tanaman fusan FS 58, FS 41, FS 7 dan FS 96 dapat digolongkan kedalam kelompok *seedless*. Menurut Spiegel Roy dan Goldschmidt (1996), Satsuma Mandarin memiliki sifat partenokarpi yang tinggi (*seedless*) secara alami. Menurut Husni (2010) Mandarin Satsuma (*C. unshiu* Marc.) adalah merupakan jenis jeruk yang secara alami mempunyai sifat *seedless* dan telah terbukti bahwa sifat *seedless* yang terdapat pada jeruk Mandarin Satsuma disebabkan oleh polennya yang steril (male sterility) yang biasa disebut dengan istilah MS.

Pada pengamatan karakter morfologi daun ditinjau dari karakter kualitatif, terdapat dua kelompok besar. Kelompok yang identik dengan Siam Madu dan kombinasi antara Siam madu dengan Satsuma Mandarin ditampilkan pada tabel berikut:

Tabel 7. Karakter morfologi daun berdasarkan karakter kualitatif

Asesi	Warna daun	Tipe daun	Sayap daun	Bentuk anak tulang daun	Ket
Satsuma Mandarin	Hijau tua	Daun tunggal	Bersayap	Melengkung	Tetua
Siam Madu	Hijau tua	Daun tunggal	Tanpa sayap	Lurus	Tetua
FS1, FS2, FS4, FS6, FS 7, FSI2, FS101, FS107, FS84, FS76, FS64, FS58, FS56, FS57, FS32, FS31, FS27, FS24, FS22, FS20, FS23, FS17, FS14, FS29, FS26, FS10, FS9, FS8, FS80	Hijau tua	Daun tunggal	Tanpa sayap	Melengkung	Kombinasi kedua tetua
FS5, FS11, FS112, FS 103, FS97, FS87, FS83, FS96, FS71, FS69, FS12, FS49, FS41, FS30, FS18, FS19, FS 21	Hijau tua	Daun tunggal	Tanpa sayap	Lurus	Identik Siam Madu

Pada pengamatan karakter morfologi daun, tanaman FS1, FS2, FS4, FS6, FS 7, FSI2, FS101, FS107, FS84, FS76, FS64, FS58, FS56, FS57, FS32, FS31, FS27, FS24, FS22, FS20, FS23, FS17, FS14, FS29, FS26, FS10, FS9, FS8, FS80 memiliki karakter kombinasi. Karakter tersebut meliputi warna daun hijau tua, tipe daun tunggal, sayap daun tidak ada, bentuk anak tulang daun melengkung. Pada daun tanaman fusan, tidak dijumpai sayap daun.

Pada karakter kuantitatif buah dan daun, pengamatan meliputi diameter buah, tebal kulit, panjang daun dan lebar daun. Dari hasil pengamatan karakter kuantitatif, dapat diketahui bahwa FS 1 memiliki ketebalan yang tipis yaitu 2,7 mm (identik dengan Siam Madu), diameter buah termasuk kedalam tipe Satsuma Mandarin yaitu 7,6 cm dan termasuk berukuran besar. Sedangkan panjang daun,

termasuk kedalam golongan Satsuma Mandarin yaitu 4,81 cm. Lebar daun termasuk diluar golongan tersebut yaitu 2,41 cm. Pada FS 27 juga memiliki diameter yang termasuk kedalam tipe Satsuma Mandari yaitu 6,73 cm. untuk tebal kulit, termasuk kedalam tipe Siam Madu yaitu 2 mm. Sedangkan untuk panjang daun termasuk dalam tipe Satsuma Mandarin yaitu 5,13 cm dan lebar daun termasuk tidak dalam kedua golongan tersebut yaitu 2,83 cm. Pada pengamatan karakter kuantitatif lebih ditekankan pada diameter, tebal kulit, panjang dan lebar daun.

Jika kombinasi karakter kualitatif dan kuantitatif digabungkan menjadi salah satu acuan maka, FS 41 telah memenuhi syarat yaitu memiliki warna orange, kerekatan antar juring tidak rekat, keamatan epicarp pada mesocarp lemah, axis buah berlubang, tampak melintang axis tidak beraturan, keseragaman warna seragam, warna daun hijau tua, tipe daun tunggal, sayap daun tidak ada, bentuk anak tulang daun lurus, tebal kulit tipis (1,8 mm), diameter buah 5,42 cm, panjang daun termasuk tipe Satsuma (4,14 cm), lebar daun termasuk tidak di kedua golongan 2,33 cm.

Pada pengamatan, ditemui kombinasi antara Siam Madu dengan Satsuma Mandarin. Kombinasi tersebut dapat diakibatkan dari sifat fusi protoplas yang beragam. Menurut Bhojwani and Razdan (1996) dalam Rostiana,O., (2006) fusi protoplas dari genotipe yang berbeda dapat menghasilkan hibrida somatik dengan tiga kategori yaitu, 1. hibrida simetris dimana kedua inti dari dua tetua bergabung secara sempurna 2. hibrida asimetris, dimana hanya sebagian saja inti dari salah satu tetua bergabung dengan inti tetua lainnya. 3. Cybrid, dimana inti dari salah satu tetua terakumulasi di dalam gabungan protoplas kedua tetua. Oleh karena itu, variasi rekombinan sifat genetik di dalam tanaman hasil fusi akan sangat beragam dalam frekuensi yang berbeda

Tabel 8. Karakter kuantitatif daun dan buah tanaman fusan

Tebal Kulit (mm)			diameter melintang (cm)			Panjang daun (cm)			Lebar daun (cm)		
Siam	Satsuma	Tidak	Siam	Satsuma	Tidak	Siam	Satsuma	Tidak	Siam	Satsuma	Tidak
1,7-4	4,35– 7,15	keduanya <1,7	5- 6.7	6.7– 9.55	keduanya <5	6,1 – 8	4-6	keduanya < 4	3 – 4	ma- 1,5-4	keduanya <5
Asesi			Asesi			Asesi					
FS 1, FS 2 FS 26, FS 2, FS 69, FS 96, FS 14, FS 41, FS 27	FS 10, FS107	FS 101, FS 103, FS 11, FS 112, FS 12, FS 18, FS 19, FS 2, FS 21, FS 22, FS 23, FS 29, FS 30, FS 31, FS 32, FS 4, FS 49, FS 5 FS 56, FS 57, FS 58, FS 6, FS 64, FS 7, FS 71, FS 76, FS 8, FS 80, FS 83, FS 84, FS 87, FS 9, FS 96, FS 97, FS I2	FS 101, FS 87, FS 57, FS24, FS 96, FS 56, FS 4, FS 103, FS 97, FS 23, FS76, FS 14, FS 11, FS 8, FS 32, FS 41, FS26, FS 80, FS I2, FS 18, FS 112, FS 84, FS 71, FS 2,	FS 1, FS 19, FS 31, FS 9, FS 5, FS 20, FS 58, FS 17, FS 30, FS 107, FS 10, FS 83, FS 29, FS 21, FS22, FS 49	FS 56, FS 103, FS 4, FS 69, FS 76, FS 14, FS 58, FS 41, FS 17, FS 6, FS 80, FS 30, FS 107, FS 18, FS 26, FS21, FS 2 87, FS I2, FS 57, FS 64, FS 69, FS96, FS 112, FS 71, FS 83, FS 29, FS 22	FS 97, FS 19, FS 23, FS 56, FS 9, FS 5, FS 8, FS 20, FS 2, FS 32, FS 41, FS 12, FS 18, FS 26, FS 27, FS 80, FS 30, FS 107, FS 10, FS 101, FS 87, FS I2, FS 57, FS 64, FS 24, FS 96, FS 18, FS 112, FS 84, FS 71, FS 83, FS 29, FS 21, FS 22, FS 2, FS 7, FS 49					

4.2.2 Karakter Ploidi Berdasarkan Flowcitometry

Jaringan tanaman yang digunakan untuk isolasi protoplas bervariasi. Umumnya jaringan muda dari tanaman yang mempunyai umur fisiologis yang muda seperti pucuk muda (dari kecambah, bibit, planlet). Protoplas dari jaringan dinding selnya masih sederhana yang terdiri dari sel primer atau belum berlignin.

Langkah awal untuk menentukan tanaman fusan mengalami fusi atau tidak, dapat diketahui dengan menggunakan flowcitometry. Menurut Xu *et al.* (2006), untuk mengidentifikasi hibrida somatik pada tahap awal dapat dilakukan dengan menentukan tingkat ploidi secara cepat dengan Flowcytometry.

Pada kontrol $2n$ memiliki peak 90 dan berada di gate 200 sehingga tergolong diploid. Sedangkan untuk tanaman fusan yang memiliki peak lebih dari 100 dan berada di gate 400 dapat dikategorikan sebagai tetraploid. FS31 berada pada gate 200 disebut diploid, sedangkan FS69 dan FS14 tetraploid karena berada pada gate 400. Namun demikian perlu diuji lebih lanjut pada pengamatan jumlah kromosom. Sehingga dapat diketahui jumlah kromosom tanaman tersebut.

Pada tanaman diploid, yaitu tanaman kontrol disebut tanaman yang fertil (dapat menghasilkan biji). Menurut Nurhasanah (2011), berdasarkan kemampuan tanaman memproduksi biji, tanaman diploid mampu menghasilkan biji. Tanaman tetraploid juga dapat menghasilkan biji namun memiliki kemampuan yang rendah. Sedangkan untuk tanaman yang dikategorikan haploid, tidak satupun yang fertil dan menghasilkan biji.

Menurut Husni (2010), Tipe hasil fusi protoplas biasanya menghasilkan beberapa macam tipe karena sel fusan yang dihasilkan tidak bersifat spesifik (random) sehingga tanaman yang dihasilkan melalui fusi protoplas mengandung variabilitas genetik yang tinggi. Variasi genetik yang tinggi dapat berasal dari regenerasi protoplas hasil fusi yang hetero, homo fusi, dan multi fusi. Selain itu variasi juga dapat disebabkan oleh terjadi penggabungan hanya pada sitoplasma saja yang biasa disebut sibirid atau terjadi akibat proses subkultur yang berulang pada saat kultur dan regenerasi.

Menurut Bhojwani dan Razdan (1996) dalam Martono (2009) bahwa variasi rekombinasi karakter genetik di dalam tanaman hasil fusi akan sangat

beragam dalam frekuensi yang berbeda. Variasi (keragaman) hibrida somatik dapat merupakan hasil dari satu atau ketiga mekanisme berikut:

1. Keragaman genetik akibat sub kultur kalus yang dilakukan terus menerus yang mengakibatkan suatu variasi somaklonal.
2. Ketidakstabilan dari kombinasi inti sel yang mengakibatkan hilangnya ekspresi gen atau hilangnya bagian dari informasi genetik.
3. Terjadinya segregasi dari inti atau sitoplasma setelah fusi yang menghasilkan kombinasi unik antara informasi genetik pada inti dan sitoplasma.

Tabel 9. Tipe Ploidi Tanaman Fusan

Asesi	Tipe ploidi
FS31, FS58, FS11, FS30, FS19, FS41, FS15, FS101, FS24, FS1, FS112, FS97, FS9, FS10, FS26, FS80, FS84, FS4, FS12, FS2, FS21, FS32, FS27, FS13, FS49, FS96, FS87, FS107, FS56, FS71, FS12, FS83	Diploid (2n)
FS69, FS14	Tetraploid (4n)



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Tanaman fusan yang tergolong *seedless* yaitu FS 58 (3 biji), FS 41 (4 biji), FS7 (1 biji) dan FS 96 (3 biji)
2. Berdasarkan karakter morfologi buah dan daun, kombinasi antara Siam Madu dan Satsuma Mandarin yang paling terlihat yaitu pada FS 41 dengan kriteria warna buah orange, keamatan spiepicarp pada mesocarp lemah, daun seperti Siam Madu, diameter buah, panjang daun, lebar daun yaitu :

FS 41 : warna orange, kerekatan antar juring tidak rekat, keamatan epicarp pada mesocarp lemah, axis buah berlubang, tampak melintang axis tidak beraturan, keseragaman warna seragam, warna daun hijau tua, tipe daun tunggal, sayap daun tidak ada, bentuk anak tulang daun lurus, diameter buah 5,42 cm, panjang daun termasuk tipe Satsuma (4,14 cm), lebar daun termasuk tidak di kedua golongan 2,33 cm.

5.2 Saran

Deteksi atau analisa ploidi, selain menggunakan flowcitometry, sebaiknya perlu dilakukan dengan mengamati jumlah kromosom.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2007. Syarat Tumbuh Jeruk [online]. Available at <http://teknisbudidaya.blogspot.com/2007/10/budidaya-jeruk> posted Okt 2007; verified 9 Maret 2013.
- Anonimous. 2012. JerukSiam Madu dan Mandarin Satsuma [online]. Available at <http://users.kymp.net/citruspages/mandarins>; verified 9 Maret 2013.
- Cai, Xiadong., Fu, Jing., and Deng, Xiu. 2007. Production and Molecular Characterization of Potential Seedless Cybrid Plants Between Pollen Sterile Satsuma Mandarin and Two Seedy Citrus Cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 90:275-283.
- Cheng, Y. J., Guo, Wen W., and Deng, Xiu, X. 2003. Molecular Characterization of Cytoplasmic and Nuclear Genomes in Phenotypically Abnormal Valencia Orange (*Citrus sinensis*) + Meiwa Kumquat (*Fortunella crassifolia*) Intergeneric Somatic Hybrids. *Plant Cell Rep.* 21(5):445-451.
- Departemen Pertanian. 1994. Penuntun Budidaya Buah-buahan (Jeruk). Direktorat Jenderal Pertanian Tanaman Pangan.
- Elord, Susan and Standsfield, Wiliam, D.2002. Schaums genetika. Erlangga. Jakarta.
- Fahn, A. 1991. Anatomi Tumbuhan (Terjemahan) Ed-3. Yogyakarta. Gajah Mada University Press.
- Goeorge, E. F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure – Background 1. *Plant Propagation by Tissues Culture* 3(1):1-28
- Grosser and Gmitter, F. G. 1990. Protoplast Fusion and Citrus Improvement. *Plant Breeding Reviews.* Portland, 10(8): 339-374.
- Guo, Wen Wu, Prasad D, Cheng Y, Serrano P, Deng Xiu Xen, and Grosser. 2004. Targeted Cybridization in Citrus: Transfer of Satsuma Cytoplasm to Seedy Cultivars for Potential Seedlessness. *Plant Cell Rep* 22:752-758.
- Husni, Ali. 2010. Fusi Protoplas Interspecies Antara Jeruk Siam Simadu (*Citrus Nobilis Lour.*) dengan Mandarin Satsuma (*C. Unshiu Marc.*) [online]. Available at <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/55022>. Verified 18 Juli 2016.
- Makmur, Amris. 1992. Pengantar Pemuliaan Tanaman. Rineka Cipta. Jakarta.
- Martono, B. 2009. Keragaman Genetik, Heritabilitas dan Korelasi antara Karakter Kuantitatif Nilam (*Pogostemon* sp.) Hasil Fusi Protoplas. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri* 15(1):9 – 15.
- Masnenah, Endeh. 2013. Perbaikan Sifat Genotipe Tanaman Melalui Fusi Protoplas [online]. Available at <http://www.e-journal.unbar.ac.id/>. Verified 20 Juli 2016.
- Mollers, C., S. Zhang, and G. Wenzil. 1992. The influence of silver thiosulfate on potato protoplast culture. *Plant Breed* 108(1):12-18.

- Narayanaswamy, S. 1994. Plant Cell and Tissue Culture. Tata McGraw-Hill Publishing Company. New Delhi.
- Nasir, M. 2001. Pengantar Pemuliaan Tanaman. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta.
- Daisy., Hendaryono dan Wijayanti, Ari. 2012. Teknik kultur jaringan. Kanisius. Yogyakarta.
- Purwito, A. 1999. Fusi Protoplas Intra dan Interspesies Pada Tanaman Kentang. Disertasi Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rochmah, S. 2001. Karakterisasi Morfologi dan Produksi Tanaman Hibrida Somatik dan Kultur Anther Hasil Fusi Antara Terung (*Solanum melongena* L) dengan Kerabat Liarnya. Skripsi. Jurusan Budidaya Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Hal 102.
- Rostiana, O. 2006. Peluang Pengembangan Bahan Tanaman Jahe Unggul Untuk Penanggulangan Penyakit Layu Bakteri. Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. Hal 77-98.
- Soesono, Slamet. 1983. Buah-buah di Kebun Rumah. PT Kinta. Jakarta.
- Spiegel-Roy, P., and Goldschmidt. 1996. Biology of Citrus. Cambridge University Press.
- Stansfield. 1991. Genetika. Erlangga. Jakarta.
- Soelarso. 1996. Budidaya Jeruk. Kanisius, Yogyakarta.
- Sukarmin dan F. Ihsan. 2008. Teknik Persilangan Jeruk (*Citrus* sp.) untuk perakitan varietas unggul baru. Bulletin teknik pertanian 13(1):12-15.
- Suryo. 2007. Sitogenetika. UGM Press. Yogyakarta.
- Tobing, Dedi M.A.L. 2013. Identifikasi Karakter Morfologi dalam Penyusunan Deskripsi Jeruk Siam (*Citrus nobilis*) di Beberapa Daerah Kabupaten Karo. Skripsi Universitas Sumatra Utara. Medan.
- Vandepoe, K. C. Simillion and Y. Van de Peer 2003. Evidence That Rice and Other Cereals Are Ancient Aneuploids. Plant Cell Rep. 15(9): 2192-2202.
- Verma, N., M.C. Bansal and V. Kumar. 2004. Protoplast Fusion Technology and Its Biotechnological Applications. Departement of Paper Technology, Indian Institute of Technology, Roorkee, Saharanpur.
- Widiyanti, Reni. 2010. Evaluasi Tanaman Jeruk Hasil Fusi Protoplas Berdasarkan Karakter Morfologi, Anatomi dan Sitogenetika. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Xu, X, Y., Liu J, H., and Deng, Xiu, X. 2006. Isolation of Cytoplasts from Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc) and Production of Alloplasmic Hybrid Calluse Via Cytoplast Protoplast Male Sterility. Plant Cell Rep. 25(6):533-539.
- Yamamoto. M and Shoso K. 1995. A Cybrid Plant Produced by Electrofusion Between Citrus *unshiu* and *C. sinensi*. Plant tissue Culture Letters 12 (2): 131-137.