

Tingkat Ploidi Kromosom Aksesori Pamelos (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) Berbiji dan Tidak Berbiji

A. Rahayu
Jurusan Agroteknologi
Universitas Djuanda
Jl Tol Ciawi 1, Kotak Pos Ciawi 35
Bogor 16720 Telp/Fax. 0251 8241732
Email:arifahrahayu@yahoo.co.id

I. S. Dewi
Balai Besar Penelitian dan
Pengembangan Bioteknologi dan
Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl Tentara Pelajar 3A Bogor 16111

S. Susanto, B. S. Purwoko
Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB
Jl Meranti Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

Kata kunci: diploid, pamelos, partenokarpik, ploidi, tidak berbiji

Abstrak

Salah satu faktor yang menyebabkan tanaman menghasilkan buah tidak berbiji (partenokarpik) adalah tingkat ploidi. Tanaman dengan set kromosom 3n akan menghasilkan buah tidak berbiji, sedangkan yang memiliki set kromosom 2n akan berbiji. Sebagian aksesori pamelos Indonesia tidak berbiji, tetapi belum diketahui set kromosomnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat ploidi aksesori pamelos berbiji dan tidak berbiji asal Sumedang, Kudus, Pati dan Magetan. Hasil penelitian menunjukkan baik aksesori pamelos berbiji maupun tidak berbiji memiliki kromosom diploid ($2n=18$).

PENDAHULUAN

Pamelos (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) berasal dari Malesia, kemudian menyebar ke Indo-Cina, Cina Selatan, Jepang Selatan, India Barat, Mediterania dan Amerika Tropik (Niyomdham 1992). Pusat produksi pamelos dunia terdapat di Cina bagian Selatan, Thailand, Vietnam, Malaysia, Indonesia, Taiwan dan Jepang (Hodgson 1967). Di Indonesia, sentra produksi pamelos utama terdapat di Kabupaten Magetan, sedangkan sentra produksi potensial antara lain di Kabupaten Sumedang, Pati, Kudus, Pangkajene dan Kepulauan (Sulawesi Selatan) dan Bireun (Aceh). Di sentra-sentra produksi tersebut, terdapat berbagai kultivar pamelos yang beragam bentuk, ukuran, warna, rasa buah dan jumlah bijinya. Aksesori pamelos memiliki jumlah biji beragam, mulai dari tidak berbiji hingga berbiji banyak (Ladaniya 2008). Buah tidak berbiji lebih banyak diminati oleh konsumen, karena biji menyebabkan rasa pahit dan merepotkan saat mengkonsumsi buah (Altaf dan Khan 2007), sehingga pengembangan jeruk diarahkan pada kultivar tidak berbiji.

Di antara faktor yang menentukan jumlah biji pada buah adalah tingkat ploidi. Hasil penelitian Frost (1925a) menunjukkan kultivar jeruk berbiji bersifat diploid, dengan jumlah kromosom $2n = 18$. Selain itu terdapat pula kultivar jeruk yang tetraploid (Frost 1925b) dan triploid. Tanaman triploid dapat diperoleh dari hasil persilangan antara tanaman diploid dengan tetraploid (Fatima *et al.* 2002), hibridisasi somatik antara kultivar diploid dan haploid (Kobayashi *et al.* 1997), kultur endosperma (Raza *et al.* 2003), iradiasi (Zhang *et al.* 1988) atau terbentuk secara spontan (Jaskani *et al.* 2007). Pada jeruk, triploid spontan juga terdapat pada bibit zigotik seksual (Raza *et al.* 2003).

Jeruk tidak berbiji di Indonesia kemungkinan terbentuk secara spontan, sebagai hasil persilangan alami antara kultivar diploid dan tetraploid atau mutasi alami, karena mutasi alami dan *sport* sering terjadi pada jeruk (Raza *et al.* 2003). Secara morfologi, terdapat perbedaan antara tanaman jeruk yang tetraploid, triploid dan diploid. Tanaman jeruk tetraploid tumbuh lebih cepat, memiliki daun lebih lebar, lebih tebal, dan berwarna lebih gelap dibanding tanaman triploid dan diploid (Usman *et al.* 2006). Embrio triploid dari spesies monoembrionik mudah diidentifikasi karena ukuran bijinya yang 1/3 sampai 1/6 kali lebih kecil dari biji diploid (Esen dan Soost 1971).

Analisis set kromosom diperlukan untuk mengetahui kemungkinan adanya aksesori tidak berbiji yang triploid, karena jumlah kromosom pada jeruk mempengaruhi pembentukan dan perkembangan biji. Tanaman jeruk triploid (3n) biasanya menghasilkan buah tidak berbiji (Toolapong *et al.* 1995). Kondisi triploid ini menyebabkan meiosis yang abnormal dan aborsi embrio (Zhu *et al.* 2009).

Set kromosom dapat diketahui dengan melakukan analisis kromosom dan melalui *flow cytometry*. Dengan cara ini diharapkan dapat diidentifikasi tingkat ploidi pamelos berbiji dan tidak berbiji.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Konfirmasi tingkat ploidi dengan analisis jumlah kromosom dilakukan di Laboratorium Mikroteknik, Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB pada bulan September 2010 sampai Pebruari 2011, dan analisis *flow cytometry* dilakukan di Laboratorium Genetika Tumbuhan, LIPI Biologi, Cibinong pada bulan Februari 2012.

Analisis Jumlah Kromosom

Bahan yang diperlukan ialah akar tanaman pamelos aksesori berbiji ('Muria Merah 2', 'Adas Duku', 'Sri Nyonya' dan 'Nambangan'), tidak berbiji ('Muria Merah 1' dan 'Bageng Taji'), bahan untuk analisis kromosom (8-Hydroxyquinolin 0.002 M, asam asetat 45 %, HCl 1 N, aseto orcein 2%). Alat yang digunakan berupa mikroskop Olympus BX41, gelas obyek dan penutup, pinset, *water bath*, alat fotografi.

Metode yang digunakan mengacu pada Sastrosumarjo (2006) yang telah dimodifikasi. Ujung akar tanaman pamelos dipotong sepanjang 0.5-1.0 cm dan segera dimasukkan ke dalam larutan 0.002 M 8-hydroxyquinoline selama 3 jam pada suhu 4 °C. Akar tersebut dicuci dengan air, difiksasi dalam asam asetat 45% selama 10 menit pada suhu ruang. Berikutnya ujung akar dimasukkan ke dalam botol berisi campuran HCl dengan asam asetat 45% (3:1) selama 2 menit. Proses pelunakan (maserasi) akar dilakukan dengan memasukkan botol berisi akar ke dalam *water bath* dengan suhu 60 °C selama 2 menit. Ujung akar diletakkan di atas gelas obyek, dipotong bagian ujungnya 1-2 mm, ditetesi dengan aseto orcein 2 %, ditutup dengan gelas penutup, dilewatkan di atas api bunsen 2-3 kali. Gelas penutup diketuk dengan ujung pensil berkaret (*squash*), kemudian ditekan dengan ibu jari.

Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop pada perbesaran 1000x. Dari setiap individu tanaman dipilih beberapa sel yang menunjukkan fase metafase, karena pada fase ini kromosom tampak menyebar.

Analisis Flow Cytometry

Untuk mengkonfirmasi hasil analisis jumlah kromosom dilakukan analisis ploidi tanaman pamelos, menggunakan *Partec Flow Cytometry* (D-48161 Münster Jerman). Bahan tanaman yang digunakan berupa daun pamelos kelompok aksesori berbiji (Cikoneng ST, Jawa 2, Jawa 3, Magetan, Sri Nyonya, Adas Duku, Muria Merah 2), potensial tidak

berbiji (Nambangan, Bali Merah 1) dan tidak berbiji (Bali Merah 2, Bageng Taji dan Muria Merah 1).

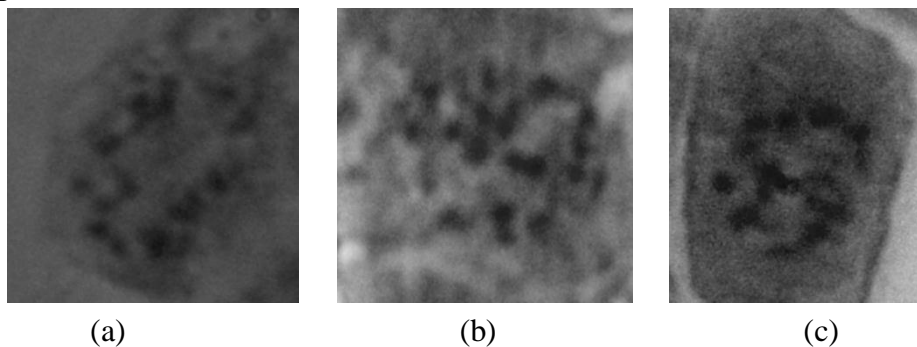
Kira-kira 0.5 cm² daun muda dicacah menggunakan silet tajam dalam cawan petri berdiameter 55 mm berisi 250 µl buffer ekstraksi Partec HR-A selama 30-90 detik. Hasil cacahan daun disaring dengan *Partec 50 µm Cell Trics disposable filter* ke dalam tabung kecil, kemudian ditambahkan larutan pewarna (dengan Propidium Iodida dan RNase) sebanyak 1.0 ml. Sampel tersebut diinkubasi di tempat gelap selama 30-90 menit, kemudian dianalisis di *flow cytometer*. Pengamatan dilakukan terhadap intensitas fluoresens relatif DNA total aksesori pamelos yang diamati.

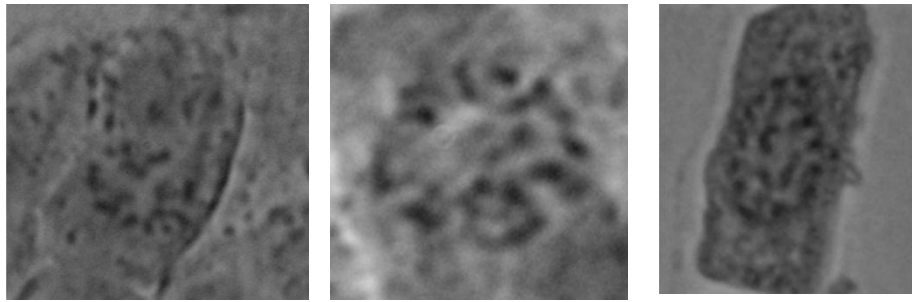
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan pada empat aksesori berbiji ('Sri Nyonya', 'Adas Duku', 'Muria Merah 2' dan 'Nambangan') dan dua aksesori tidak berbiji ('Bageng Taji' dan 'Muria Merah 1'), tidak menemukan aksesori dengan set kromosom triploid, tetapi seluruhnya diploid. Hal ini disebabkan terjadinya triploid alami pada jeruk amat langka, satu-satunya contoh kultivar komersial yang berasal dari triploid alami adalah jeruk nipis 'Tahiti' (*Citrus aurantifolia* Swing.) (Bosco *et al* 2007). Hasil penelitian Usman *et al.* (2006) pada bibit berasal dari biji berukuran kecil menunjukkan persentase triploid alami berkisar antara 7.33 % pada mandarin 'Feutrell's Early' sampai 15.45 % pada jeruk nipis Kaghazi.

Jumlah kromosom pada aksesori pamelos yang diamati adalah $2n=2x= 18$, kecuali pada 'Nambangan' diperkirakan $2n=2x=16$ (Gambar 1). Untuk mengkonfirmasi hasil penghitungan jumlah kromosom tersebut, dilakukan analisis ploidi menggunakan *flow cytometer*. Hasil analisis *flow cytometry* juga menunjukkan perbedaan intensitas fluoresens yang cukup besar antara 'Nambangan' dengan 'Sri Nyonya' dan 'Magetan', sedangkan antara 'Sri Nyonya' dengan 'Muria Merah 2', meskipun ada perbedaan intensitas fluoresens, tetapi tidak setajam 'Sri Nyonya'-'Nambangan' (Gambar 1, Tabel 1).

Diduga 'Nambangan' yang diamati mengalami aneuploidi, walaupun menurut Syukur (2006) peristiwa ini tidak terdapat dalam populasi alami. Jumlah kromosom aneuploid pada jeruk dijumpai pada *Citrus clementina* Hort. ex Tan. 'Clemenules' hasil kultur *in vitro*, yaitu $2n = 2x + 4 = 22$ (Aleza *et al.* 2009). Jumlah kromosom sel somatik pada jeruk {*Clausena lansium* (Lour.) Skeels} kultivar Yunan, selain diploid, juga ditemukan triploid dan aneuploid (Zhichang 2010). Yasuda *et al.* (2010) melaporkan pula adanya aneuploidi pada hasil persilangan diploid x diploid antara tangor 'Kiyomi' dan kumkuat 'Meiwa'. Hasil penelitian Zhu *et al.* (2009) menunjukkan tingkat ploidi bibit jeruk triploid citrus BHR (hasil persilangan antara diploid tangerine (*C. reticulata* cv. Bendizao) dan allotetraploid hibrida somatik HR (*C. sinensis* cv. Hamlin + *C. Jambhiri* cv. Rough Lemon) ada yang tetraploid, triploid, diploid, dan aneuploid ($2n = 21 = 2x+ 3$, $2n = 25 = 3x-2$, $2n = 24 = 3x-3$).





(d) (e) (f)

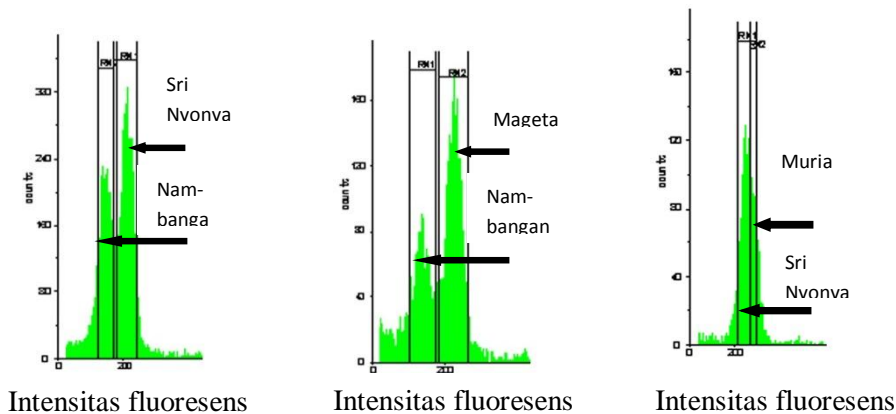
Gambar 1. Kromosom (a) ‘Sri Nyonya’, (b) ‘Muria Merah 2’, (c) ‘Adas Duku’, (d) ‘Bageng’, (e) ‘Muria Merah 1’ adalah $2n = 2x = 18$, sedangkan pada (f) ‘Nambangan’ adalah $2n = 2x = 16$.

Tabel 1. Hasil konfirmasi jumlah kromosom hasil analisis dengan metode Sastrosumarjo (2006) dan *flow cytometry*

| Kultivar | Intensitas fluoresens | Koefisien keragaman (%) | Jumlah kromosom |
|---------------|-----------------------|-------------------------|-----------------|
| Cikoneng ST | 213.11 | 7.25 | - |
| Jawa 2 | 185.66 | 8.96 | - |
| Magetan | 220.47 | 5.00 | - |
| Sri Nyonya | 208.23 | 4.00 | 18 |
| Adas Duku | 214.04 | 6.89 | 18 |
| Muria Merah 2 | 232.64 | 8.90 | 18 |
| Muria Merah 3 | 234.67 | 4.93 | - |
| Nambangan | 165.49 | 6.74 | 16 |
| Bali Merah 1 | 212.18 | 6.51 | - |
| Bali Merah 2 | 225.59 | 6.32 | - |
| Bageng | 193.50 | 4.63 | 18 |
| Muria Merah 1 | 226.75 | 6.57 | 18 |

Keterangan: - : Hasil analisis jumlah kromosom tidak bisa dihitung

Perbedaan kromosom pada jeruk juga dilaporkan oleh Kitajima *et al.* (2001), yang menunjukkan adanya perbedaan komposisi kromosom berdasarkan pola pita CMA (Chromomycin A3) antara bibit pamelo yang berasal dari biji dengan pohon induknya. Yamamoto *et al.* (2005) juga menyampaikan bahwa pola pita kromosom CMA pamelo dan kerabat dekatnya mempunyai 4-7 tipe kromosom A, B dan C.



Gambar 2. Hasil konfirmasi ploidi antar (a) ‘Nambangan’-‘Sri Nyonya’, (b) ‘Nambangan’- ‘Magetan’, dan (c) ‘Sri Nyonya’-‘Muria Merah 2’.

Sehubungan dengan jumlah kromosom yang hampir semuanya $2n=2x=18$, kecuali jika terjadi aneuploidi, maka poliploidi bukan penyebab pembentukan buah tidak berbiji pada pamelos.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa baik aksesori pamelos berbiji maupun tidak berbiji memiliki kromosom diploid ($2n=2x=18$).

DAFTAR PUSTAKA

- Aleza P, Juárez J, Hernández M, Pina JA, Ollitrault P, Navarro L. 2009. Recovery and characterization of a *Citrus clementina* Hort. ex Tan. 'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole Citrus genome sequence. *BMC Plant Biology* 9. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/9/110>.
- Altaf N, Khan AR. 2007. The seedless trait in kinnow fruit. *Pak. J Bot.* 39(6):2003-2008.
- Bosco SFD, Siragusa M, Abbate L, Lucretti S, Tusa N. 2007. Production and characterization of new triploid seedless progenies for mandarin improvement. *Scientia Horticulturae* 114:258-262.
- Esen A, Soost RK. 1971. Unexpected triploids in *Citrus*: Their origin, identification, and possible use. *J Hered.* 62:329-333.
- Fatima B, Usman M, Ramzan M, Khan MM, Khan IA. 2002. Interploidy hybridization of kinnow and sweet lime. *Pak J Agri Sci.* 39:132-134.
- Frost HB. 1925a. The chromosomes of citrus. *J. Washington Acad. Sci.* 15:1-3.
- Frost HB. 1925b. Tetraploidy in citrus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2:535-537.
- Hodgson RW. 1967. Horticultural Varieties of Citrus. Di dalam: Reuther W, Webber HJ and Batchelor ID, editor. *The Citrus Industry*. Vol. 1. Berkeley (US): Univ. of Calif. Press.
- Jaskani MJ, Khan IA, Khan MM, Abbas H. 2007. Frequency of triploids in different interploidal crosses of citrus. *Pak J Bot.* 39:1517-1522.
- Kitajima A, Befu M, Hidaka Y, Hotta T, Hasegawa K. 2001. A chromosome preparation method using young leaves of *Citrus*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 70: 191-194.
- Kobayashi S, Ohgawara T, Saito W, Nakamura Y, Omura M. 1997. Production of triploid somatic hybrid in citrus. *J Jpn. Soc Hort Sci.* 66 (34):453-458.
- Ladaniya, MS. 2008. *Citrus Fruit. Biology, Technology and Evaluation*. San Diego (US): Academic Press.
- Niyomdham C. 1992. *Citrus maxima* (Burm.) Merr. Di dalam: Verheij EWM and Coronel E, editor. *Edible Fruits and Nuts. Plant Resources of South-East Asia*. 2. Bogor (ID): Prosea Foundation.
- Raza H, Khan MM, Khan AA. 2003. Review. Seedlessness in citrus. *Int J Agric & Biol.* 5(3):388-391.
- Sastrosumarjo S. 2006. *Sitogenetika Tanaman*. Bogor (ID): Bagian Genetika dan Pemuliaan Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Syukur M. 2006. Variasi jumlah kromosom. Di dalam: Sastrosumarjo S, editor. *Sitogenetika Tanaman*. Bogor (ID): Bagian Genetika dan Pemuliaan Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Toolapong P, Komatsu H, Iwamasa M. 1995. Triploids from small seeds of polyembryonic citrus cultivars. *Proc. Sch. Agric. Kyushu Tokai Univ* 4:1-8.

- Usman M, Saeed T, Khan MM, Fatima B. 2006. Occurrence of spontaneous polyploids in Citrus. *Hort. Sci. (Prague)*. 33(3):124-129.
- Yamamoto M, Kubo T, Tominaga S. 2005. CMA banding patterns of chromosome of mid- and late-maturing citrus and acid citrus grown in Japan. *J Jpn Soc Hort Sci*. 74:476-478.
- Yasuda K, Yahata M, Komatsu H, Kurogi Y and Kunitake H. 2010. Triploid and aneuploid hybrids from diploid-diploid intergeneric crosses between citrus cultivar 'Kiyomi' tangor and Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) for seedless breeding of kumquats. *J Jpn Soc Hort Sci*. 79: 16–22.
- Zhang WC, Shao ZY, Lo JH, Deng CH, Deng SS, Wang F. 1988. Investigation and utilization of citrus varietal resources in China. Di dalam: Proc. 6th Int. *Citrus Cong*. 1: 291–294.
- Zhichang Z, Guibing H, Yangruo O, Yunchun L, Yang Y, Yeyuan Y. 2010. The earlier identification of the seedless characteristic of the wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] hybrid by a random amplified polymorphic DNA (RAPD) Marker. *African J Biotechnol*. 9:8578-8583.
- Zhu SP, Song JK, Hu ZY, Tan B, Xie ZZ, Yi HL, Deng XX. 2009. Ploidy variation and genetic composition of open-pollinated triploid citrus progenies. *Bot Studies*. 50:319-324.