

Perbandingan Pola Pita Isoenzim 15 Aksesori Pamelon (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) Berbiji dan Tidak Berbiji dan Hubungan Kekerbabatannya

Comparison of Isoenzyme Banding Patterns of Seeded and Seedless Pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) Accessions

Arifah Rahayu¹, Slamet Susanto^{2*}, Bambang S. Purwoko², dan Iswari S. Dewi³

Diterima 1 Desember 2011/Disetujui 12 Maret 2012

ABSTRACT

There are many pummelo accessions in Indonesia, some of them are seedless. The objective of this work was to compare isoenzyme banding patterns and to assess the genetic similarity of seeded and seedless pummelo accessions. Electrophoresis analysis of proteins extracted from leaf tissues was utilized to detect polymorphisms i.e. five isoenzymes (esterase (EST), peroxidase (PER), malate dehydrogenase (MDH), acid phosphatase (ACP) and aspartate amino transferase (AAT)). Based on principal component analysis, characters having the main role in classifying pummelo accessions were MDH (Rf 0.14 and Rf 0.27) and ACP (Rf 0.24 and Rf 0.33). The accessions showed high range genetic similarity (28.6-94.7%), and at similarity coefficient 0.53 they were classified into seeded and seedless groups. It was concluded that isoenzymes can be used as markers in differentiating seeded and seedless pummelo accessions.

Key words: genetic similarity, electrophoresis, marker, principal component analysis, polymorphism

ABSTRAK

Indonesia memiliki banyak aksesori pamelon, baik yang berbiji maupun tidak berbiji. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pola pita isoenzim dan mengetahui keanekaragaman genetik antar aksesori pamelon berbiji dan tidak berbiji. Analisis isoenzim untuk mendeteksi polimorfisme dilakukan dengan cara elektroforesis menggunakan lima sistem enzim, yaitu esterase (EST), peroksidase (PER), malat dehidrogenase (MDH), asam fosfatase (ACP) dan aspartat amino transferase (AAT). Hasil analisis komponen utama menunjukkan bahwa karakter yang berperan penting dalam pengelompokan aksesori pamelon adalah MDH (Rf 0.14 dan Rf 0.27) dan ACP (Rf 0.24 dan Rf 0.33). Tingkat kesamaan genetik aksesori pamelon berkisar antara 28.6-94.7%, dan pada koefisien kemiripan 0.53 aksesori pamelon dibedakan atas kelompok berbiji dan tidak berbiji. Dengan demikian isoenzim dapat digunakan sebagai penanda dalam membedakan aksesori pamelon berbiji dan tidak berbiji.

Kata kunci: kemiripan genetik, elektroforesis, penanda, analisis komponen utama, polimorfisme

PENDAHULUAN

Pamelon (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) merupakan spesies jeruk berukuran paling besar, dan populer di Cina bagian Selatan, Thailand dan negara-negara Asia Tenggara (Christmann, 2008), termasuk Indonesia (Morton, 1987). Selain ukuran buahnya yang khas, aksesori pamelon juga memiliki jumlah biji beragam, mulai dari tidak berbiji hingga berbiji banyak (Ladaniya, 2008). Buah tidak berbiji lebih banyak diminati

oleh konsumen, sehingga pengembangan jeruk diarahkan pada kultivar tidak berbiji.

Buah tidak berbiji dapat dihasilkan dengan cara pemuliaan, teknik budidaya dan secara alami. Melalui pemuliaan, buah tidak berbiji diperoleh dengan mengembangkan aksesori tidak berbiji melalui produksi bibit hibrida triploid (Yamashita, 1976), kultur endosperma (Raza *et al.*, 2003) dan melalui iradiasi untuk mendapatkan mutan (Sutarto *et al.*, 2009). Secara kultur teknik, buah tidak berbiji didapat dengan menggunakan zat pengatur tumbuh,

¹urusan Agronomi Universitas Djuanda, Jl Tol Ciawi 1, Kotak Pos Ciawi 35 Bogor 16720 Telp/Fax. 0251 8241732.

²Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB, Jl Meranti Kampus IPB Darmaga Bogor 16680. Email: slmtsanto@gmail.com

*penulis korespondensi

³Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl Tentara Pelajar 3A Bogor 16111

antara lain asam giberelin (Ben-Cheikh *et al.*, 1997), dan pengaturan penyerbukan pada tanaman yang bersifat *self-incompatible* (tidak serasi-sendiri) (Scheider *et al.*, 2009). Secara alami buah tidak berbiji dapat diperoleh dari tanaman yang bersifat partenokarpik, karena bakal buah mampu berkembang tanpa pembuahan pada bakal biji (Varoquaux *et al.*, 2000). Di samping itu buah tidak berbiji dapat diproduksi dengan memanfaatkan aksesori yang memiliki jantan atau betina steril (Yamamoto *et al.*, 1995), atau bersifat poliploid spontan (Fatima *et al.*, 2010). Jumlah biji pada jeruk juga dipengaruhi faktor lingkungan, yaitu waktu dan daerah penanaman (Yamamoto *et al.*, 1995). Buah pamelos yang dipetik pada panen raya berbiji lebih banyak dibanding hasil panen di luar musim (Niyomdham, 1992).

Salah satu upaya membedakan aksesori berbiji dan tidak berbiji adalah melalui analisis isoenzim. Berbagai penelitian telah menunjukkan, bahwa setiap isoenzim memiliki peranan khusus dalam lintasan metabolik dan bekerja secara selaras dengan enzim-enzim lain di dalam sel. Selain itu isoenzim juga dapat menunjukkan kekhususan jaringan atau organ (Zeidler, 2000). Penanda isoenzim juga menggambarkan ekspresi alela yang umumnya kodominan, bebas dari interaksi dan biasanya tidak berubah oleh pengaruh lingkungan (Shukor, 2001). Sejumlah isoenzim diketahui berasosiasi atau terkait dengan karakter agronomi, namun jumlah isoenzim yang terbatas membuat penggunaan isoenzim menjadi terbatas pula.

Analisis isoenzim telah secara luas digunakan untuk mengidentifikasi kultivar pamelos (Phan *et al.*, 2006), *Citrus junos* dan kerabat jeruk asam (Rahman *et al.*, 2001), nenas (Hadiati dan Sukmadjaja, 2002), dan padi (Abdullah, 2001). Analisis isoenzim juga digunakan untuk membedakan bibit jeruk triploid dan diploid (King *et al.*, 1996) dan batang bawah jeruk nuselar dan zigotik (Satrabhandhu *et al.*, 1996, Stykes, 2011). Kemampuan isoenzim dalam membedakan aksesori pamelos berbiji dan tidak berbiji belum diketahui. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian untuk melihat perbedaan pola pita isoenzim dan mengetahui hubungan kekerabatan antar aksesori pamelos berbiji dan tidak berbiji.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2011 di Laboratorium Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi IPB.

Bahan tanaman yang digunakan untuk analisis berupa daun muda pamelos aksesori berbiji (Cikoneng ST, Adas Duku, Magetan, Sri Nyonya, Jawa 2, Bali Putih, Jawa3, Gulung, Nambangan, Bali Merah 1, Pangkep Merah), dan aksesori tidak berbiji (Bali Merah 2, Bageng Taji, Jawa 1, Muria Putih) yang diperoleh dari hasil eksplorasi di sentra produksi pamelos di Kabupaten Sumedang, Pati, Kudus, Magetan dan Pangkajene dan Kepulauan (Sulawesi Selatan).

Teknik analisis isoenzim esterase (EST), malat dehidrogenase (MDH), peroksidase (PER), dan asam fosfatase (ACP) mengikuti cara Horry (1989), sedangkan aspartat amino transferase (AAT) atau glutamat oksaloasetat transaminase (GOT) menggunakan metode Wendel dan Weeden (1989). Elektroforesis menggunakan gel pati kentang model horizontal, dengan konsentrasi 10% pada suhu 4°C selama 4 jam untuk EST, MDH, PER dan ACP dan 5 jam untuk AAT dengan kuat arus stabil (0.25-0.26 mA). Tegangan yang digunakan 50 V pada 30 menit pertama, 100 V selama 1 jam berikutnya dan selanjutnya voltase dibuat tetap 150V.

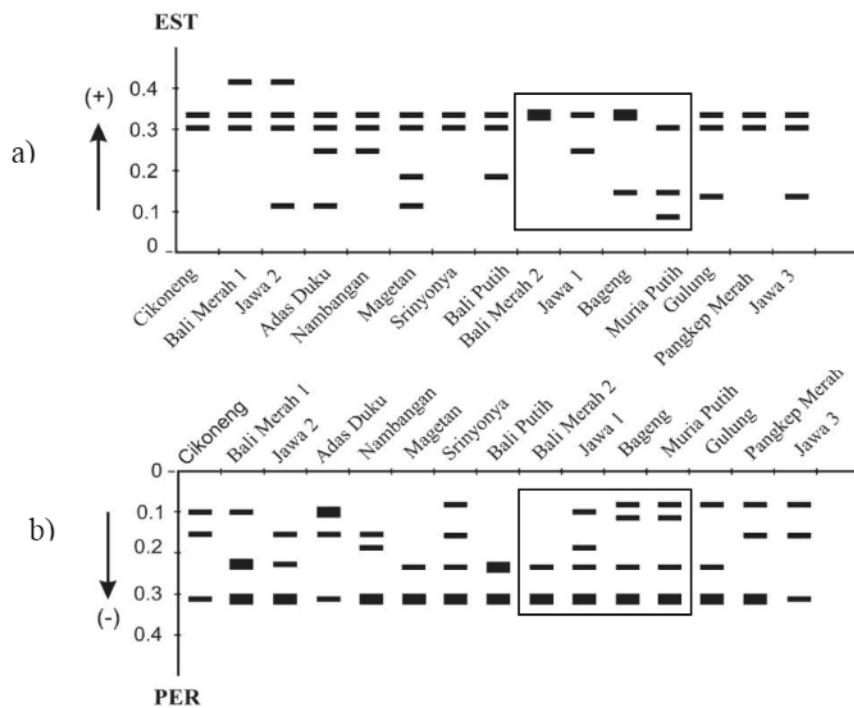
Analisis data pola pita isoenzim digambarkan zimogramnya berdasarkan pengukuran mobilitas pita (Rf) dan hanya pita yang stabil dan konsisten yang dipilih. Sistem enzim yang memperlihatkan keragaman dipakai untuk mengukur kemiripan genetika antar aksesori. Analisis kemiripan data isoenzim dilakukan melalui fungsi SIMQUAL (*Similarity for Qualitative Data*), sedangkan pengelompokan data matrik (*cluster analysis*) dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan fungsi SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested Clustering*) metode UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Arithmetic*), dan tingkat kepercayaan dendrogram ditentukan dengan fungsi MxComp menggunakan program *Numerical Taxonomy and Multivariate System* (NTSYSpc) versi 2.02 (Rohlf 1998). Analisis komponen utama dilakukan dengan mengekstrak nilai ragam dari *eigenvector* dan *eigenvalue* utama dengan tingkat keragaman paling tinggi menggunakan program Minitab 1.4.

HASIL DAN PEMBAHASAN

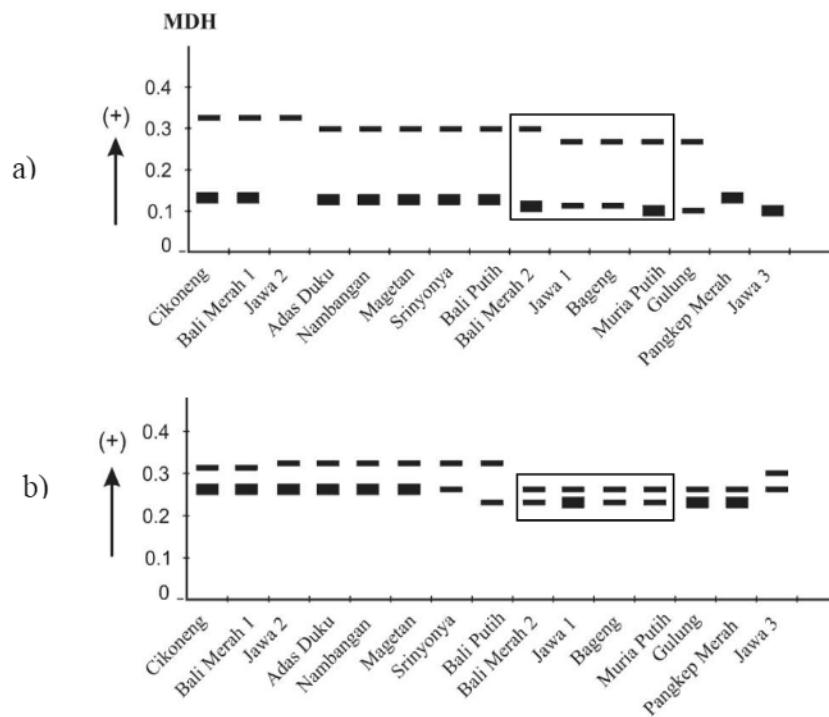
Hasil analisis pada 15 aksesi pamelو menunjukkan empat sistem enzim bersifat polimorfik, dengan tingkat polimorfisme tertinggi pada PER, diikuti EST, MDH dan ACP, sedangkan AAT bersifat monomorfik. Pada isoenzim EST dan PER distribusi pita menyebar antar berbagai aksesi pamelو (Gambar 1). Pada MDH dijumpai pita dengan nilai Rf 0.14 pada sebagian besar aksesi berbiji (Cikoneng ST, Bali Merah1, Jawa 2, Adas Duku, Nambangan, Magetan, Sri Nyonya, Pangkep Merah), dan pita bernilai Rf 0.27 pada sebagian besar aksesi tidak berbiji (Jawa 1, Bageng Taji dan Muria Putih). Pada ACP, pita dengan Rf 0.33 ditemukan pada sebagian aksesi berbiji (Jawa 2, Adas Duku, Nambangan, Magetan, Sri Nyonya), sedangkan pada aksesi tidak berbiji (Bali Merah 2, Jawa 1,

Bageng Taji, Muria Putih) dan Pangkep Merah didapat pita dengan nilai Rf 0.24 (Gambar 2).

Hasil analisis komponen utama (AKU) terhadap 15 aksesi pamelو, menunjukkan keragaman 70% dari 64 karakter baru diperoleh dari empat komponen utama. Dengan demikian terdapat empat karakter yang berperan terhadap pengelompokan aksesi pamelو, yaitu MDH (Rf 0.14), ACP (Rf 0.24), MDH (Rf 0.27) dan ACP (Rf 0.33). Hasil analisis komponen utama ini dipetakan pada Gambar 3, yang mengelompokkan aksesi pamelو atas berbiji dan tidak berbiji (kecuali 'Gulung'). Diduga 'Gulung' memiliki hubungan kekerabatan yang erat dengan aksesi pamelو tidak berbiji, karena berdasarkan analisis kemiripan dengan SIMQUAL juga didapatkan tingkat kemiripan yang tinggi antara 'Gulung' dengan aksesi tidak berbiji 'Muria Putih' (Tabel 1).



Gambar 1. Pola pita isoenzim a) EST dan b) PER pada aksesi pamelو berbiji dan tidak berbiji. Keterangan: zimogram dalam kotak, menunjukkan aksesi tidak berbiji

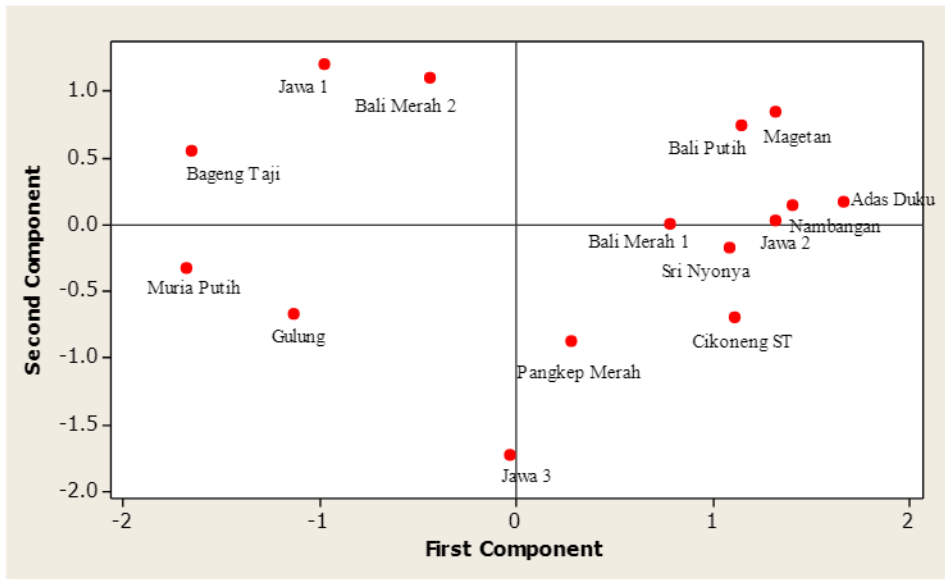


Gambar 2. Pola pita isoenzim a) MDH dan b) ACP pada aksesi pamelu berbiji dan tidak berbiji. Keterangan: zimogram dalam kotak, menunjukkan aksesi tidak berbiji

Tabel 1. Koefisien kemiripan antar 15 aksesi pamelu

Aksesi	C	BM1	J2	AD	N	M	SN	BP	BM2	J1	BT	MP	G	PM	J3
C	1.00														
BM1	0.84	1.00													
J2	0.63	0.70	1.00												
AD	0.70	0.57	0.76	1.00											
N	0.63	0.50	0.70	0.86	1.00										
M	0.53	0.60	0.80	0.76	0.70	1.00									
SN	0.56	0.53	0.74	0.70	0.74	0.74	1.00								
BP	0.56	0.63	0.74	0.70	0.74	0.95	0.78	1.00							
BM2	0.38	0.47	0.47	0.44	0.47	0.59	0.50	0.63	1.00						
J1	0.42	0.50	0.40	0.48	0.50	0.40	0.32	0.42	0.71	1.00					
BT	0.32	0.40	0.40	0.29	0.30	0.40	0.42	0.42	0.71	0.70	1.00				
MP	0.29	0.36	0.36	0.35	0.36	0.36	0.38	0.38	0.42	0.55	0.73	1.00			
G	0.42	0.50	0.50	0.38	0.40	0.50	0.53	0.53	0.59	0.60	0.70	0.73	1.00		
PM	0.71	0.56	0.67	0.63	0.67	0.56	0.71	0.59	0.53	0.44	0.56	0.50	0.67	1.00	
J3	0.56	0.42	0.53	0.50	0.53	0.42	0.56	0.44	0.38	0.32	0.42	0.48	0.74	0.71	1.00

Keterangan: C: Cikoneng ST, BM1: Bali Merah 1, J2: Jawa 2, AD: Adas Duku, N: Nambangan, M: Magetan, SN: Sri Nyonya, BP: Bali Putih, BM2: Bali Merah 2, J1: Jawa 1, BT: Bageng Taji, MP: Muria Putih, G: Gulung, PM: Pangkep Merah, J3: Jawa 3.
 Nama aksesi yang diarsir menunjukkan aksesi pamelu tidak berbiji.



Gambar 3. Analisis komponen utama kemiripan 15 aksesi pamelu menggunakan isoenzim yang dipetakan ke dalam bentuk dua sumbu komponen utama yang pertama.

Keterangan: ● aksesi berbiji, ○ aksesi tidak berbiji

Pengelompokan aksesi pamelu terbentuk pada tingkat kemiripan dengan kisaran 28.6-94.7% (Tabel 1). Dengan demikian keragaman antar aksesi pamelu cukup besar. Hal ini berkaitan dengan sifat reproduksi pamelu yang berbiji monoembrionik (Niyomdham, 1992), sehingga embrio yang didapat bersifat zigotik jeruk (Raza *et al.*, 2003), disamping hibridisasi dan adaptasi terhadap lingkungan. Keragaman genetik yang besar antar aksesi pamelu juga merupakan bahan dasar yang potensial untuk meningkatkan kualitas pamelu melalui seleksi untuk mendapatkan kultivar unggul.

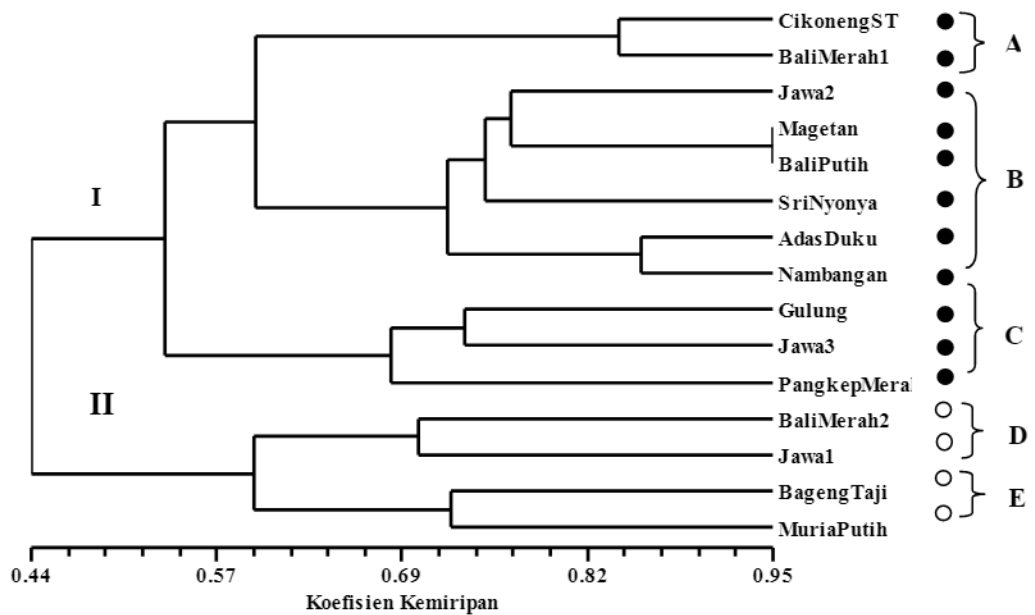
Tingkat kemiripan tertinggi dijumpai pada aksesi berbiji ‘Bali Putih’ dan ‘Magetan’ (94.7%), diikuti ‘Nambangan’ dan ‘Adas Duku’ (85.7%), ‘Cikoneng ST’ dan ‘Bali Merah 1’ (84.2%), ‘Jawa 2’ dan ‘Magetan’ (80.0%), ‘Sri Nyonya’ dan ‘Bali Putih’ (77.8%). Pada aksesi tidak berbiji diperoleh tingkat kemiripan 70.6% pada ‘Bali Merah 2’ dan ‘Jawa 1’ dan 72.7% pada ‘Muria Putih’ dan ‘Bageng Taji’ dan 70.6% pada ‘Bageng Taji’ dan ‘Bali Merah 2’. Dengan demikian berdasarkan pengelompokan yang diturunkan dari matriks kemiripan isoenzim tanaman pamelu, menunjukkan bahwa pengelompokan tidak selalu mengikuti daerah asalnya. Kemungkinan hal ini akibat hibridisasi alami antar aksesi. Selain itu aksesi yang dianggap sama oleh petani, seperti ‘Bali Merah’ dan ‘Jawa’, tetapi memiliki jumlah biji berbeda, ternyata berdasarkan isoenzim dapat dilihat perbedaan sifat genetiknya, sehingga dalam

dan memiliki keragaman genetik relatif lebih tinggi dibanding spesies jeruk lain, bila diperbanyak dari biji. Selain itu variabilitas genetik antar individu dalam populasi dan antar kultivar pada jeruk secara alami juga terjadi melalui mutasi dan seleksi (Hearn *et al.*, 1994), karena mutasi alami dan *sport* sering terjadi pada dendrogram berada pada kelompok berbeda (Gambar 4).

Analisis dengan program NTSYSpc menunjukkan nilai korelasi matriks kesamaan MxComp sebesar $r = 0.81$, dengan demikian dendrogram yang dihasilkan dianggap sesuai menggambarkan pengelompokan aksesi pamelu (Rohlf 1998). Hal ini menunjukkan, bahwa isoenzim, terutama MDH dan ACP dapat dijadikan penanda untuk membedakan antara aksesi pamelu berbiji dan tidak berbiji.

KESIMPULAN

Di antara ke lima sistem enzim, polimorfisme tertinggi dijumpai pada PER, diikuti oleh EST, MDH dan ACP, sedangkan AAT bersifat monomorfik. Berdasarkan analisis komponen utama karakter yang paling berperan dalam pengelompokan aksesi pamelu adalah MDH (Rf 0.14 dan Rf 0.27) dan ACP (Rf 0.24 dan Rf 0.33). Aksesi pamelu yang diamati memiliki kemiripan genetik dengan kisaran yang cukup lebar (28.6-94.7%). Pada koefisien kemiripan 0.53 aksesi pamelu dibedakan atas kelompok berbiji dan tidak berbiji. Pada



Gambar 4. Dendrogram 15 aksesii pamelu berbiji dan tidak berbiji.
Keterangan: ● aksesii berbiji, ○ aksesii tidak berbiji

koefisien kemiripan 0.67, aksesii pamelu berbiji diklasifikasikan atas tiga subkelompok (A, B dan C), dan aksesii tidak berbiji atas dua subkelompok (C dan D).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Kementerian Pertanian yang telah menyediakan dana penelitian ini melalui Program KKP3T (Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi) 2009.

DAFTAR PUSTAKA

Abdullah, B. 2001. The use of isozymes as biochemical markers in rice. *Bul AgroBio* 4(2):39-44.

Ben-Cheikh, W., J. Perez-Botella, F.R. Tadeo, M. Talon, E. Primo-Millo. 1997. Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of citrus. *Plant Physiol.* 114:557-564.

Christman, S. 2008. *Citrus maxima*. http://www.floridata.com/ref/C/citr_max.cfm. (17 Maret 2009).

Fatima, B., M. Usman, I.A. Khan, M.S. Khan, M.M.Khan. 2010. Exploring citrus cultivars for underdeveloped and shriveled seeds: a valuable resource for spontaneous polyploidy. *Pak. J. Bot.* 42(1): 189-200.

Hadiati, S., D. Sukmadjaja. 2002. Keragaman pola pita beberapa aksesii nenas berdasarkan analisis isozim. *J. Bioteknologi Pertanian* 2 (7):62-70.

Hearn, C.J. 1994. The evolution of citrus species - methods to develop new sweet orange cultivars. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 107:1-3.

Horry, J.P. 1989. The genetic structure of wild and cultivated bananas as perceived through isozymes variation. *In* J.P. Horry (Ed.) *Chemiotaxonomie et Organization Genetic dans Le Genre Musa*. Universite De-Paris-SUD, Centre D’Orsay.

King, B.J, L.S. Lee, P.T. Scott. 1996. Identification of triploid citrus by isozyme analysis. *Euphytica* 90(2):223-231.

Morton, J.F. 1987. Pummelo. p. 147-151. *In* J.F. Morton. *Fruits of Warm Climates*.

- www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/pummelo.html. 15 Agustus 2012.
- Niyomdham, C., 1992. *Citrus maxima* (Burm.) Merr. p. 128-131. In E.W.M. Verheij and E. Coronel (Eds). Edible Fruits and Nuts. Plant Resources of South-East Asia. 2. Prosea Foundation, Bogor.
- Phan, T.T, P.D. Nguyen, T.M. Nguyen.. 2006. Identification of pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) cultivars using isozyme electrophoresis. Meded RijksUniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet. 67(1):13-9.
- Rahman, M.M., N. Nito, S. Isshiki. 2001. Cultivar identification of 'Yuzu' (*Citrus junos* Sieb. Ex tanaka) and related acid citrus by leaf isozymes. Scientia Horticulturae 87:191-198.
- Raza, H., M.M. Khan, A.A. Khan. 2003. Review. Seedlessness in citrus. Int. J. Agric. & Biol. 5 (3):388-391.
- Rohlf, F .J. 1998. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.02. Exeter Publications, New York, USA.
- Satrabhadhu, A., O. Sahavacharin, V. Vangani, R. Sethpakdee, P. Pongfongkan. 1996. Identification of lime cultivars and hybrid by isozyme patterns. Katetsart J. (Nat. Sci. J.):249-253.
- Scheider, D., M. Goldway, N. Rotman, I. Adato, R.A. Stern. 2009. Cross-pollination improves 'Orri' mandarin fruit yield. Scientia Horticulturae. 122: 380-384.
- Shukor, N.A.A. 2001. Biochemical markers in plant genetic resources characterization. In M.S. Saad and V.R. Rao (eds). A Training Manual IPGRI-APO, Serdang. Establishment and Management of Field Gene Bank. IPGRI Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania. UPM Campus, Serdang, Malaysia.
- Stykes, S.R. 2011. Characterisation of citrus rootstock germplasm introduced as seeds to Australia from the People's Republic of China. Scientia Horticulturae 127: 298–304.
- Sutarto E., D. Agisimanto, A. Supriyanto. 2009. Development of promising seedless *Citrus* mutants through gamma irradiation. In Q.Y. Shu (ed). Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Varoquaux, F., R. Blanvillain, M. Delseny, P. Gallois. 2000. Less is better: new approaches for seedless fruit production. Tibtech 18:233-242.
- Weeden, N.F., J.F. Wendel. 1989. Genetics of plant isozymes. P. 5-45. In D.E. Soltis, P.S. Soltis, editor. Isozyme in Plant Biology. Dioscorides Press. Oregon, USA
- Yamamoto, M., R. Matsumoto, Y. Yamada. 1995. Relationship between sterility and seedlessness in citrus. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64(1):23-29.
- Yamashita, K. 1976. Production of seedless fruits in Hyuganatsu, *Citrus tamurana* Hort. Ex Tanaka, and Hassaku, *Citrus hassaku* Hayata through pollination with pollen grains with 4x Natsudaidai, *Citrus natsudaidai* Hayata. J. Japan Soc. Hort. Sci. 45(3):225-230.
- Zeidler, M. 2000. Electrophoretic analysis of plant isozymes. Biologica 38:7-16.