

ANALISIS SITOLOGIS JERUK SIAM MADU (*Citrus nobilis* L.) HASIL KULTUR ENDOSPERMA

CYTOLOGICAL ANALYSIS OF TANGERINE var. MADU (*Citrus nobilis* L.) DERIVED FROM ENDOSPERM CULTURE

Innez Candri Gilang Purnama^{1*)}, Chaireni Martasari²⁾, Niken Kendarini¹⁾ dan Darmawan Saptadi¹⁾

¹⁾Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang 65145 Jawa Timur, Indonesia

²⁾Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika
Jl. Raya Tlekung No. 1 Junrejo, Batu 65301 Jawa Timur, Indonesia

^{*)}E-mail: innezcandri07@gmail.com

ABSTRAK

Salah satu teknologi pemuliaan yang dapat diterapkan untuk mendapatkan tanaman jeruk Siam Madu tanpa biji (*seedless*) adalah pembentukan tanaman triploid melalui kultur endosperma. Tanaman triploid pada Jeruk Siam Madu memiliki jumlah kromosom $2n=3x=27$. Perakitan tanaman triploid pada Jeruk Siam Madu telah dilakukan Balai Besar Biogen dan Balitjestro. Seleksi awal telah dilakukan, tetapi hanya pada karakter morfologi tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah kromosom 25 tanaman Jeruk Siam Madu terseleksi hasil kultur endosperma. Pengamatan kromosom dilakukan menggunakan metode *squash*. Hasil analisis sitologis pada 25 aksesi jeruk Siam Madu hasil kultur endosperma menunjukkan 13 aksesi memiliki ploidi triploid ($2n=3x=27$) yaitu SM 8, SM 10, SM 12, SM 17, SM 18, SM 36, SM 38, SM 39, SM 41, SM 47, SM 51, SM 56, dan SM 57. Satu aksesi yaitu SM 23 memiliki ploidi haploid ($2n=x=9$), sedangkan 11 aksesi memiliki ploidi diploid ($2n=2x=18$) yaitu SM 7, SM 9, SM 11, SM 35, SM 37, SM 43, SM 45, SM 49, SM 54, SM 58, SM 59.

Kata kunci: Jeruk Siam Madu, Kultur endosperma, Triploid, *Seedless*

ABSTRACT

One of breeding technology which can applied to get seedless tangerine citrus is by

derived triploid plant from endosperm culture. Triploid tangerine var. Madu plant have chromosome $2n=3x=27$. The formation of triploid tangerine var. madu was done by BB Biogen and Balitjestro. Early selection also done, but only based on morphology characters. This study was to know the chromosome number of 25 accessions tangerine var. madu derived from endosperm culture which selected. Chromosome observation used squash method. Cytological result show that 13 accessions have triploid chromosome ($2n=3x=27$) are SM 8, SM 10, SM 12, SM 17, SM 18, SM 36, SM 38, SM 39, SM 41, SM 47, SM 51, SM 56, dan SM 57. Accessions SM 23 is haploid ($2n=x=9$); and SM 7, SM 9, SM 11, SM 35, SM 37, SM 43, SM 45, SM 49, SM 54, SM 58, SM 59 are diploid ($2n=2x=18$).

Keywords: Tangerine var. Madu, Endosperm culture, Triploid, Seedless

PENDAHULUAN

Jeruk Siam Madu atau lebih dikenal dengan nama jeruk Medan merupakan jeruk lokal yang memiliki nilai ekonomi dan berdaya saing tinggi. Jeruk tersebut memiliki keunggulan yaitu rasa manis, diameter buah 7 cm, dan tahan 8-10 hari setelah panen. Jumlah biji per buah pada jeruk Siam Madu yang banyak (15-21 biji per buah) menjadi salah satu kelemahan karena preferensi konsumen lebih terhadap jeruk yang tidak berbiji (*seedless*).

Salah satu teknologi pemuliaan yang dapat diterapkan untuk mendapatkan tanaman jeruk tanpa biji adalah melalui kultur endosperma. Endosperma merupakan sumber cadangan makanan selama perkembangan embrio. Karakter unik endosperma adalah memiliki level ploidi triploid di dalam spesies tanaman diploid. Jaringan endosperma bersifat triploid karena merupakan hasil fusi antara dua inti polar dan satu sperma (Sunyoto *et al.*, 2010). Kondisi tersebut dapat dimanfaatkan untuk membentuk tanaman baru triploid dengan mengkulturkan dan meregenerasikan sel-sel endosperma. Menurut Gmitter *et al.* (1990), endosperma dari buah jeruk yang berumur 12-14 minggu setelah polinasi merupakan umur buah yang baik untuk dikulturkan karena pada umur tersebut endosperma bersifat seluler dengan struktur yang elastis dan paling responsif. Oleh karena itu, penentuan pengambilan endosperma untuk dikulturkan perlu diperhatikan. Tanaman yang memiliki ploidi triploid biasanya akan menjadi tanaman yang steril atau tidak berbiji karena ketidakseimbangan perpasangan kromosom ketika fase meiosis (Hoshino *et al.*, 2011).

Identifikasi terhadap tanaman poliploid dilakukan dengan analisis sitologis untuk mengetahui jumlah kromosom. Analisis sitologis dapat dilakukan dengan menghitung jumlah kromosom pada ujung akar yang aktif membelah (Winarto, 2011), kalus dan daun muda (Fukui, 1996). Karakter morfologi juga dapat digunakan untuk identifikasi level ploidi yaitu ukuran dan densitas stomata serta jumlah kloroplas yang terdapat pada sel penjaga (Liu *et al.*, 2011).

Balai Besar Biogen bersama Balitjestro telah melakukan proses pembentukan tanaman triploid terhadap jeruk Siam Madu melalui kultur endosperma (Kosmiatin, 2013). Planlet dari hasil *in vitro* telah disambung dengan cara *minigrafting* pada batang bawah JC (Martasari, 2014). Seleksi awal terhadap 115 tanaman jeruk Siam Madu hasil kultur endosperma telah dilakukan dan didapatkan 25 tanaman jeruk yang diduga triploid. Seleksi awal hanya didasarkan pada morfologi tanaman tersebut, belum terhadap jumlah kromosom. Identifikasi jumlah kromosom pada tanaman tersebut perlu dilakukan untuk mengetahui jumlah

kromosom jeruk Siam Madu yang dikulturkan melalui endosperma.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juni 2015 di Laboratorium Pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No.1 Junrejo, Batu, Jawa Timur.

Tanaman yang digunakan ialah 25 aksesi Jeruk Siam Madu hasil kultur endosperma yang telah terseleksi dan 1 tanaman Jeruk Siam Madu kontrol yang ada di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika. 25 tanaman tersebut ialah SM 7, SM 8, SM 9, SM 10, SM 11, SM 12, SM 17, SM 18, SM 23, SM 35, SM 36, SM 37, SM 38, SM 39, SM 41, SM 43, SM 45, SM 47, SM 49, SM 51, SM 54, SM 56, SM 57, SM 58, dan SM 59. Jeruk Siam Madu kontrol yang digunakan berupa jeruk Siam Madu dengan sifat diploid. Planlet hasil kultur endosperma disambung dengan cara *minigrafting* pada batang bawah Japanese Citroen (JC).

Analisis sitologis dilakukan dengan metode *squash* (Komarudin, 2005). Jumlah sampel setiap aksesi yang digunakan dalam analisis sitologis sebanyak 5 preparat sehingga dari 25 tanaman terdapat 125 preparat yang akan diamati. Sampel yang digunakan untuk analisis sitologis berupa tunas pucuk yang sehat (Gambar 1) dan diambil pada pukul 07.00-08.30 pagi karena pada saat tersebut matahari telah hangat dan bersinar terang sehingga sel-sel melakukan pembelahan mitosis secara optimal.



Gambar 1 Tunas Pucuk Jeruk Siam Madu

Pengamatan pada analisis sitologis adalah jumlah kromosom yang terlihat pada mikroskop tipe B X 51 dengan perbesaran 1000x pada setiap sampel yang diujikan. Hasil pengamatan sitologis dianalisis secara deskriptif untuk mengidentifikasi jumlah kromosom pada aksesori Jeruk Siam Madu hasil kultur endosperma.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mitosis adalah pembelahan sel yang menghasilkan dua sel anakan identik dengan sel induk. Mitosis hanya terjadi pada sel eukariot, yaitu pada sel somatik yang bersifat meristematis. Adanya mitosis menjadikan setiap sel tanaman memiliki kandungan genetik yang sama pada setiap organ tanaman, kecuali terjadi mutasi. Mitosis biasanya merupakan periode fase terpendek dalam siklus pembelahan sel, selebihnya merupakan fase interfase yang terdiri dari Gap-1 (G1), sintesis DNA (S), dan Gap-2 (G2). Setiap tanaman memiliki waktu optimum pembelahan sel secara mitosis yang berbeda-beda. Pada umumnya tanaman melakukan pembelahan sel pada pagi hari, misalnya waktu optimum pembelahan sel mitosis pada tanaman salak terjadi antara pukul 07.30-08.30 (Haryanto, 2010). Waktu optimum pembelahan sel mitosis pada genus *Zingiber* terjadi pada pukul 08.00-10.00 (Etikawati dan Setyawan,

2000). Preparat dengan kondisi sel-sel paling banyak dalam keadaan membelah dapat mewakili waktu optimum pembelahan sel (Haryanto, 2010).

Penelitian ini diawali dengan studi pendahuluan untuk mengetahui waktu optimum pembelahan sel secara mitosis pada tanaman Jeruk Siam Madu hasil kultur endo-sperma. Waktu optimum pembelahan sel adalah keadaan dimana sel-sel meristem tanaman sedang aktif membelah. Hal tersebut merupakan poin penting terkait

penentuan waktu pengambilan sampel di lapang. Waktu pengambilan sampel agar kromosom tanaman Jeruk Siam Madu hasil kultur endosperma dapat diamati dengan baik antara pukul 07.00-08.30 pagi.

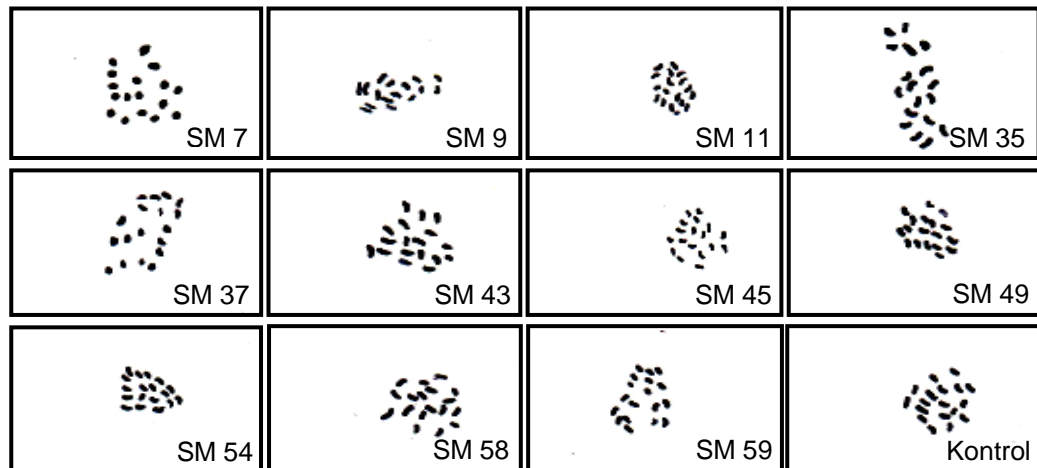
Sampel yang digunakan berupa tunas pucuk yang sehat karena pada daerah tersebut terdapat banyak sel meristem yang masih aktif membelah. Pembuatan preparat perlu diperhatikan agar menghasilkan obyek pengamatan yang baik. Teknik *squash* yang diaplikasikan dalam pembuatan preparat tidak menggunakan ibu jari, tetapi diketuk-ketukan menggunakan pensil berpenghapus hingga sampel menjadi pipih. Hal ini dilakukan untuk menghindari kerusakan sel. Prometafase merupakan fase pembelahan sel yang diamati untuk mengetahui jumlah kromosom.

Tabel 1 Hasil Pengamatan Jumlah Kromosom Jeruk Siam Madu Hasil Kultur Endosperma

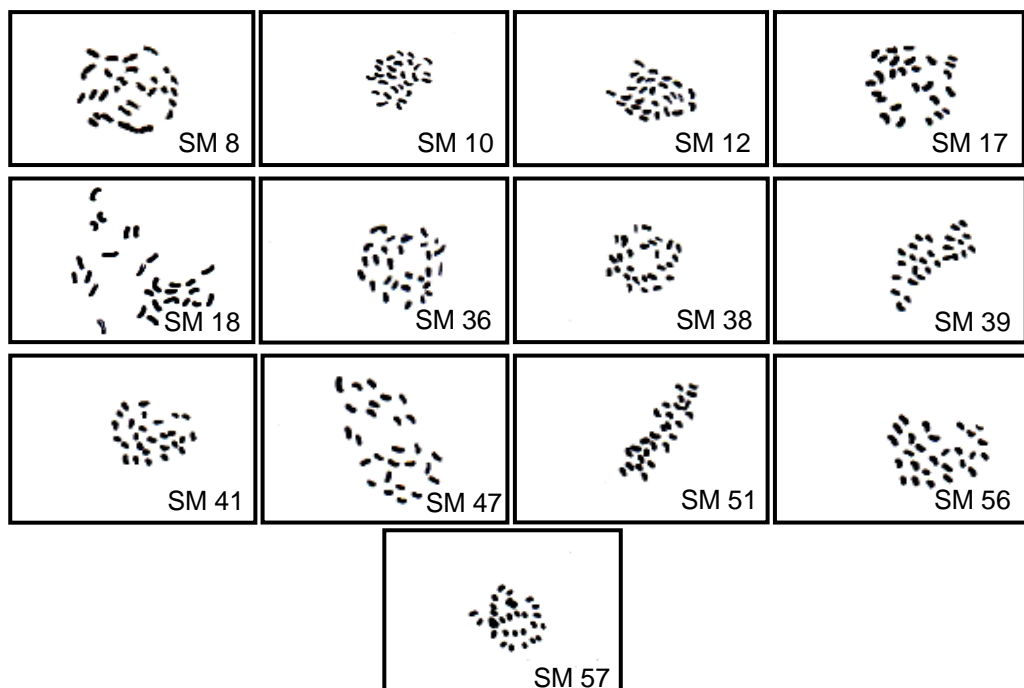
No	Kode Aksesori	Jumlah Kromosom	No	Kode Aksesori	Jumlah Kromosom
S1	SM 7	18	14	SM 39	27
2	SM 8	27	15	SM 41	27
3	SM 9	18	16	SM 43	18
4	SM 10	27	17	SM 45	18
5	SM 11	18	18	SM 47	27
6	SM 12	27	19	SM 49	18
7	SM 17	27	20	SM 51	27
8	SM 18	27	21	SM 54	18
9	SM 23	9	22	SM 56	27
10	SM 35	18	23	SM 57	27
11	SM 36	27	24	SM 58	18
12	SM 37	18	25	SM 59	18
13	SM 38	27	26	Kontrol	18



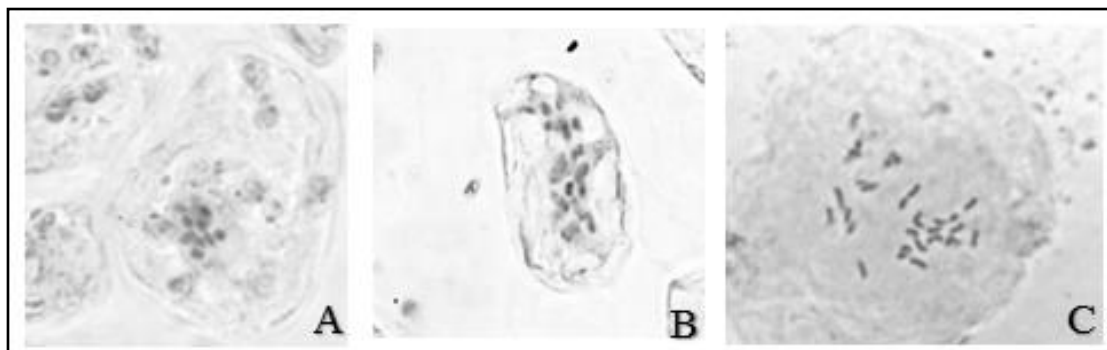
Gambar 2 Kromosom Tanaman Jeruk Siam Madu Hasil Kultur Endosperma Kode Aksesori SM 23 yang Menunjukkan $2n=x=9$ (Perbesaran 1000x)



Gambar 3 Kromosom Tanaman Jeruk Siam Madu Hasil Kultur Endosperma Kode Aksesori SM 7, SM 9, SM 11, SM 35, SM 36, SM 43, SM 45, SM 49, SM 54, SM 58, SM 59, dan Kontrol yang Menunjukkan $2n=2x=18$ (Perbesaran 1000x)



Gambar 4 Kromosom Tanaman Jeruk Siam Madu Hasil Kultur Endosperma Kode Aksesori SM 8, SM 10, SM 12, SM 17, SM 18, SM 36, SM 38, SM 39, SM 41, SM 47, SM 51, SM 56, dan SM 57 yang Menunjukkan $2n=3x=27$ (Perbesaran 1000x)



Gambar 5 Variasi Ploidi Pada Jeruk Siam Madu Hasil Kultur Endosperma. Keterangan: A. Haploid $2n=9$, B. Diploid $2n=18$, C. Triploid $2n=27$ (Perbesaran 1000x)

Hasil pengamatan jumlah kromosom pada 25 aksesi Jeruk Siam Madu hasil kultur endosperma disajikan pada Tabel 1. Pada tabel 1 menunjukkan bahwa 13 aksesi memiliki ploidi triploid ($2n=3x=27$) yaitu SM 8, SM 10, SM 12, SM 17, SM 18, SM 36, SM 38, SM 39, SM 41, SM 47, SM 51, SM 56, dan SM 57 (Gambar 2). Satu aksesi yaitu SM 23 memiliki ploidi haploid ($2n=x=9$) (Gambar 3), sedangkan 11 aksesi memiliki ploidi diploid ($2n=2x=18$) yaitu SM 7, SM 9, SM 11, SM 35, SM 37, SM 43, SM 45, SM 49, SM 54, SM 58, SM 59 (Gambar 4). Berdasarkan jumlah kromosom, tanaman Jeruk Siam Madu hasil kultur endosperma dibagi menjadi 3 kelompok yaitu haploid, diploid, dan triploid (Gambar 5).

Umumnya tanaman yang dihasilkan melalui kultur endosperma secara *in vitro* bersifat triploid, tetapi terkadang ada yang memiliki tingkat ploidi lain. Misalnya hasil kultur endosperma pada tanaman *Azadirachta indica* menunjukkan bahwa 66% bersifat triploid ($2n=3x=36$) dan 34% bersifat diploid ($2n=2x=24$) (Chaturvedi *et al.*, 2003 dalam Thomas dan Chaturvedi, 2008). Tanaman parsley yang diregenerasikan dari endosperma sebagian besar bersifat diploid, sedangkan pada tanaman *Diospyros kaki* dihasilkan 60% bersifat dodecaploid ($2n=12x$) dan 40% bersifat hexaploid ($2n=6x$) (Sukamto, 2010). Pada penelitian Gmitter *et al.* (1990) mengenai identifikasi jumlah kromosom tanaman jeruk hasil kultur endosperma didapatkan jumlah kromosom dan level ploidi yang stabil yaitu triploid ($2n=3x=27$). Adanya variasi jumlah kromosom dapat disebabkan oleh beberapa

faktor, diantaranya proembrio nuselar dan sel haploid antipodal yang ikut terkulturkan bersama jaringan endosperma. Jaringan nuselus yang ada pada endosperma kemungkinan menjadi penyebab sel yang diregenerasikan menjadi diploid (Gmitter *et al.*, 1990).

Endosperma Jeruk Siam bertipe inti bebas (*nuclear endosperm*), dimana endosperma primer hasil fertilisasi ganda melakukan pembelahan inti tetapi tidak langsung membentuk dinding sel (Kosmiatin, 2014). Selurisasi sel endosperma berlangsung bertahap sehingga perkembangan sel-sel endosperma tidak seragam. Kosmiatin (2014) juga menyatakan bahwa hasil penelitian sebelumnya mengenai induksi embrio genesis Jeruk Siam Madu dari jaringan endosperma menunjukkan bahwa koefisien keragaman rerata persentase pembentukan kalus embriogenik cukup tinggi. Keragaman disebabkan karena endosperma merupakan jaringan yang mempunyai perkembangan sel fungsi sel yang berbeda sehingga setiap sel memberikan respon yang berbeda terhadap formulasi media. Perbedaan respon juga terjadi karena keberadaan proembrio nuselar (diploid) dengan ukuran kurang dari 16 sel dan sel-sel haploid antipodal yang ikut terkulturkan dengan jaringan endosperma yang diisolasi dari buah yang berumur 11-13 minggu setelah antesis.

Pengamatan kromosom menggunakan metode *squash* memiliki kelebihan dan kekurangan. Secara teknis metode *squash* merupakan metode yang mudah dan memungkinkan untuk digunakan dalam mengamati kromosom tanaman Jeruk Siam Madu hasil kultur endosperma, tetapi karena

ukuran kromosomnya sangat kecil (1-3 μm) maka pengamatan agak sulit dilakukan apabila tanpa bantuan mikroskop dengan resolusi tinggi. Dalam penelitian ini kromosom dapat terlihat, tetapi posisi kromosom tidak dapat tersebar dengan baik dan terlihat saling tumpang tindih sehingga agak menyulitkan untuk mengetahui jumlah serta bentuk kromosom masing-masing aksesori. Peneliti perlu melakukan latihan beberapa kali dalam pembuatan preparat agar mendapatkan hasil pengamatan yang baik dan sesuai harapan. Teknik preparasi yang tepat dan kemampuan peneliti merupakan faktor yang mempengaruhi keberhasilan pengamatan.

KESIMPULAN

Hasil analisis sitologis pada 25 aksesori Jeruk Siam Madu hasil kultur endosperma menunjukkan bahwa 13 aksesori (52%) memiliki kromosom triploid ($2n=3x=27$) yaitu SM 8, SM 10, SM 12, SM 17, SM 18, SM 36, SM 38, SM 39, SM 41, SM 47, SM 51, SM 56 dan SM 57. Satu aksesori (4%) yaitu SM 23 memiliki ploidi haploid, sedangkan 11 aksesori (44%) yaitu SM 7, SM 9, SM 11, SM 35, SM 37, SM 43, SM 45, SM 49, SM 54, SM 58, SM 59 bersifat diploid.

DAFTAR PUSTAKA

- Etikawati, N. dan Setyawan, A. D. 2000.** Studi Sitotaksonomi pada Genus *Zingiber*. *Jurnal Biodiversitas* 1(1):8-13.
- Fukui, K. 1996.** Plant Chromosomes at Mitosis. In: Fukui, K. and S. Nakayama (Eds.) *Plant Chromosomes: Laboratory Methods*. CRC Press. Boca Raton. pp 1-18.
- Gmitter, F. G., X. B. Jr Ling and X. B. Deng. 1990.** Induction of Triploid Citrus Plants From Endosperm Calli *In vitro*. *Journal Theory Application Genes*. 80(6):785-790.
- Haryanto, F. F. 2010.** Analisis Kromosom dan Stomata Tanaman Salak Bali (*Salacca zalacca* var. *Ambionensis* (Becc.) Mogeia), Salak Padang Sidempuan (*Salacca sumatrana* (Becc.)), dan Salak Jawa (*Salacca zalacca* var. *zalacca* (Becc.) Mogeia). Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Hoshino, Y., T. Miyashita and T. D. Thomas. 2011.** *In vitro* Culture of Endosperm and Its Application In Plant Breeding: Approaches to polyploidy breeding. *Journal Scientia Horticulturae*. 130(1):1-8.
- Kosmiatin, M. 2013.** Pembentukan Tanaman Triploid Jeruk Siam Simadu (*Citrus nobilis* Lour) Melalui Kultur Endosperma. Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Kosmiatin, M., A. Purwito, G.A. Wattimena, I. Mariska. 2014.** Induksi Embriogenesis Somatik Dari Jaringan Endosperma Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) cv Simadu. *Jurnal Agronomi Indonesia*. 42(1):44-51.
- Liu S., S. Chen, Y. Chen, Z. Guan, D. Yin, and F. Chen. 2011.** *In vitro* Induced Tetraploid of *Dendranthema Nankingense* (Nakai) Tzvel. Shows An Improved Level Of Abiotic Stress Tolerance. *Journal Scientia Horticulturae*. 127(3):411-419.
- Sukanto, L. A. 2010.** Kultur *In vitro* Endosperma, Protokol yang Efisien Untuk Mendapatkan Tanaman Triploid Secara Langsung. *Jurnal AgroBiogen* 6(2):107-112.
- Sunoyo, S. Purnomo, dan Makful. 2010.** Formulasi Media Kultur Endosperm Jeruk Hasil Persilangan Antar Klon Siem Dengan Keprok dan Jeruk Besar. *Jurnal Hortikultura*. 20(4):332-341.
- Thomas, T. D. and Chaturvedi, R. 2008.** Endosperm Culture: A Novel Method For Triploid Plant Production. *Journal Plant Cell Tissue Organ Culture*. 93(1):1-14.
- Winarto, B. 2011.** Pewarnaan Kromosom dan Pemanfaatannya dalam Penentuan Tingkat Ploidi Eksplan Hasil Kultur Anter Anthurium. *Jurnal Hortikultura*. 21(2):113-123.