VARIASI JUMLAH KLOROPLAS DAN KROMOSOM TANAMAN JERUK SIAM PONTIANAK HASIL PERLAKUAN COLCHICIN

Chaireni Martasari

Peneliti Pemuliaan pada Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika
Jl. Raya Tlekung No 1. Junrejo-Batu, Jawa Timur

Abstrak

Perbaikan kualitas jeruk siam perlu dilakukan sebagai upaya peningkatan kualitas buah sebagai buah komsumsi domestik dan peningkatan ekspor. Perbaikan kualitas dapat dilakukan melalui pemuliaan tanaman sehingga produk yang diperoleh dapat stabil dan mewaris. Pemuliaan tanaman jeruk di Balitjestro telah melakukan penelitian penggandaaan kromosom dengan aplikasi colchisin pada fase kalus varietas jeruk siam pontianak untuk mendapatkan karakter tanaman vigor dan kualitas buah lebih baik. Colchisin merupakan salah satu senyawa yang dapat menyebabkan terjadinya poliploidi dimana organisme memiliki tiga atau lebih set kromosom dalam sel-selnya. Penelitian ini betujuan untuk mengetahui variasi jumlah kloroplas dan kromosom jeruk siam pontianak setelah perlakuan colchisin dengan beberapa dosis konsentrasi dan lama perendaman. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai indikator keberhasilan perlakuan colchisin dan seleksi awal terhadap populasi tanaman colchiploid. Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah 16 tanaman jeruk siam pontianak hasil perlakuan colchisin dengan dosis (0,01%, 0,10% dan 0,15%) dan kontrol. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah kloroplas dan jumlah kromosom tanaman colchiploid. Dari hasil penelitian diketahui bahwa terdapat variasi jumlah kloroplas (14 – 21) dan kromosom (8 – 25) tanaman colchiploid yang diamati.

Kata kunci: Siam Pontianak (*Citrus nobilis*), colchicin, kloroplas, kromosom

PENDAHULUAN

Jeruk merupakan komoditas buah-buahan terpenting di Indonesia setelah pisang dan mangga. Di Indonesia, beberapa jenis jeruk yang umum dibudidayakan dapat digolongkan pada beberapa kelompok seperti: jeruk Keprok, jeruk Besar, jeruk Nipis dan jeruk Lemon. Jeruk Siam (*Citrus nobilis*) termasuk salah satu varietas jeruk yang paling banyak diusahakan dan mendominasi 60% pasaran jeruk nasional. Jeruk Siam tumbuh baik di berbagai daerah sentra produksi seperti Kalimantan Barat (Pontianak), Kalimantan Selatan (Banjar), Jawa Barat (Garut), Jawa Timur (Pasuruan), dan Bali (Bangli) (Anonymous, 2000).

Komoditas jeruk lokal komersial yang ada di Indonesia saat ini (jeruk siam, keprok dan pamelo) secara produksi dan kualitas belum dapat memenuhi kebutuhan untuk konsumsi domestik, apalagi untuk kapasitas ekspor (Martasari, 2009). Kebutuhan untuk konsumsi segar buah jeruk di Indonesia adalah 3,26 kg/kapita/tahun (dengan asumsi bahwa konsumsi jeruk adalah 10% dari konsumsi buah, standar FAO). Pada tahun-tahun mendatang diperkirakan konsumsi jeruk di Indonesia mencapai 11,85 juta ton per tahun atau setara dengan 580.000 ha dengan produksi 20

ton/ha/tahun. Dengan demikian sangat jelas bahwa prospek dan potensi pasar jeruk sangat besar, sehingga memerlukan peningkatan baik kuantitas, kualitas maupun kontinuitas pengusahaan jeruk di Indonesia.

Perbaikan kualitas dan kuantitas jeruk dapat dilakukan melalui kegiatan pemuliaan tanaman sehingga perbaikan dapat berlangsung stabil dan mewaris. Dalam pemuliaan tanaman perbaikan secara genetik dapat dilakukan untuk menambah keragaman karakteristik tanaman jeruk dan untuk memenuhi persyaratan tentang kualitas jeruk tersebut, baik secara konvensional maupun inkonvensional. Secara konvensional dilakukan melalui persilangan atau mengawinkan bunga dengan meletakkan pollen pada stigma. Hasil dari persilangan adalah terjadinya proses pembentukan buah dan biji. Secara inkonvensional dapat dilakukan melalui seleksi mutan, produksi tanaman homozigot, hibridisasi somatik, atau transfer gen (Widiastoety, 2001).

Perbaikan varietas jeruk secara inkonvensional dapat juga dilakukan dengan cara penggandaan kromosom dengan menggunakan colchisin. Colchisin merupakan salah satu senyawa yang dapat menyebabkan terjadinya poliploidi dimana organisme memiliki tiga atau lebih kromosom dalam sel-selnya. Sifat umum dari tanaman poliploidi ini adalah menjadi lebih kekar, bagian tanaman lebih besar (akar, batang, daun, bunga, dan buah), sehingga nantinya sifat-sifat yang kurang baik akan menjadi lebih baik tanpa mengubah potensi hasilnya (Sulistianingsih *et al.*, 2004).

Perlakuan colchicine untuk menaikkan frekuensi tingkat ploidi di dalam populasi sel yang dikulturkan dan mengembalikan poliploidi turunan telah banyak dilakukan pada tanaman jeruk. Perlakuan colchicine 0,01 atau 0,1% pada jeruk manis selama 4 sampai 12 minggu menghasilkan ploidisasi 2x, 3x, 4x, 6x, dan 8x pada fase sel dan embrio somatik. Namun yang melanjutkan regenerasi menjadi plantlet hanya 2x dan 4x. Kultur embriogenik jeruk yang diperlakukan dengan colchicine dapat digunakan untuk membuat tetua autotetraploid yang tidak sitokimera, atau mengembalikan ploidi tunas aksilar (Gmitter *et al.*, 1991). Kalus embriogenik Tangor dan Grapefruit diperlakukan dengan 0,05 dan 0,01% colchicine menghasilkan regeneran diploid dan tetraploid dari kedua konsentrasi colchicine (Wu dan Mooney, 2002). Dari laporan-laporan tersebut pengembangan kultivar baru melalui mutasi memberi harapan baik terhadap perbaikan kualitas jeruk komersial yang sudah ada.

Pada tahun 2006 Balitjestro telah melakukan penelitian penggandaaan kromosom terhadap kalus varitas jeruk siam pontianak dengan aplikasi colchisin dosis 0.05%, 0.10% dan 0.15% dengan lama perendaman antara 1 – 10 hari. Seleksi

terhadap hasil penggandaan dilakukan secara bertahap setelah tanaman diminigraftingkan pada batang bawah JC yaitu berupa seleksi sitologi (jumlah kloroplas dan kromosom), genetik (analisa DNA) dan morfologi (vigoritas tanaman dan karakter buah).

Perubahan susunan kromosom merupakan salah satu indikator untuk meng-identifikasi keragaman sitologi pada tanaman mutan. Singsit dan Akins (1992) dalam Perdani (2008), menyatakan bahwa menghitung kromosom dari sel meristematik merupakan metode yang tepat untuk mengidentifikasi ploidi. Indikator lain adalah melalui penghitungan jumlah kloroplas dalam sel penjaga dan mengukur diameter butir polen, yang relatif lebih cepat dan dapat diandalkan sebagai alternatif untuk mengetahui tingkat ploidi tanaman. Bahkan pada beberapa spesies penghitungan jumlah kloroplas pada sel penjaga secara rutin merupakan cara cepat dan akurat untuk menentukan status ploidi.

Penelitian ini betujuan untuk mengetahui variasi jumlah kloroplas dan kromosom jeruk siam pontianak setelah perlakuan colchisin dengan beberapa konsentrasi. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai indikator keberhasilan perlakuan colchisin dan seleksi awal terhadap populasi tanaman jeruk colchiploid.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Pengamatan dilakukan pada tanggal Agustus 2008 selama satu bulan dan bertempat di Laboratorium Pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Sub-Tropika Jl. Raya Tlekung no.1 Tlekung Junrejo Batu.

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 17 tanaman colchiploid jeruk siam Pontianak (*Citrus nobilis* Cv. Pontianak) umur 2 tahun. Tanaman ditanam di nursery Kebun Percobaan Tlekung. Bahan kimia yang digunakan untuk pengamatan kloroplas dan koromosom adalah asam asetat, HCl, pewarna aceto-orcein, alkohol 70%, 0.8-hydroxyquinoline, perak nitrat (AgNO3) dan aquadest.

Alat yang digunakan antara lain cawan petri, pipet tetes, pinset, gelas ukur, kaca preparat, gelas penutup objek, pisau silet, skapel, karet pengahapus pensil, lemari es, timbangan analitik, hand counter, mikroskop tipe BX 51 dengan kamera digital evolution LC color berkecepatan dua mili detik, alat tulis dan alat-alat penunjang lainnya.

Metode Penelitian

Pengamatan dilakukan terhadap individu tanaman colchiploid. Data yang diperoleh dirata-ratakan dan dibandingkan dengan data tanaman kontrol.

Analisis Kloroplas

Pengamatan kloroplas menggunakan daun jeruk. Daun jeruk yang digunakan adalah daun muda dari empat atau lima daun pertama dari atas, yang diambil sebanyak lima lembar per tanaman. Pembuatan preparat mengacu pada metode yang digunakan Singgit dan Beck (2003) dalam Perdani (2008) sebagai berikut (1) daun dibersihkan menggunakan tisue yang dibasahi dengan alkohol 70%; (2) daun disayat tipis menggunakan pisau silet pada bagian bawah daun; (3) hasil sayatan diletakkan pada gelas preparat dan ditetesi larutan perak nitrat ($AgNO_3$) 1% ; (4) sayatan ditutup dengan gelas penutup objek. Kloroplas yang diamati adalah yang berada dalam sel penjaga dan pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran obyektif 40x dan okuler 10x. Visualisasi dilakukan menggunakan komputer. Jumlah kloroplas dihitung dari 15 sel penjaga per daun.

Analisis Kromosom

Pembuatan Larutan

Pembuatan semua larutan kimia yang digunakan dalam pengamatan kromosom mengacu pada metode Komarudin (2005). Larutan 0,8-Hydroxyquinoline 0,002 M dibuat dengan jalan melarutkan sebanyak 0,3 g 0,8-Hydroxyquinolin dan dicampurkan dalam satu liter aquadest pada suhu 70 °C selama satu jam sampai terlihat warna kekuningan. Larutan 0,8-Hydroxyquinoline 0,002 M di simpan dalam tempat tertutup dalam lemari es. Larutan asam asetat 45% (w/v) dibuat dengan melarutkan 45 ml asam asetat absolut ke dalam 55 ml aquades.

Pengamatan kromosom

Tunas pucuk dan tunas aksilar diambil antara jam tujuh sampai jam delapan pagi. Pembuatan preparat berdasar metode Burun dan Emiruglo (2007). Tunas yang telah diambil, langsung direndam dalam 0,8-hydroxyquinoline 0,002 M selama 3-4 jam pada suhu 5 °C, kemudian spesimen direndam dalam larutan asam asetat 45% selama 10-15 menit pada suhu 60 °C. Spesimen direndam kembali dalam larutan HCl:Asam asetat 3:1 selama 15-20 menit pada suhu 20 °C, lalu spesimen direndam dalam pewarna aseto-orcein 2% selama 5-10 menit. Spesimen diletakan di atas kaca benda lalu di tetesi aceto orecein dan ditutup dengan kaca penutup. Kemudian

spesimen di squash menggunakan pencil berpenghapus dan di panaskan diatas bunsen sampai terasa panas di tangan. Preparat. Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran obyektif 100x dan okuler 10x, lalu difoto dan dihitung jumlah kromosom.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan Jumlah Kloroplas

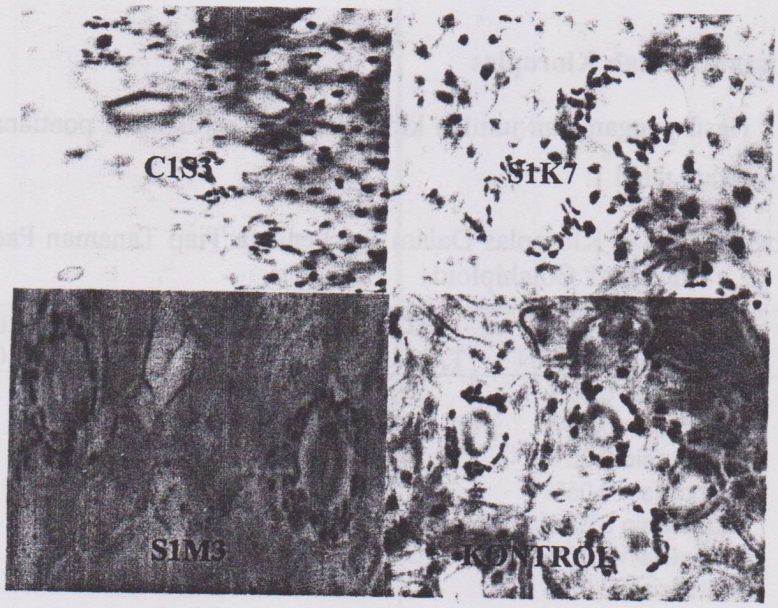
Hasil pengamatan jumlah kloroplas pada jeruk siam pontianak colchiploid disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Jumlah Kloroplas Dalam Sel Penjaga Tiap Tanaman Pada Jeruk Siam Pontianak Colchiploid

NO	DOSIS CHOLCISIN	KODE TANAMAN	LAMA PERENDAMAN	JUMLAH KLOROPLAS
1	Cholcisin 0.05%	S1K1	1 hari	16
2	Cholcisin 0.05%	S1K5	5 hari	18
3	Cholcisin 0.05%	S1K7	7 hari	19
4	Cholcisin 0.05%	S1K10	10 hari	16
5	Cholcisin 0.05%	C1S1	1hari	16
6	Cholcisin 0.05%	C1S2	3 hari	14
7	Cholcisin 0.05%	C1S3	5 hari	19
8	Cholcisin 0.15%	S1M1	7 hari	16
9	Cholcisin 0.15%	S1M3	10 hari	21
10	Cholcisin 0.15%	S1M5	5 hari	16
11	Cholcisin 0.15%	S1M7	7 hari	16
12	Cholcisin 0.15%	S1M10	1 hari	15
13	Cholcisin 0.10%	S1U5	2 hari	16
14	Cholcisin 0.10%	S1U7	3 hari	18
15	Cholcisin 0.10%	C2S1	1 hari	14
16	Cholcisin 0.10%	C2S2	2 hari	15
17	0	KONTROL	0	12

Perlakuan colchisin menyebabkan terjadinya variasi pada jumlah kloroplas dalam tiap sel penjaga dari daun jeruk siam pontianak colchiploid. Terbukti dengan jumlah kloroplas yang lebih besar pada tanaman colchiploid dibandingkan dengan tanaman kontrol. Perbedaan yang paling jelas terlihat adalah pada tanaman S1K7 (dosis 0,05% selama 7 hari), S1M3 (dosis 0,15% selama 10 hari) dan C1S3 (dosis 0,05% selama 5 hari) dimana rata-rata jumlah kloroplas mencapai 19, 21 dan 19 (Tabel 1, Gambar 1). Jumlah kloroplas pada tanaman kontrol rata-rata adalah 12. Adanya peningkatan jumlah kloroplas ini di sebabkan terjadinya perubahan pada materi genetiknya. Sulistianingsih (2004) menyatakan kelainan yang terjadi pada saat individu berkaitan erat dengan kelainan materi genetik.

Menurut Qin dan Rotino (1995) dalam Perdani (2008), terdapat korelasi positif antara jumlah kloroplas dalam sel penjaga dengan tingkat ploidi pada tanaman lada, jumlah kloroplas bertambah seiring meningkatnya tingkat ploidi. Berdasarkan pernyataan di atas, pada jeruk colchiploid yang diamati berkemungkinan besar status ploidinya berubah lebih tinggi.



Gambar 1. Klroplas pada Sel Penjaga

Pengamatan Kromosom

Dari hasil pengamatan kromosom yang dilakukan diperoleh beragam jumlah kromosom dari setiap individu tanaman yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah Kromosom Tanaman Cholciploid

No	Kode	Rerata
1	S1K1	11
2	S1K5	10
3	S1K7	8
4	S1K10	13
5	C1S1	9
6	C1S2	11
7	C1S3	9
8	S1M1	8
9	S1M3	25
10	S1M5	9
11	S1M7	10
12	S1M10	6
13	S1U5	8
14	S1U7	9
15	C2S1	13
16	C2S2	13
17	KONTROL	17

Tahap pembelahan sel dimana kromosom dapat diamati dengan jelas adalah fase metafase dan anafase. Untuk itu, penentuan saat pengambilan sampel dimana sel-sel sedang mengalami kedua tahapan tersebut adalah hal yang krusial. Dari hasil percobaan sebelumnya, saat yang paling tepat untuk pengambilan sampel dari lapang adalah saat matahari telah hangat dan bersinar terang antara pukul 07.00-08.00.

Dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa jumlah kromosom tanaman kontrol adalah 17 sementara kromosom diploid jeruk seharusnya adalah 2n =18. Anomali ini diduga disebabkan oleh kendala teknis dalam pengamatan kromosom. Meskipun proses fiksasi kromosom telah dilakukan dengan baik, namun pengamatan kromosom dibawah mikroskop hanya dapat dilakukan dari satu sisi saja, sehingga ada kemungkinan kromosom yang menumpuk terhitung satu yang berakibat berkurangnya jumlah kromosom. Selain itu, tidak diperolehnya gambar yang tajam dari mikroskop yang digunakan, memunculkan kesulitan untuk penghitungan individual kromosom dan membiaskan pengambilan kesimpulan atas pengaruh colchisin terhadap jumlah kromosom pada hampir semua sampel tanaman.



Gambar 2: Kromosom Jeruk Siam Pontianak Colchiploid (S1M3)

Jumlah kromosom yang melebihi kontrolnya hanya ditemui pada tanaman S1M3 (Tabel 2, Gambar 5) yaitu rata-rata 25. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian colchisin dengan dosis 0.15% yang direndam selama 10 hari, mampu meningkatkan jumlah kromosom tanaman jeruk siam pontianak walaupun tidak persis duakali lipatnya. Pemberian colchisin diharapkan dapat membuat sel tanaman diploid menjadi tetraploid. Hal ini dikarenakan sifat colchisin yang menghalangi terbentuknya dinding pemisah sel. Menurut Nasir (2002) bila colchisin diletakan bersinggungan dengan sel-sel tanaman yang sedang membelah, maka terjadi pencegahan pembentukan serat benang normal yang mengarahkan kromosom ke dalam inti sel anak selama mitosis. Senyawa colchisin memberikan pengaruh dengan mengikat protein (*tubulin*) yang mencegah protein tersebut menjadi serat benag fungsional. Tanpa benang gelendong tersebut, dinding pemisah sel (*plate cell*) gagal

terbentuk, sehingga kromosom dan duplikatnya hanya berada dalam sel yang sama jadi pembelahan selnya mulai dari sel diploid dan berakhir dengan terbentuknya sel tetraploid.

Menurut Burun dan Emiroglu (2007) dengan memasukan kepala sari langsung pada colchisin dengan konsentrasi 0.4% selama 8 hari akan menghasilkan frekuensi ploidisasi yang besar, yaitu sekitar 66.7%. Colchisin juga dapat di aplikasikan pada embrio, yaitu dengan konsentrasi 0.2% colchisin dapat menghasilkan 60% ploidisasi. Sedangkan menurut Saisingtong (1996) perlakuan colchisin pada jagung didapatkan efek yang paling optimal dari colchisin pada perendaman selama 7 hari dengan konsentrasi 250 atau 1000mg/l.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Jumlah kloroplas tanaman hasil perendaman colchisin menunjukan adanya variasi jumlah kloroplas antara 14 hingga 21.
2. Semua tanaman hasil perlakuan colchisin memiliki jumlah kloroplas lebih besar dari tanaman kontrolnya yang diduga berkorelasi positif dengan tingkat ploidinya.
3. Variasi jumlah kromosom cukup besar yaitu 8 – 25.
4. Jumlah kromosom yang lebih besar dari kontrolnya adalah pada tanaman S1M3.

DAFTAR PUSTAKA

Anonymous. 2000. *Pushlitbang Hortikultura* http://www.indonext.com/report/report332.html. Akses tanggal 31 Juli 2009.

Burun dan Emiruglo. 2007. *A Comparative Study on Colchicine Application Metods in Obtaining Double Haploids of Tobacco* (*Nicotiana tabacum* L.). Turk J Biol 32:105-111.

Gmitter, F.G., Jr., X. Ling, 1991. Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recoveryfrom undeveloped Citrus ovules treated with colchicine. J. Amer. Soc. Hort. Sci 116: 317-321.

Martasari, C.2009. Laporan Akhir RPTP Perbaikan Varietas Jeruk Indonesia. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika. (Tidak dipublikasikan)

Nasir, M. 2002.*Bioteknologi Molekuler Tekni Rekayasa Genetik Tanaman*. Bandung. Citra Aditya Bakti.

Perdani, Ambar Yuswi. 2008. *Skripsi: Variasi sitologi tanaman jeruk siam (citrus suhuiensis l.) Dan pamelo (citrus grandis) Hasil Radiasi Sinar Gamma*. Malang: Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

Saisingtong. 1996. *Colchicine-Mediated Chromosome Doubling During Anther Culture of Maize* (Zea mays L.). Plant Breeding 92: 1017-1023.

Sulistianingsih, Rahayu dkk. 2004. *Peningkatan Kualitas Anggrek Dendrobium Hibrida dengan Pemberian Colchisin*. Ilmu Pertanian Vol 11 No.1 2004: 13-21.

Widiastoety, D. 2001. *Perbaikan Genetik Dan Perbanyakan Bibit Secara Invitro Dalam Mendukung Pengembangan Anggrek di Indonesia*. http://pustaka.net. Akses tanggal 02 Agustus 2008.

Wu, J.H.P and Mooney. 2002. Autoploid tangor plant regeneration from in vitro citrus somatic embryogenesis callus treated with colchicines. Plant cell Tissue and Organ Culture 70.pp 90-104