

Kemampuan regenerasi kalus embriogenik asal nuselus jeruk siam serta variasi fenotipe tunas regeneran

Regeneration ability of embryogenic callus derived nucellus of siam tangerine and phenotypic variation of its regenerants

AIDA WULANSARI^{1,✉}, AGUS PURWITO², ALI HUSNI³, ENNY SUDARMONOWATI¹

¹Puslit Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong, Kab. Bogor 16911 Jawa Barat, Indonesia. Tel./Fax. +62-21-8754587/+62-21-8754588,

✉email: aida_wulansari@yahoo.com

²Departemen Agronomi & Hortikultura, Fakultas Pertanian, Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor, 16680 Jawa Barat, Indonesia

³Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor, 16111, Jawa Barat, Indonesia

Manuskrip diterima: 16 Desember 2014. Revisi disetujui: 17 Januari 2015.

Abstrak. *Wulansari A, Purwito A, Husni A, Sudarmonowati E. 2015. Kemampuan regenerasi kalus embriogenik asal nuselus jeruk siam serta variasi fenotipe tunas regeneran. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (1): 97-104.* Salah satu jenis jeruk di Indonesia yang sangat digemari konsumen adalah jeruk siam. Jeruk siam mendominasi 80% dari total perkebunan jeruk di Indonesia. Jeruk ini memiliki rasa manis, harum, daging buahnya lunak, mengandung banyak air dan kulitnya tipis sehingga mudah dikupas. Namun, jeruk siam masih mempunyai biji yang relatif banyak (15-20 biji per buah) dan warna kulit yang kurang menarik, sehingga perlu peningkatan kualitas buah melalui pemuliaan tanaman. Tersedianya keragaman genetik yang luas mengakibatkan proses seleksi lebih efisien. Peningkatan keragaman genetik pada jeruk terkendala oleh periode juvenil yang panjang. Salah satu strategi yang dapat dilakukan untuk mempercepat peningkatan keragaman genetik adalah melalui teknologi kultur in vitro atau variasi somaklonal. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman fenotipe tunas hasil regenerasi kalus embriogenik. Kalus yang digunakan berasal dari nuselus biji muda yang berumur 30-90 hari setelah anthesis. Pengamatan terhadap kemampuan proliferasi kalus pada media MW (Murashige & Wetmore) menunjukkan bahwa periode kalus yang lama yaitu 4 tahun sejak inisiasi serta subkultur berulang selama periode tersebut tidak mengurangi kemampuan proliferasi kalus. Kalus umur 4 minggu setelah subkultur masih mampu tumbuh hampir dua kali lipat dari ukuran awal. Pertambahan berat kalus sebesar 1.78 g. Warna dan struktur kalus tidak mengalami perubahan yaitu berwarna putih kekuningan dan memiliki struktur remah. Setiap kalus (berat \pm 0.5 g) memiliki 8-12 proembrio. Persentase pembentukan embrio somatik sebesar 55.2% pada media MW ditambah 0.5 mgL⁻¹ ABA. Pada tahap pendewasaan embrio, 100% embrio somatik dapat berkecambah pada media MW dengan penambahan 0.5 mgL⁻¹ GA₃. Pengamatan terhadap fenotipe tunas regeneran diperoleh 10 variasi tunas. Tunas regeneran juga telah disambung dengan batang bawah jenis JC dan menunjukkan 100% tunas mampu tumbuh. Penyimpanan periode kalus jeruk siam yang lama tidak mengurangi kemampuannya dan dapat diperoleh 10 variasi fenotipe yang akan dilakukan analisis lebih lanjut secara molekuler dan agronomi.

Kata kunci: Jeruk siam, variasi somaklonal, kultur in vitro, kalus embriogenik, nuselus

Abstract. *Wulansari A, Purwito A, Husni A, Sudarmonowati E. 2015. Regeneration ability of embryogenic callus derived from nucellus of siam tangerine and phenotypic variation of its regenerants. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (1): 97-104.* Tangerine cv. siam is one favorite type of citrus fruit in Indonesia. Tangerine cv. siam dominates 80% of the total citrus plantations in Indonesia. The fruit has a sweet flavor, easily peeled skin, soft, and juicy flesh. However, it has relatively many seeds (15-20 seeds per fruit) and dull-colored skin, making it less competitive in the market. Fruit quality improvement has been the subject of the citrus breeding program. The first step of the program is to increase variability for the efficient selection process. The improvement of genetic variability in tangerine was constrained by a long period of juvenile stage. One of strategy to accelerate genetic improvement is by in vitro culture techniques or somaclonal variation. The aim of this study was to determine the phenotypic variation of regenerant shoots from embryogenic callus. Callus was derived from nucellus of immature seeds 30-90 days after anthesis. Observation on the ability of callus proliferation in MW medium (Murashige & Wetmore) indicated that long period of callus and repeated subculture did not reduce the proliferation ability. A 4-week callus could grow almost twice bigger than its initial size. Callus weight increased 1.78 g. The color and structure of callus did not change. It was yellowish white and the structure was friable. Each callus (\pm 0.5 g) has 8-12 proembryos. The percentage of somatic embryo formation in MW medium containing 0.5 mgL⁻¹ ABA was 55.2%. At embryonic maturation stage, 100% somatic embryos could germinate in MW medium containing 0.5 mgL⁻¹ GA₃. There were 10 phenotypic variants of regenerant shoots. After grafting with JC as rootstocks, 100% regenerant shoots grew. Extended period of callus of Tangerine cv. siam did not reduce its regeneration ability and 10 phenotypic variations can be obtained for further molecular and agronomics analysis.

Keywords: Tangerine cv. siam, somaclonal variation, in vitro culture, embryogenic callus, nucellus

PENDAHULUAN

Jeruk termasuk 10 komoditas utama hortikultura yang telah ditetapkan Kementan sejak tahun 2000. Salah satu jenis jeruk lokal yang sangat digemari konsumen adalah jeruk siam. Jeruk siam mendominasi 75% dari total perkebunan jeruk di Indonesia. Produksi jeruk nasional sekitar 2071.08 juta ton dengan luas areal 73306 Ha pada tahun 2010 (Kementan 2012). Indonesia memiliki tiga jenis jeruk lokal yang komersial, yaitu jeruk siam, jeruk keprok dan jeruk besar atau pamelon. Ketiga jenis jeruk tersebut memiliki potensi tinggi karena kemampuan adaptasinya yang baik terhadap beberapa kondisi iklim di Indonesia (Ashari dan Hanif 2012).

Jeruk siam memiliki rasa yang manis, harum, daging buahnya lunak, mengandung banyak air dan kulitnya tipis sehingga mudah dikupas. Jeruk ini mempunyai biji yang relatif banyak (15-20 biji per buah) dan warna kulit yang kurang menarik, sehingga kalah bersaing dengan jeruk impor. Peningkatan kualitas buah dapat dilakukan dengan program pemuliaan tanaman. Langkah awal dari pemuliaan tanaman adalah tersedianya keragaman genetik agar proses seleksi dapat dilakukan. Jeruk termasuk tanaman tahunan sehingga peningkatan keragaman genetiknya terkendala oleh periode juvenil yang panjang. Salah satu strategi yang dapat dilakukan untuk mempercepat peningkatan keragaman genetik adalah melalui induksi keragaman genetik secara *in vitro* atau variasi somaklonal. Keragaman genetik dapat diperoleh akibat teknik kultur sel dan jaringan tanaman, yang disebut keragaman somaklonal. Keragaman somaklonal yang terjadi seringkali bersifat epigenetik, tidak stabil dan tidak diwariskan. Keragaman tersebut juga dapat bersifat genetik, stabil dan diwariskan, sehingga memiliki potensi yang besar dalam program perbaikan tanaman (Orbovic et al. 2008). Beberapa faktor yang mempengaruhi keragaman somaklonal adalah latar belakang genetik, sumber eksplan, komposisi media serta umur kultur. Soedjono (2003) mengemukakan bahwa pada umumnya setiap siklus regenerasi menghasilkan 1-3% keragaman somaklonal, meskipun tingkat perbedaannya 0-100%. Induksi variasi somaklonal dapat digunakan untuk manipulasi genetik tanaman dengan sifat poligenik selain juga dimanfaatkan untuk perakitan varietas baru dalam program pemuliaan tanaman. Pemuliaan tanaman melalui kultur jaringan bermanfaat dalam menginduksi keragaman genetik dan mempertahankan kestabilan genetik (Yunita 2009).

Kultur *in vitro* dapat menginduksi keragaman antar sel, jaringan dan organ yang menyebabkan perbedaan dalam kultur atau antar somaklon. Umumnya variasi somaklonal dihasilkan dari sel-sel yang mengalami satu atau lebih perubahan seperti perubahan fisik dan morfologi pada kalus yang belum berdiferensiasi, perbedaan pada kemampuan untuk membentuk organ, perubahan antar tanaman yang dihasilkan, dan perubahan di level kromosom (Skirvin et al. 1993). Tanaman hasil variasi somaklonal dapat mengalami perubahan sifat yang berbeda dengan tanaman awalnya baik secara permanen maupun sementara. Perubahan sifat yang sementara dihasilkan dari pengaruh epigenetik atau fisiologis dan bersifat tidak dapat

diwariskan dan dapat kembali ke sifat tanaman awal (Kaepler et al. 2000). Keragaman genetik pada kultur jaringan dapat dicapai melalui fase tak berdiferensiasi (fase kalus dan sel bebas) yang relatif lebih panjang. Untuk mendapatkan kestabilan genetik pada teknik kultur jaringan, dapat dilakukan dengan cara menginduksi sesingkat mungkin fase pertumbuhan tak berdiferensiasi (Bairu et al. 2011).

Adanya keragaman genetik yang luas di dalam plasma nutfah memberikan peluang yang besar untuk perbaikan genotipe tanaman. Dengan variasi somaklonal dimungkinkan untuk mengubah satu atau beberapa karakter tertentu dan tetap mempertahankan karakter unggul lainnya yang sudah dimiliki tanaman induknya (Ahloowalia dan Maluszynski 2001). Lestari et al. (2010) melaporkan bahwa melalui variasi somaklonal telah diperoleh beberapa varietas yang lebih baik kualitasnya antara lain tahan penyakit, kekeringan, dan produksi lebih tinggi. Kalus yang digunakan dalam penelitian ini telah berumur 4 tahun sejak inisiasi. Penggunaan kalus ini diharapkan dapat meningkatkan keragaman genetik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman fenotipe tunas hasil regenerasi kalus embriogenik jeruk siam yang telah berumur lama dalam kultur *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Bahan penelitian

Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus embriogenik asal nuselus yang berumur 4 tahun sejak inisiasi dan dilakukan subkultur setiap 4-6 minggu untuk menjaga viabilitasnya (Gambar 1). Media yang digunakan untuk subkultur adalah media MW (Morel dan Wetmore) (Husni et al. 2010), yang terdiri atas unsur makro MS (Murashige dan Skoog), unsur mikro MS dan vitamin MW.

Cara kerja

Penelitian ini terdiri atas tiga tahap yaitu proliferasi kalus, regenerasi kalus menjadi tunas dan evaluasi keragaman fenotipe tunas regenerasi.

Proliferasi kalus embriogenik

Tujuan dari tahap ini adalah untuk memperbanyak kalus embriogenik asal nuselus yang telah ada. Media dasar yang digunakan merupakan media modifikasi MS yaitu media MW (Husni et al. 2010). Penanaman dilakukan dalam *laminar air flow cabinet*. Setiap botol berisi tiga kumpulan kalus embriogenik dengan diameter kalus ± 0.5 cm dan berat ± 0.5 g. Pengamatan dilakukan terhadap 50 botol. Semua kultur disimpan di ruang kultur dengan suhu 25^oC dan peninaran selama 16 jam per hari. Perbanyak kalus dilakukan selama 8 minggu. Pengamatan dilakukan setiap empat minggu terhadap: (i) morfologi kalus (warna dan struktur kalus); (ii) bobot segar kalus (g) dan (iii) diameter kalus (cm).

Regenerasi kalus embriogenik

Tahapan embriogenesis somatik pada penelitian ini yaitu:

Pendewasaan embrio somatik

Kalus embriogenik dari tahap satu yang telah membentuk proembrio disubkultur ke media pendewasaan embrio somatik yaitu media MW dengan penambahan 0.5 mgL⁻¹ ABA (Husni et al. 2010). Pengamatan dilakukan terhadap 50 botol. Setiap botol berisi 5 kalus. Peubah yang diamati adalah jumlah kalus yang membentuk embrio somatik dan jumlah embrio somatik yang terbentuk (fase globular-kotiledon).

Perkecambahan embrio somatik.

Embrio somatik yang telah dewasa (fase kotiledon) kemudian dipindahkan ke media perkecambahan yaitu media MW dengan penambahan 0.5 mgL⁻¹ GA₃ (Husni et al. 2010). Pengamatan dilakukan terhadap 25 botol. Setiap botol berisi 4 embrio fase kotiledon. Peubah yang diamati adalah jumlah embrio somatik yang berkecambah dan jumlah kecambah yang dihasilkan.

Evaluasi keragaman fenotipe tunas regenerasi

Tunas regenerasi hasil perkecambahan embrio somatik kemudian disubkultur setiap empat minggu ke media MW (Husni et al. 2010) tanpa zat pengatur tumbuh sampai empat kali subkultur untuk pendewasaan tunas. Evaluasi keragaman genetik dilakukan dengan karakterisasi secara morfologi. Pengamatan dilakukan terhadap: tinggi tunas (cm), pengukuran menggunakan mistar dari pangkal batang hingga pucuk, jumlah daun, penghitungan berdasarkan jumlah daun yang telah terbuka penuh, jumlah cabang, jumlah akar, bentuk, warna dan tepi daun. Pengamatan terhadap bentuk, warna dan tepi daun dilakukan berdasarkan deskripsi yang dikeluarkan oleh IPGRI (1999).

Planlet yang dihasilkan kemudian disambung dengan batang bawah jenis JC (*Japansche Citroen*). Penyambungan dilakukan secara *in vitro* (*micrografting*) dan secara *ex vitro* (sambung pucuk). Penyambungan secara *in vitro* dilakukan antara planlet dengan batang bawah JC yang berasal dari perkecambahan biji secara *in vitro* dan berumur ± 3 bulan. Penyambungan secara *ex vitro* dilakukan antara tunas regenerasi *in vitro* dengan batang bawah JC yang berasal dari perkecambahan biji di *polibag* dan berumur ± 9 bulan. Parameter pengamatannya adalah: (i) tinggi planlet batang atas (cm), (ii) jumlah daun baru yang terbentuk dan (iii) persentase kemampuan tumbuh setelah penyambungan.

Analisis data

Data hasil pengamatan morfologi dianalisis dengan menggunakan program NTSYSpc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) versi 2.02 (Rohlf 1998). Karakter morfologi yang diamati, diasumsikan setara dengan jenis primer pada penanda molekuler, sedangkan sub karakter setara dengan lokus pita pada penanda molekuler. Data karakter morfologi tersebut diubah menjadi data biner dengan skoring data. Apabila karakter morfologi tidak dimiliki oleh tunas regenerasi maka

diberikan nilai skor 0, sedangkan nilai skor 1 diberikan apabila regenerasi memiliki karakter yang diamati.

Koefisien kemiripan berdasarkan penanda morfologi dianalisis berdasarkan SIMQUAL (*Similarity for Qualitative Data*) pada program NTSYSpc versi 2.02. Tingkat kemiripan dihitung menggunakan koefisien Dice. Analisis pengelompokan digunakan SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested*)-UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average*), disajikan dalam bentuk dendogram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proliferasi kalus embriogenik

Viabilitas kalus yang digunakan dalam penelitian ini masih terjaga, walaupun telah lama dalam periode kultur (umur 4 tahun sejak inisiasi). Kalus tersebut dipelihara dengan cara di-subkultur setiap 4-6 minggu ke media MW (Morel dan Wetmore) tanpa zat pengatur tumbuh. Media MW merupakan media optimal untuk pembentukan kalus embriogenik pada tanaman jeruk siam berdasarkan penelitian Husni et al. (2010). Pengamatan empat minggu setelah ditanam dalam media tersebut, menunjukkan kalus masih mempunyai kemampuan proliferasi atau pertumbuhan dengan bertambahnya berat dan diameter kalus. Warna kalus secara umum adalah putih kekuningan dan bersifat *friable* atau remah. Rata-rata pertambahan berat kalus setelah empat minggu adalah 1.78 g sedangkan rata-rata pertambahan diameter kalus adalah 0.45 cm (Gambar 2). Artinya, bahwa kalus masih mampu tumbuh hampir dua kali lipat dari ukuran awal saat dilakukan subkultur ke media MW.

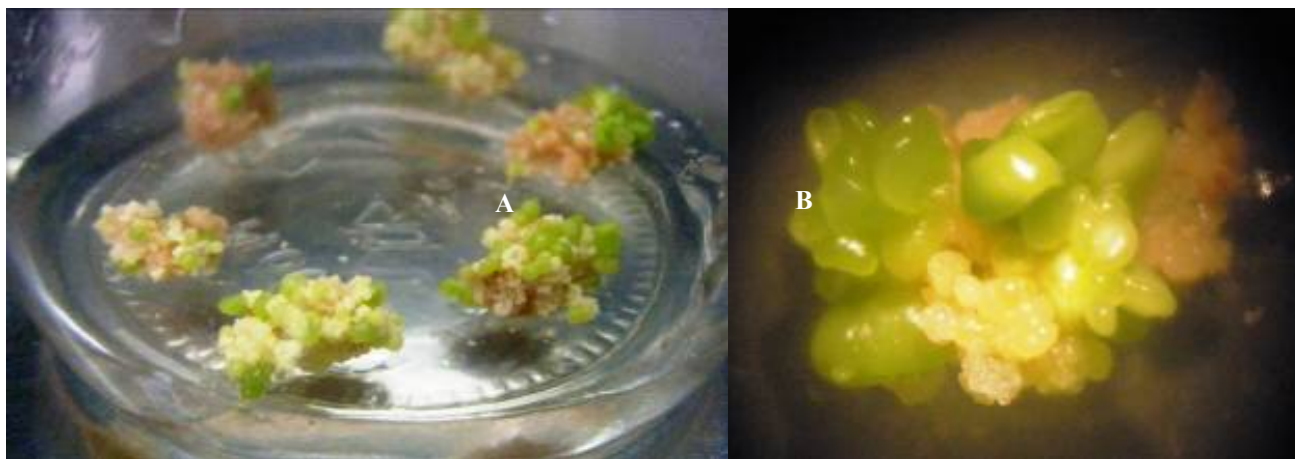
Kalus yang dihasilkan dikategorikan embriogenik, karena mengandung proembrio yang merupakan tahap awal perkembangan dari dua sel hingga delapan sel sebelum terbentuk globular (Feher et al. 2003). Setiap kalus (berat ± 0.5 g) memiliki 8-12 proembrio, sehingga dalam tiap botol yang berisi tiga kalus terdapat sekitar 16-24 proembrio. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Husni et al. (2010), eksplan yang berasal dari nuselus dapat menginduksi kalus 100%, dengan luas atau diameter kalus 2.89 cm dan menghasilkan 30 proembrio per kalus. Perbandingan jumlah proembrio yang dihasilkan antara kalus saat awal inisiasi dengan kalus setelah berumur 4 tahun menunjukkan terjadi sedikit penurunan. Periode kalus yang lama diduga terkait dengan kemampuan pembentukan proembrio. Selain itu, kompetensi sel-sel kalus juga dipengaruhi oleh faktor internal sel seperti genotype, tahap perkembangan sel serta kandungan hormon endogen. Faktor internal tersebut akan berinteraksi juga dengan faktor eksternal yaitu kondisi kultur seperti konsentrasi zat pengatur eksogen, tekanan osmotik, pH media, kandungan asam amino dan konsentrasi hara makro dan mikro (Namasivayam 2007).



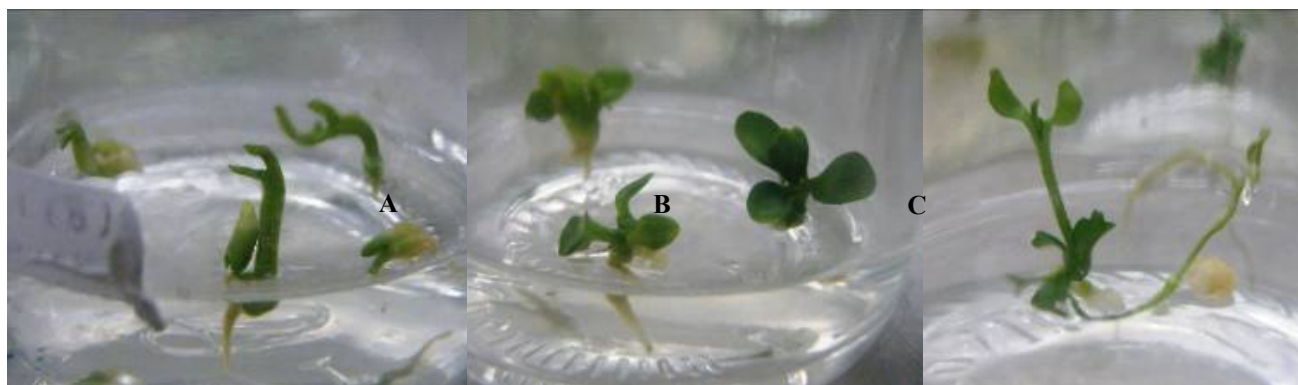
Gambar 1. Kalus embriogenik yang berumur 4 tahun sejak inisiasi. (A) Morfologi kalus; (B) Struktur kalus secara mikroskopis pada perbesaran 10 kali.



Gambar 2. Morfologi kalus setelah empat minggu di media MW. A. Warna kalus putih kekuningan dan bersifat friable (remah); B. Diameter kalus bertambah ditunjukkan oleh pertumbuhan kalus di luar lingkaran awal kalus; C. Struktur kalus secara mikroskopis (perbesaran 20 x), terdiri atas proembrio



Gambar 3. Morfologi kalus umur 4 MST di media MW yang mengandung 0.5 mgL⁻¹ ABA. A. Kalus membentuk embrio somatik; B. Kalus yang terdiri atas berbagai fase embrio somatik (perbesaran 20 x)



Gambar 4. Perkecambahan embrio fase kotiledon menjadi planlet di media MW yang ditambahkan $0.5 \text{ mgL}^{-1} \text{ GA}_3$. A. Umur 2 MST, B. Umur 4 MST, C. Umur 8 MST.



Gambar 6. Penyambungan planlet dengan batang bawah JC. A. Penyambungan in vitro umur 0 MST, B. Penyambungan in vitro umur 8 MST, C. Penyambungan ex vitro umur 0 MST, D. Penyambungan ex vitro umur 8 MST.

Tabel 1. Jumlah berbagai fase embrio somatik per kalus pada media MW yang mengandung $0.5 \text{ mgL}^{-1} \text{ ABA}$

Fase embrio somatik	4 MST	8 MST
Proembrio	7	2
Globular	3	5
Jantung	1	0
Torpedo	1	0
Kotiledon	0	4

Keterangan: MST = Minggu Setelah Tanam

Tabel 2. Persentase variasi morfologi daun pada planlet

Morfologi daun	Persentase (%)
Bentuk daun:	
<i>Elliptic</i>	50
<i>Lanceolate</i>	25
Abnormal	25
Tepi daun:	
<i>Dentate</i> (bergerigi)	50
<i>Entire</i> (tidak bergerigi)	50
Warna daun:	
Hijau	75
Hijau muda	25

Tabel 3. Kisaran, nilai rata-rata, standar deviasi dan ragam dari karakter kuantitatif planlet yang dihasilkan

Karakter	Kisaran	Rataan	SD	Ragam
Tinggi tunas (cm)	0.7-2.8	1.83	0.64	0.40
Jumlah cabang	0-4	0.94	1.39	1.93
Jumlah daun	1-8	3.75	1.85	3.40
Jumlah akar	0-2	0.38	0.72	0.52

Sifat embriogenik dari kalus yang dihasilkan terkait dengan asal eksplan yang digunakan yaitu jaringan nuselus. Nuselus merupakan suatu jaringan yang terbentuk bersamaan dengan perkembangan suatu biji tanaman. Sel-sel dari jaringan ini mempunyai sifat embriogenik, sehingga kalus yang dihasilkan juga memiliki sifat yang sama yaitu mudah membentuk embrio. Jaringan tersebut bersifat meristematis dan lebih responsif terhadap medium in vitro dibandingkan jaringan lain yang lebih dewasa (Devy et al. 2012). Pada tanaman jeruk, inisiasi kalus dari jaringan nuselus sangat berpotensi untuk berbagai macam tujuan seperti konservasi plasma nutfah, sebagai bahan

untuk isolasi protoplas pada fusi protoplas dan pembentukan embrio somatik untuk menghasilkan tanaman bebas virus. Protokol induksi kalus pada jeruk telah berhasil dilakukan pada berbagai jenis jeruk antara lain jeruk manis dan jeruk lemon (Mukhtar et al. 2005), jeruk Mandarin (Kayim dan Koc 2006), jeruk Limau madu (Agisimanto et al. 2012).

Regenerasi kalus melalui jalur embriogenesis somatik

Tahap awal regenerasi kalus secara embriogenesis somatik adalah pendewasaan embrio somatik. Kalus hasil dari proliferasi disubkultur ke media terbaik untuk pendewasaan embrio yaitu media MW dengan penambahan 0.5 mgL^{-1} ABA (Husni et al. 2010). Hasil pengamatan pada minggu keempat menunjukkan bahwa sebanyak 138 kalus mampu membentuk embrio somatik dari 250 kalus yang diamati atau 55.2%. Pada minggu kedelapan, jumlah kalus yang membentuk embrio somatik semakin meningkat menjadi 216 kalus atau 86.4%. Dari setiap kalus, selain ditemukan embrio fase globular, juga ditemukan fase kotiledon seperti tampak pada Gambar 3. Jumlah embrio fase globular lebih banyak ditemukan dibandingkan fase yang lain (Tabel 1).

Hasil pengamatan secara mikroskopis terhadap kalus menunjukkan bahwa embrio somatik fase globular dan fase kotiledon lebih banyak ditemukan dibandingkan fase jantung dan torpedo. Souza et al. (2011) juga lebih mudah mendeteksi embrio tahap globular pada *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Valencia. Kemungkinan fase jantung dan torpedo pada kebanyakan tanaman jeruk terjadi dalam waktu yang singkat sehingga sulit diamati. Tahapan atau fase embrio somatik pada tiap jenis tanaman berbeda-beda dan menjadi ciri khusus tanaman tersebut.

Memasuki tahap selanjutnya adalah perkecambahan embrio menjadi plantlet lengkap yang memiliki daun dan akar. Embrio yang telah dewasa atau fase kotiledon, disubkultur ke media MW yang mengandung 0.5 mgL^{-1} GA₃. Pada tahap ini, dari 100 kotiledon yang ditanam pada media MW yang ditambah 0.5 mgL^{-1} GA₃, 100% kotiledon mampu berkecambah menjadi plantlet. Diperlukan waktu sampai 8 MST untuk tumbuh menjadi plantlet lengkap (Gambar 4). Pada tahap ini diperoleh 100 plantlet yang sudah lengkap pertumbuhannya sehingga dapat dikarakterisasi secara morfologi.

Evaluasi keragaman fenotipe tunas regenerasi

Evaluasi dilakukan setelah tunas dewasa dan dapat diamati keragaan tunas, tinggi tunas, bentuk daun, warna daun serta tepi daun. Pengamatan terhadap plantlet yang dihasilkan menunjukkan keragaman bentuk daun, tepi daun dan warna daun berdasarkan pada daftar deskripsi jeruk (IPGRI 1999). Daun jeruk siam normal pada pohon yang tumbuh di lapang berbentuk *elliptic* dengan tepi daun *dentate* (bergerigi) dan berwarna hijau. Hasil pengamatan terhadap morfologi daun pada plantlet diperoleh tiga macam bentuk daun yaitu *elliptic*, *lanceolate* dan abnormal; dua macam tepi daun yaitu *dentate* dan *entire* serta dua macam warna daun yaitu hijau dan hijau muda. Dari 100 plantlet yang dikarakterisasi secara morfologi, diperoleh persentase plantlet yang bervariasi (Tabel 2).

Berdasarkan data morfologi tersebut, tampak bahwa hampir 50% plantlet masih menunjukkan morfologi yang normal. Namun, 25% plantlet memiliki bentuk daun yang tidak normal. Bentuk abnormal ini adalah bentuk seperti sendok yang cekung di bagian tengah dan memiliki diameter daun yang kecil (1-1.5 mm). Pengamatan terhadap warna daun menunjukkan 75% plantlet memiliki daun berwarna hijau. Dari semua plantlet yang diamati, semua daun hanya memiliki satu warna saja yaitu hijau atau hijau muda, tidak ditemukan plantlet yang daunnya memiliki dua warna atau lebih (belang).

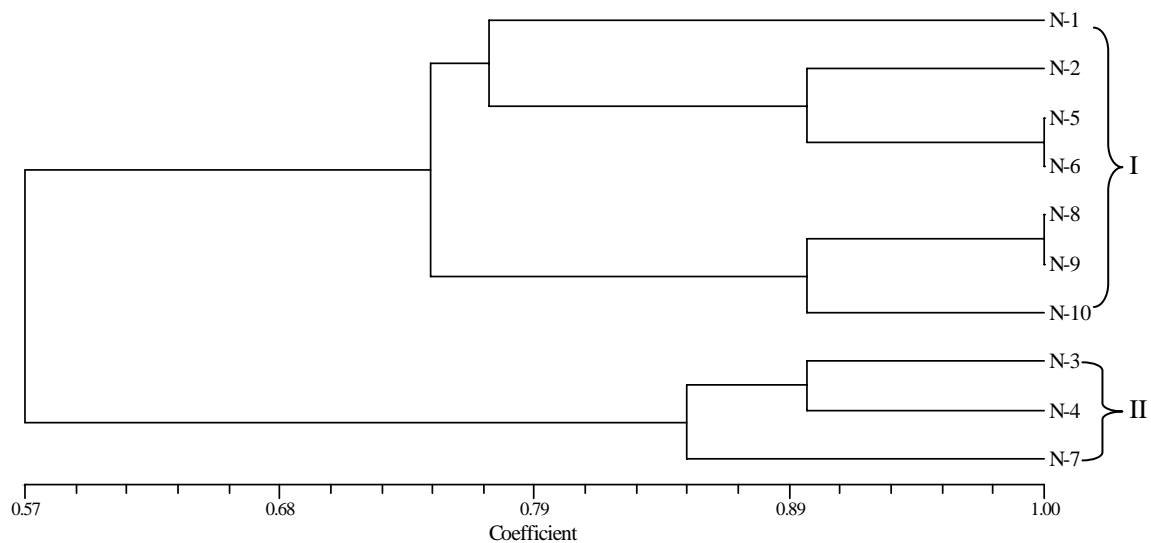
Pengamatan juga dilakukan terhadap empat karakter kuantitatif seperti tinggi tunas, jumlah cabang, jumlah daun dan jumlah akar. Dari hasil pengukuran diperoleh nilai rata-rata, standar deviasi dan ragam. Menurut Baihaki (1999), adanya variasi dari suatu populasi dapat dilihat nilai-nilai tersebut. Secara keseluruhan data disajikan pada Tabel 3.

Dari semua data morfologi, baik kualitatif maupun kuantitatif, diperoleh 10 macam variasi plantlet. Analisis gerombol dengan metode UPGMA berdasarkan karakterisasi morfologi terhadap 10 plantlet tersebut, diperoleh dendrogram dengan nilai koefisien kemiripan antara 0.57-1.00 (Gambar 5). Nilai koefisien kemiripan menunjukkan kesamaan individu dalam suatu populasi, semakin tinggi nilai koefisien kemiripan antar individu, maka semakin dekat jarak genetik antara individu tersebut (Qosim 2006). Plantlet yang diperoleh menunjukkan tingkat keragaman morfologi sebesar 43%. Plantlet terbagi menjadi dua kelompok pada nilai koefisien kemiripan 0.72. Kelompok I terdiri atas 7 plantlet yang dicirikan dengan bentuk daun *elliptic* dengan tepi daun *dentate* (bergerigi) dan berwarna hijau. Tinggi plantlet pada kelompok ini berkisar antara 1.5-2.1 cm, jumlah cabang 2-4, jumlah daun 4-6 serta jumlah akar 2. Pada kelompok ini terdapat dua pasang individu yang secara morfologi mirip yaitu N-5 dan N-6 serta N-8 dan N-9. Kelompok II terdiri atas 3 plantlet yang dicirikan oleh bentuk daun *lanceolate* dan bertepi daun *entire* serta berwarna hijau muda. Kisaran tinggi plantlet yang luas yaitu antara 0.7-2.8 cm, kisaran jumlah cabang antara 0-4, jumlah daun 1-8 serta jumlah akar 0-1.

Penyambungan secara in vitro dan ex vitro

Penyambungan sudah umum dilakukan oleh petani jeruk dengan tujuan meningkatkan kualitas dan produksi buah serta ketahanan terhadap penyakit. Penyambungan merupakan suatu teknik untuk mendapatkan bibit yang bermutu dengan cara menggabungkan sifat unggul yang dimiliki batang atas dengan sifat unggul yang terdapat pada batang bawah. Pada batang atas diharapkan dapat tumbuh tajuk yang memiliki kemampuan produksi buah yang tinggi dengan kualitas yang baik, sedangkan batang bawah diharapkan dapat menjadi penyokong yang kuat untuk pertumbuhan batang atas.

Penyambungan dapat dilakukan secara in vitro dan ex vitro, masing-masing teknik memiliki keunggulan. Penyambungan secara in vitro memiliki keuntungan yaitu kecocokan (*compatibility*) sambungan dapat dideteksi lebih dini dan lebih cepat. Penyambungan antara batang atas dan batang bawah dapat terjadi kecocokan (*compatibility*) atau



Gambar 5. Dendrogram hasil analisis gerombol dengan metode UPGMA terhadap 10 planlet hasil seleksi berdasarkan penanda morfologi.

ketidakcocokan (*incompatibility*). Sifat kecocokan pada tanaman sambungan sangat penting, karena akan mempengaruhi proses pertumbuhan selanjutnya. Keuntungan dari penyambungan secara *ex vitro* adalah mempercepat dan mengurangi tahapan *in vitro* seperti induksi perakaran, *hardening* dan aklimatisasi karena planlet sebagai batang atas tidak perlu memiliki akar (Ollitrault 1990).

Pengamatan terhadap penyambungan *in vitro* maupun *ex vitro* menunjukkan bahwa planlet mampu tumbuh sebesar 80% pada penyambungan *in vitro* dan 60% pada penyambungan *ex vitro*. Dua bulan setelah penyambungan *in vitro*, daun pada batang atas mulai tumbuh sebanyak 3.7 daun dengan tinggi tunas 2.8 cm. Pengamatan dua bulan setelah penyambungan *ex vitro* menunjukkan pertumbuhan daun sebanyak 5.8 daun dengan tinggi tunas 4.6 cm (Gambar 6). Berdasarkan data tersebut, maka penyambungan secara *in vitro* maupun secara *ex vitro* tidak berbeda respon pertumbuhannya. Penyambungan secara *ex vitro* lebih efisien daripada secara *in vitro*, karena tanaman hasil penyambungan sudah beradaptasi dengan lingkungan *ex vitro* dari awal penyambungan. Tanaman hasil penyambungan secara *in vitro* memerlukan tahap adaptasi dari kondisi *in vitro* ke kondisi *ex vitro*.

Tingkat keberhasilan penyambungan antara lain dipengaruhi oleh ketepatan penyambungan antara batang atas dan batang bawah sehingga jaringan kambium dan jaringan vaskular antara kedua batang dapat menempel dengan sempurna dan terhindar dari proses oksidasi yang dapat mengakibatkan pengeringan jaringan pada daerah pertautan (Devu et al. 2011).

Keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kalus yang telah lama dalam kultur *in vitro* masih memiliki kemampuan untuk proliferasi dan regenerasi menjadi planlet yang lengkap. Karakterisasi secara morfologi atau

fenotipe terhadap planlet yang dihasilkan menunjukkan terdapat keragaman bentuk daun, warna daun, tinggi tunas, jumlah cabang dan jumlah daun. Keragaman populasi planlet yang dihasilkan dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar dalam proses seleksi untuk tujuan peningkatan kualitas buah maupun untuk ketahanan terhadap cekaman abiotik maupun biotik. Evaluasi secara molekuler dan agronomi masih perlu dilanjutkan agar dapat memberikan informasi yang menyeluruh. Metode penyambungan secara *in vitro* maupun *ex vitro* yang telah dilakukan diharapkan dapat mempercepat pertumbuhan planlet yang dihasilkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Program Hibah Pasca LPPM IPB tahun 2011-2012 yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agisimanto D, Noor NM, Ibrahim R, Mohamad A. 2012. Efficient somatic embryo production of Limau madu (*Citrus suluensis* Hort. ex Tanaka) in liquid culture. *African J Biotechnol* 11 (12): 2879-2888.
- Ahloowalia BS, Maluszynski M. 2001. Induced mutations: a new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 167-173.
- Ashari H, Hanif Z. 2012. Teknologi pembungaan jeruk siam pada cekaman hujan tinggi (la-nina). Dalam: Melati M, Aziz SA, Efendi D, Armini NM, Sudarsono (ed). *Simposium dan Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI: Mendukung Kedaulatan Pangan dan Energi yang Berkelanjutan*. Bogor, 1-2 Mei 2012. Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB, Bogor.
- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Pl Growth Regul* 63: 147-173.

- Devy NF, Sugiyatno A, Yulianti F. 2011. Daya tumbuh tanaman jeruk kalamondin hasil perbanyakan via somatik embriogenesis in vitro pada batang bawah JC. *J Hort* 21 (3): 214-224.
- Devy NF, Yulianti F, Hardiyanto. 2012. Perbanyakan massal embrio kalamondin melalui teknologi somatik embriogenesis menggunakan bioreaktor. *J Hort* 22 (1): 1-7.
- Feher A, Pasternak TP, Dudits D. 2003. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. *Pl Cell Tiss Organ Cult* 74: 201-228.
- Husni A, Purwito A, Mariska I, Sudarsono. 2010. Regenerasi jeruk siam melalui embriogenesis somatik. *Jurnal AgroBiogen* 6 (2): 75-83.
- IPGRI [International Plant Genetic Resources Institute]. 1999. Descriptor for Citrus. IPGRI, Rome.
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Pl Mol Biol* 43:179-188.
- Kayim M, Koc NK. 2006. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. *Scientia Horticulturae* 109: 29-34.
- Kementan [Kementerian Pertanian]. 2012. BPS 2010 Olahan. <http://aplikasi.deptan.go.id/bdsp/index.asp> [10 April 2012]
- Mukhtar R, Khan MM, Rafiq R, Shahid A, Khan FA. 2005. In vitro regeneration and somatic embryogenesis in (*Citrus aurantifolia* and *Citrus sinensis*). *Intl J Agric Biol* 7 (3): 518-520.
- Namasivayam P. 2007. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Pl Cell Tiss Organ Cult* 90: 1-8.
- Ollitrault P. 1990. Somatic Embryo Grafting, A Promising Technique for Citrus Breeding and Propagation. ICSN 3rd Congress, Australia.
- Orbovic V, Calovic M, Vilorio Z, Nielsen B, Gmitter FG, Jr., Castle WS, Grosser JW. 2008. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161: 329-335.
- Qosim WA. 2006. Studi iradiasi sinar gamma pada kultur kalus nodular manggis untuk meningkatkan keragaman genetik dan morfologi regenerasi [Disertasi]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rohlf FJ. 1998. NTSYS-PC Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System Version 2.02 User Guide. Exeter Publishing Co. Ltd., USA
- Skirvin RM, Norton M, McPheeters KD. 1993. Somaclonal variation: has it proved useful for plant improvement? *Acta Hort* 336: 333-340.
- Soedjono S. 2003. Aplikasi mutasi induksi dan variasi somaklonal dalam pemuliaan tanaman. *Jurnal Litbang Pertanian* 22 (2): 70-78.
- Souza JMM, Tomaz ML, Arruda SCC, Demetrio CGB, Venables WN, Martinelli AP. 2011. Callus sieving is effective in improving synchronization and frequency of somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*. *Biologia Plantarum* 55 (4): 703-707.
- Yunita R. 2009. Pemanfaatan variasi somaklonal dan seleksi in vitro dalam perakitan tanaman toleran cekaman abiotik. *Jurnal Litbang Pertanian* 28 (4):142-148.