

Induksi Tunas dari Eksplan Kotiledon dan Epikotil *In Vitro* Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) Asal Kampar pada Media MS

SRI CAHYATI*, MAYTA NOVALIZA ISDA, WAHYU LESTARI

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Riau, Pekanbaru 28293
*email: sricahyati0593@yahoo.com

ABSTRAK

Jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.) asal Kampar merupakan salah satu buah andalan Provinsi Riau yang banyak digemari oleh masyarakat, namun produktivitasnya menurun karena serangan hama dan penyakit. Untuk menjaga keberadaan dan kelestarian jeruk siam asal Kampar, salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah melalui kultur *in vitro* dengan penggunaan kombinasi zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin pada eksplan kotiledon dan epikotil. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan sumber eksplan terbaik dan pengaruh konsentrasi kombinasi BAP, kinetin, dan NAA yang optimum dalam menginduksi tunas tanaman jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Terpadu Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan berbagai perlakuan konsentrasi, dengan pengamatan selama 42 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase eksplan hidup, pembengkakan eksplan kotiledon dan epikotil yaitu 100%, persentase terbentuk tunas terbaik yaitu 60 % pada eksplan epikotil dengan perlakuan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA dan persentase pembentukan kalus hanya terjadi pada eksplan epikotil dengan persentase tertinggi sebesar 100% pada 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin +1,0 mg/l NAA.

Kata Kunci: Epikotil, induksi tunas, *in vitro*, jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.), kotiledon.

ABSTRACT

Citrus nobilis Lour. (Siam Orange) from Kampar is one of the main fruits in Riau Province that is highly consumed by many people, but nowadays its productivity is lower due to pests and diseases. In order to maintain the availability of citrus from Kampar and to conserve this plant, an effort that can be done is by using *in vitro* culture with the use of a combination of growth regulator; cytokine and auxin using cotyledons and epicotyl explant. This study aimed to determine the best explant source and to know the effect of the concentration combination of BAP, kinetin, and NAA that optimal in inducing plant shoot of Siam orange. This study was conducted at Laboratory of Integrated Biology, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences using a completely randomized design (CRD) with various concentrations of treatments, and observed for 42 days. The results showed that the percentage of life explants, swelling cotyledon, and epicotyl explants was 100%, the percentage of best shoot formation was 60% on the epicotyls explant with 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l kinetin + 0.5 mg/l NAA. The percentage of callus formation only found in epicotyls explants with the highest percentage (100%) at 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l kinetin +1.0 mg/l NAA.

Keywords: *Citrus nobilis* Lour., cotyledons, epikotil, *in vitro*, shoot induction.

PENDAHULUAN

Jeruk (*Citrus* sp.) merupakan komoditi buah yang populer di dunia setelah anggur. Buah jeruk banyak mengandung vitamin C, vitamin A dan zat-zat mineral lainnya sebagai bahan pelengkap utama dalam menunjang gizi keluarga (Sarwono, 1982). Kabupaten Kampar pada awal tahun 2002 merupakan sentra penghasil jeruk terbesar di Provinsi Riau dengan jenis *Citrus nobilis* Lour. yang lebih dikenal dengan nama jeruk Siam. Distribusi jeruk siam asal Kampar sudah sampai ke Sumatra Barat dan Jakarta

(Anonim, 2009). Saat ini ketersediaan jeruk siam sudah berkurang akibat serangan hama dan penyakit diantaranya lalat buah, jamur *Phytophthora* dan CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*), akibatnya produktivitas jeruk siam semakin menurun sehingga tidak bisa memenuhi kebutuhan pasar dan petani jeruk mengganti lahannya menjadi tanaman lain seperti kelapa sawit (Balitbang (2011); Sutrisno (1991)).

Salah satu cara yang dapat membantu dalam penyediaan bibit jeruk siam asal Kampar adalah dengan perbanyak secara *in vitro* (Purba, 2012). Menurut Wattimena (1992) keberhasilan kultur *in vitro* ditentukan oleh zat pengatur tumbuh (ZPT). ZPT yang sering digunakan berasal dari kelompok sitokinin dan auksin. Pada penelitian ini digunakan medium MS sebagai medium dasar dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP (Benzyl Amino Purin), kinetin dan NAA (Naphthalene Acetic Acid).

Menurut Rahman *et al.* (2008) penggunaan eksplan kotiledon pada kultur *in vitro* dapat menyerap air lebih cepat sehingga mempercepat induksi tunas. Hal ini disebabkan karena struktur permukaan kotiledon memiliki sel-sel yang berfungsi untuk penyerapan air. Ramkrishna *et al.* (2005) juga menyatakan bahwa hasil perbanyak jeruk menggunakan eksplan kotiledon yang diuji dengan RAPD marker menunjukkan sifat yang sama dengan induknya.

Selain kotiledon yang dijadikan eksplan pada kultur *in vitro*, epikotil juga dapat digunakan sebagai eksplan. Epikotil adalah jaringan meristematis yang terdapat pada meristem apeks dan adventif sebagai titik tumbuh tanaman yang mengendalikan pertumbuhan. Beberapa keuntungan yang dapat dipertimbangkan dalam regenerasi tanaman melalui kultur epikotil adalah lebih efektif karena daya regenerasinya tinggi, waktu pembentukan tunas lebih singkat dan efisien serta aklimatisasinya cenderung mudah dilakukan karena sistem pembuluhnya terbentuk lebih sempurna (Slamet *et al.*, 2011). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dan konsentrasi optimum BAP, kinetin dan NAA serta menentukan tipe eksplan terbaik dalam menginduksi tunas jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.) asal Kampar.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari – April 2015 di Laboratorium Biologi Terpadu, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Riau. Alat yang digunakan antara lain: botol kultur, pipet tetes, gelas ukur, cawan petri, gelas kimia dan *erlenmeyer*, timbangan analitik, *hot plate*, *autoclave*, *laminar air flow cabinet*, pinset, *scalpel*, mata pisau, lampu bunsen, batang pengaduk, *sprayer*, rak kultur, panci enamel dan oven.

Bahan penelitian yang digunakan sebagai eksplan adalah kotiledon dan epikotil *in vitro* berumur 2 minggu dari jeruk siam yang diambil dari Desa Belimbing 2, Kecamatan Kuok, Kabupaten Kampar. Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk induksi tunas pada kultur *in vitro* antara lain: media MS (Murashige & Skoog, 1962) (*Phyto technology Laboratories*) kemasan 10 liter, agar-agar, sukrosa, alkohol, BAP, Kinetin, NAA, 0,1N HCL, 0,1N NaOH, NA-hipoklorit (*Bayclin*), fungisida Dithane M-45, bakterisida Plantomycin, spiritus, akuades, plastik, *aluminium foil*, tisu gulung, karet gelang, plastik dan kertas label.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 7 kombinasi perlakuan dengan 2 jenis eksplan yaitu kotiledon dan epikotil diulang sebanyak 5 kali sehingga dihasilkan 70 unit percobaan (botol). Pelaksanaan penelitian meliputi sterilisasi alat, pembuatan media tanam, persiapan dan penanaman eksplan. pemeliharaan dilakukan dengan menjaga ruang inkubasi agar kondisinya selalu bersih dan steril. Pemeliharaan ruang inkubasi dengan menyemprotkan 70 % alkohol 2 hari sekali. Suhu ruang diatur 23-25°C dan diberi penyinaran dengan menggunakan lampu.

Parameter dalam penelitian meliputi: persentase eksplan hidup (%), persentase terbentuknya tunas (%), persentase pembengkakan (%) dan persentase pembentukan kalus (%).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Eksplan Hidup dan Terbentuk Tunas Jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.) asal Kampar

Persentase eksplan yang hidup dan pembentukan tunas pada eksplan kotiledon dan epikotil *in vitro* jeruk siam asal Kampar dengan pemberian kombinasi BAP, kinetin, dan NAA disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Persentase eksplan hidup dan persentase pembentukan tunas dari eksplan kotiledon dan epikotil *in vitro* 42 hst

Kode perlakuan	Perlakuan			Hidup (%)		Tunas (%)	
	BAP	Kinetin	NAA	Kotiledon	Epikotil	Kotiledon	Epikotil
A	1,0	0,5	0,5	100	100	0	60
B	2,0	0,5	0,5	100	100	20	20
C	1,0	1,0	0,5	100	100	0	20
D	2,0	0,5	1,0	100	100	20	40
E	2,0	1,0	1,0	100	100	20	0
F	1,0	-	0,5	100	100	0	20
G	1,0	-	1,0	100	100	0	0

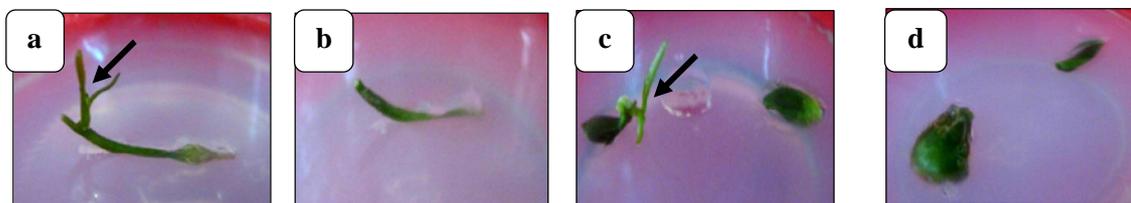
Tabel 1 menunjukkan bahwa pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh (BAP, kinetin, dan NAA) tidak memberikan pengaruh nyata pada persentase eksplan hidup dimana hasil yang didapat setiap perlakuan sama yaitu 100% baik pada eksplan kotiledon maupun epikotil. Tingginya persentase eksplan hidup, menunjukkan bahwa metode sterilisasi dan penanaman eksplan yang digunakan dalam penelitian ini sudah tepat. Menurut Rahmahayu (2014) penggunaan konsentrasi dan lama perlakuan dalam metode yang digunakan tidak menyebabkan kerusakan jaringan sehingga eksplan tidak mengalami kematian. Eksplan yang hidup pada penelitian merupakan eksplan yang dicirikan dengan warnanya masih hijau, tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme hingga akhir pengamatan dan eksplan tidak mengalami kekeringan. Selain itu media juga mempengaruhi keberhasilan dari penelitian ini. Menurut Gunawan (1987) bahwa pertumbuhan dan perkembangan eksplan juga dipengaruhi oleh media yang digunakan salah satunya adalah media Murashige & Skoog (MS). Media MS merupakan media yang cocok untuk pertumbuhan dan perkembangan hampir semua jenis tanaman. Selanjutnya ukuran dan umur eksplan yang digunakan juga mempengaruhi faktor hidup dari eksplan. Pada penelitian ini ukuran eksplan yang digunakan adalah 2 cm dari bagian epikotil. Markal (2015) menyatakan bahwa penggunaan eksplan dengan ukuran 2 cm memudahkan dalam penanaman dan sterilisasi. Menurut Darmono (2003) bahwa keberhasilan kultur *in vitro* juga ditentukan oleh sumber dan ukuran dari eksplan yang digunakan dimana ukuran eksplan yang kecil (0,5 – 2,0 cm) kemungkinan mendapatkan kondisi eksplan yang steril lebih besar.

Pada tabel juga terlihat tingginya persentase hidup dari eksplan kotiledon dalam penelitian ini disebabkan oleh adanya cadangan makanan berupa karbohidrat yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Hal ini sesuai dengan pernyataan Franch *et al.* (1985) bahwa endosperm merupakan cadangan makanan pada biji yang mengandung karbohidrat dan lemak untuk perkembangan embrio agar tetap hidup dan membentuk tunas. Perkembangan organ dari kultur *in vitro* dipengaruhi oleh faktor-faktor endogen dan eksogen. Menurut Watimenna *et al.* (1992) menambahkan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis tanaman adalah genotipe dari eksplan yang digunakan, media yang mencakup komponen penyusun media dan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan, lingkungan tumbuh, keadaan fisik tempat kultur ditumbuhkan dan fisiologi jaringan eksplan yang digunakan.

Pada penelitian ini persentase pembentukan tunas menggunakan eksplan kotiledon mencapai 0 - 20%. Perlakuan yang mampu menghasilkan 20% pembentukan tunas merupakan perlakuan dengan pemberian 2,0 mg/l BAP yaitu (2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA (B), 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 1,0 mg/l NAA (D) dan 2,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l kinetin + 1,0 mg/l NAA (E)) sedangkan pemberian 1,0 mg/l BAP tidak terbentuk tunas (1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA (A), 1,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA (C), 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA (F) dan 1,0 mg/l BAP + 1,0mg/l NAA (G)) . Hal ini diduga tingginya pemberian konsentrasi BAP sehingga eksplan mampu membentuk tunas. Pemberian BAP dan kinetin berpengaruh terhadap persentase pembentukan eksplan, hal ini terlihat pada Tabel 1 bahwa pemberian BAP dan kinetin dalam konsentrasi rendah tidak mampu menumbuhkan tunas, hal ini diduga hormon endogen yang berada pada eksplan belum cukup mampu untuk menginduksi tunas. Menurut Maryani & Zamroni (2005), zat pengatur tumbuh sitokinin berperan dalam pembelahan sel dan morfogenesis, sedangkan auksin berperan dalam mengatur pertumbuhan dan pemanjangan sel. Hal ini menunjukkan bahwa adanya hormon sitokinin dan auksin dalam konsentrasi tertentu mampu membentuk tunas.

Pada penelitian persentase terbentuknya tunas pada 42 hari pengamatan kedua jenis eksplan sangat rendah dimana setiap perlakuan yang diberikan belum mampu membentuk tunas yang lebih tinggi. Eksplan kotiledon menghasilkan tunas lebih rendah dibandingkan epikotil sebesar 20% pada perlakuan 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA (B), 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 1,0 mg/l NAA (D) dan 2,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l kinetin + 1,0 mg/l NAA (E). Berdasarkan data persentase terbentuknya tunas terlihat bahwa rasio pembentukan tunas eksplan epikotil lebih baik dari eksplan kotiledon,

perbedaan tersebut diduga asal eksplan yang digunakan dimana eksplan epikotil diambil dari biji *in vitro* yang kemudian digunakan lagi sebagai eksplan kotiledon sehingga cadangan makanan telah berkurang dan mengakibatkan persentase pertumbuhan tunas dari eksplan kotiledon lebih rendah dibandingkan dari eksplan epikotil. Berbeda dari penelitian yang dilakukan oleh Rahman *et al.* (2008) yang langsung membagi kotiledon menjadi dua bagian kotiledon (3/4 bagian) dan 1/4 bagian lainnya ditanam untuk menumbuhkan epikotil. Hasil penelitian Sarma *et al.* (2011) menggunakan eksplan kotiledon persentase tunas tertinggi diperoleh pada perlakuan 6 mg/l BAP + 0,25 mg/l kinetin + 0,25 mg/l NAA sebesar 48%. Penambahan sitokinin yang diberikan secara eksogen dalam penelitian ini belum cukup mampu menumbuhkan tunas pada eksplan, sehingga persentase pembentukan tunas masih sangat rendah (Gambar 1.a). Rendahnya persentase terbentuknya tunas pada eksplan kotiledon *in vitro* diduga karena menurunnya tingkat meristematik dari eksplan, karena embrionuselar pada kotiledon sudah tumbuh dan kotiledon semakin lama semakin mengalami penuaan sehingga menghambat pertumbuhan tunas (Gambar 1.b). Menurut Fereol *et al.* (2002), auksin umumnya menghambat pertumbuhan tunas, sedangkan kombinasi konsentrasi sitokinin yang tinggi dengan auksin rendah penting dalam pembentukan tunas dan daun. Penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan bagian eksplan jeruk yang berbeda menghasilkan respons yang berbeda pula, ini terbukti dari hasil penelitian yang diperoleh yaitu persentase terbentuknya tunas dari eksplan epikotil lebih tinggi dibandingkan eksplan kotiledon.



Gambar 1. Morfologi tunas yang terbentuk pada eksplan kotiledon dan epikotil *in vitro* pada 42 hari pengamatan. (a) eksplan kotiledon yang membentuk tunas pada perlakuan 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA, (b) eksplan kotiledon yang tidak membentuk tunas pada perlakuan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA eksplan, (c) eksplan epikotil yang membentuk tunas pada perlakuan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA dan (d) epikotil yang tidak membentuk tunas pada perlakuan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA. Keterangan: tanda panah menunjukkan tunas

Persentase pembentukan tunas pada eksplan epikotil mencapai 0-60 %. Perlakuan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA (A) mampu membentuk tunas dengan persentase tertinggi yaitu 60%. Namun terjadi penurunan persentase pada perlakuan lainnya yaitu perlakuan 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 1,0 mg/l NAA (D) persentase pembentukan tunas sebanyak 40 %, kemudian perlakuan 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA (B), 1,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA (C) dan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA (F) hanya mampu membentuk tunas sebesar 20%. Terjadinya penurunan persentase pembentukan tunas ini diduga konsentrasi 1,0 mg/l BAP sudah mencukupi untuk pembentukan tunas karena di dalam eksplan ada jaringan meristematik sedangkan perlakuan tanpa kinetin dan penambahan konsentrasi NAA lebih tinggi mengakibatkan kandungan sitokinin menurun begitu pula apabila konsentrasi BAP dan kinetin rendah ditambah dengan NAA menurunkan sitokinin terhadap auksin sehingga menghambat pembentukan tunas. Hal ini didukung oleh Enjoni (2004) bahwa besarnya konsentrasi sitokinin yang ditambahkan berkaitan erat dengan kandungan hormon yang ada di dalam jaringan eksplan.

Pada eksplan epikotil persentase tunas tertinggi adalah 60% pada perlakuan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA (Gambar 1.c). Penggunaan zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi yang sama pada penelitian Singh *et al.* (1994) menghasilkan persentase terbentuknya tunas tertinggi sebesar 70% pada jeruk *Citrus reticulata* dan 75% untuk jeruk *Citrus limon*. Penelitian yang dilakukan oleh Dejam *et al.* (2006) menggunakan eksplan epikotil dengan zpt yang berbeda (4,0 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA) menghasilkan persentase tunas terbaik sebesar 80,33%. Rendahnya persentase tunas dari eksplan epikotil dalam penelitian diduga disebabkan oleh konsentrasi sitokinin yang digunakan dalam penelitian ini lebih rendah dibandingkan sitokinin yang digunakan oleh Dejam *et al.* (2006). Menurut George dan Sherrington (1984) bahwa konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi auksin akan memacu multiplikasi tunas. Pada perlakuan 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA eksplan epikotil tidak membentuk tunas (Gambar 1.d), hal ini diduga karena jumlah BAP yang diberikan belum mampu untuk membentuk tunas. Menurut Pierik (1987) bahwa penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin

eksogen akan mempengaruhi zat pengatur tumbuh endogen dalam pembentukan tunas. Penggunaan sitokinin antara 0,1-10 mg/l mampu menginduksi pembentukan tunas sesuai dengan kultivar.

Kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan NAA tanpa kinetin pada eksplan epikotil dan kotiledon menunjukkan persentase pembentukan tunas yang masih rendah. Persentase pembentukan tunas pada eksplan epikotil sebesar 20% pada perlakuan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA. Berbeda dengan hasil penelitian Oliveira *et al.* (2010) pada eksplan internodus berbagai kultivar jeruk menggunakan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA menghasilkan persentase tunas 61,81% kultivar pera, 52,72% kultivar valencia, 63,63% kultivar bahia dan 58,17% kultivar cravo. Hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan kultivar jeruk dan tipe eksplan yang berbeda menghasilkan respons yang berbeda pula. Sedangkan dalam penelitian ini pada perlakuan 1,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l NAA belum cukup mampu membentuk tunas. Rendahnya nilai persentase terbentuk tunas diduga konsentrasi BAP belum optimum dalam menginduksi tunas. Wattimena *et al.* (1992) menyatakan bahwa induksi tunas hanya memerlukan sitokinin dalam konsentrasi optimum tanpa auksin atau dengan auksin dalam konsentrasi yang sangat rendah.

Persentase pembentukan tunas pada eksplan kotiledon dengan perlakuan tanpa kinetin tidak mampu menumbuhkan tunas yaitu pada perlakuan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA dan 1,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l NAA. Hal ini diduga karena ketidakmampuan eksplan dalam menyerap hara dan zat pengatur tumbuh yang diberikan sehingga eksplan kotiledon hanya mampu mengalami pembengkakan. Gardner *et al.* (1991) menyatakan bahwa respons tanaman terhadap hormon dan zat pengatur tumbuh sangatlah bervariasi tergantung pada kepekaan organ tersebut. Sedangkan Rahmi *et al.* (2010) menyatakan bahwa bekerjanya hormon dan zat pengatur tumbuh yang diberikan pada jaringan tanaman yang tanggap, akan membawa perubahan yang akibatnya dapat diukur pada pengaruh fisiologis dan morfologis tanaman.

Persentase Pembengkakan dan Pembentukan Kalus pada Eksplan

Berdasarkan pengamatan sampai 42 hari juga dilihat respons pembengkakan dan pembentukan kalus, hal ini dikarenakan pada seluruh perlakuan menunjukkan respons yang sama, untuk itu respons pembengkakan dan pembentukan kalus pada eksplan diamati sampai akhir pengamatan (Tabel 2).

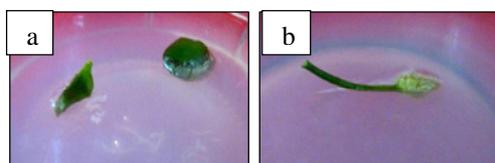
Tabel 2. Persentase Pembengkakan dan Pembentukan Kalus dari eksplan kotiledon dan epikotil *in vitro* selama 42 hari

Kode Perlakuan	Perlakuan			Pembengkakan (%)		Kalus (%)	
	BAP	Kinetin	NAA	Kotiledon	Epikotil	Kotiledon	Epikotil
A	1,0	0,5	0,5	100	100	0	60
B	2,0	0,5	0,5	100	100	0	60
C	1,0	1,0	0,5	100	100	0	20
D	2,0	0,5	1,0	100	100	0	100
E	2,0	1,0	1,0	100	100	0	20
F	1,0	-	0,5	100	100	0	60
G	1,0	-	1,0	100	100	0	60

Pengamatan yang dilakukan selama 42 hari dalam penelitian ini menunjukkan bahwa respons awal pada eksplan yaitu terjadinya penambahan ukuran atau pembengkakan eksplan (Tabel 2). Pembengkakan sel pada eksplan terjadi akibat adanya penyerapan air oleh sel yang dipengaruhi oleh auksin yang mengakibatkan dinding sel mengendur dan membesar, sehingga ukuran eksplan membesar. Menurut Abidin (1983) auksin dapat meningkatkan proses penyerapan air oleh sel dikarenakan auksin dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, serta meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel. Pembengkakan pada eksplan terjadi karena adanya aktivitas auksin. Diduga di dalam eksplan masih terdapat auksin endogen yang cukup untuk memobilisasi sel-sel guna membentuk individu-individu baru. Menurut Wattimena (1988) fungsi auksin yaitu merangsang pembesaran sel. Selanjutnya dijelaskan pula bahwa membesarnya sel dikarenakan auksin merangsang ATP-ase untuk memompa ion H⁺ pada dinding sel yang menyebabkan pH dinding sel turun. Penumpukan ion H⁺ pada dinding sel menyebabkan dinding sel menjadi renggang, akibatnya tekanan dinding sel berkurang dan air masuk ke dalam sel hingga terjadi pembesaran sel. Menurut Harliana *et al.* (2012) membesarnya ukuran eksplan menunjukkan terjadinya pertumbuhan pada eksplan tersebut karena nutrisi dan suplai makanan terpenuhi. Hal yang sama juga didapatkan pada penelitian yang dilakukan Rahman *et al.* (2008), dimana eksplan kotiledon *Citrus maxima* (Burm.) Merr. cv Cikenong dalam semua perlakuan mengalami

penambahan ukuran atau pembengkakan pada eksplan sampai kotiledon bertunas. Pembengkakan juga terjadi pada eksplan pucuk jarak pagar sebelum terbentuk kalus atau langsung membentuk tunas (Fitri *et al.*, 2012).

Organogenesis adalah proses terbentuknya organ seperti pucuk dan akar (Gunawan, 1992). Terdapat dua cara terjadinya organogenesis yaitu secara langsung atau tidak langsung. Organogenesis langsung terjadi tanpa terbentuknya kalus terlebih dahulu sedangkan organogenesis tidak langsung diawali dengan pembentukan kalus lalu muncul organ pada kalus (Acquaah, 2004). Pada Tabel 2 terlihat bahwa persentase kalus yang terbentuk dari eksplan epikotil dalam penelitian ini cukup tinggi, hal ini menunjukkan bahwa induksi tunas dari eksplan epikotil merupakan organogenesis tidak langsung karena diawali pertumbuhan kalus sebelum terbentuk tunas. Berbeda dengan eksplan kotiledon pembentukan tunas terjadi secara langsung tanpa pembentukan kalus (Gambar 2.a). Perlakuan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA merupakan persentase terbentuknya kalus tertinggi, dimana terbentuknya kalus juga dipengaruhi oleh konsentrasi kombinasi zat pengatur tumbuh yang diberikan. Jika diberikan dalam jumlah yang seimbang, sitokinin dan auksin akan mendorong pembentukan kalus (Yusnita, 2003). Diduga konsentrasi auksin endogen yang terdapat pada eksplan dalam keadaan tinggi sehingga dengan penambahan sitokinin dan auksin eksogen mampu memicu pertumbuhan kalus sebanyak 60%.



Gambar 2. Morfologi kalus yang terbentuk pada eksplan jeruk siam, (a) eksplan kotiledon tidak membentuk kalus (b) eksplan epikotil membentuk kalus. Keterangan: lingkaran menunjukkan kalus

Selain organogenesis tidak langsung faktor yang menyebabkan tumbuhnya kalus pada eksplan adalah respons pelukaan eksplan. Diketahui bahwa inisiasi eksplan yang berasal dari epikotil diawali dengan pemotongan eksplan pelukaan yang terjadi pada epikotil akibat pemotongan eksplan menyebabkan mampu membentuk kalus (Gambar 2.b). Hal ini sesuai dengan pernyataan Pierik (1987) dan Suryowinoto (1996) bahwa proses terjadinya kalus disebabkan oleh adanya rangsangan luka, rangsangan tersebut menyebabkan kesetimbangan pada dinding sel berubah arah, sebagian protoplas mengalir keluar sehingga mulai terbentuk kalus. Ditambahkan Lizawati *et al.* (2012) bahwa terbentuknya kalus juga disebabkan sel-sel kontak dengan media terdorong menjadi meristematik dan selanjutnya aktif mengadakan pembelahan seperti jaringan penutup luka. Hartmann *et al.* (1990) dan Dwiyono (2009) juga menyatakan kalus yang dihasilkan melalui propagasi secara *in vitro* terbentuk karena adanya pelukaan pada jaringan dan respons terhadap hormon.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase eksplan hidup, pembengkakan eksplan kotiledon dan epikotil yaitu 100%, persentase terbentuk tunas terbaik yaitu 60% pada eksplan epikotil dengan perlakuan 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l NAA dan persentase pembentukan kalus hanya terjadi pada eksplan epikotil dengan persentase tertinggi sebesar 100% pada 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 1,0 mg/l NAA. Sumber eksplan yang cenderung lebih baik dari penelitian ini adalah eksplan epikotil dibandingkan eksplan kotiledon.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terselenggara atas bantuan dana penelitian dari BOPTN Universitas Riau tahun 2014 atas nama Dr. Mayta Novaliza Isda, M.Si.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin Z. 1983. *Dasar-Dasar tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Anonim. 2009. Teknik *In vitro*. <http://www.ipteknet.id/ind/>. [11 Maret 2014]
- Acquaah, 2004. *Understanding Biotechnology, an Integrated and Cyber Based Approach*. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
- Balitbang. 2011. [http://www.Riauonline.com/Berita/Print/Balitbang Sukses Teliti Jeruk Carizzo dan Siam Kampar.html](http://www.Riauonline.com/Berita/Print/Balitbang%20Sukses%20Teliti%20Jeruk%20Carizzo%20dan%20Siam%20Kampar.html). [14 Mei 2014].

- Darmono DW. 2003. *Menghasilkan Angrek Silangan*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Dejam M, M. Khosh-khui, A Shekafandeh. 2006. Adventitious Bud Induction and Plant Regeneration in Epicotyl Segments of Bakrai (*Citrus reticulata* Blanco x *C. limetta* Swing.). *International Journal of Agricultural Research* 1(1): 14-19.
- Dwiyono E. 2009. Induksi Kalus Tanaman Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dengan Perlakuan Kondisi Gelap dan 2,4-D [Skripsi]. Surakarta Fakultas Pertanian UNS.
- Enjoni. 2004. Respon Eksplan Pucuk Tanaman Jeruk (*Citrus* sp.) terhadap Konsentrasi NAA dan BAP pada Inisiasi dan Proliferasi Tunas secara *In Vitro*. [Tesis]. Pascasarjana, Universitas Andalas.
- Fereol L, Chovelon V, Causse SI, Michary-Ferriere N, Kahane. 2002. Evidence of Somatic Embryogenesis Process for Plant Regeneration in Garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 21: 197-203.
- Fitri MS, Zairin T, Essy H. 2012. *In Vitro* Effect of Combined Indole Butyric Acid (IBA) and Benzylaminopurine (BAP) on the Planlet Growth of *Jatropha curcas* L. *Jurnal Natural*. 12: 1.
- Franch JP, L Oglesby, AC Zielinski. 1985. Plant Regeneration from Embryo Derived Tissue Cultures of Soy Beans. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 21 (11): 653-658.
- Gardner FP, Pearce RB, Mitchell LG. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- George EF, Sherrington PD. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Eastern Press. England.
- Gunawan LW. 1987. *Teknik In Vitro dalam Hortikultura*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Gunawan LW. 1992. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi IPB Bogor.
- Harliana, Weaniati, Muslimin, IN Suwastika. 2012. Organogenesis Tanaman Jeruk Keprok (*Citrus nobilis* Lour.) secara *In Vitro* pada Media MS dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi IAA (*Indole Acetic Acid*) dan BAP (*Benzylaminopurin*). *Jurnal Natural Science*. 1.(1): 34-42.
- Lizawati, Neliyati, Retna D. 2012. Induksi Kalus Eksplan Daun Durian (*Durio zibethinus* Merr. cv. Selat Jambi) pada Beberapa Kombinasi 2,4-D dan BAP. 1: 1.
- Markal A. 2015. Perbanyak Anggrek *Grammatophyllum Scriptum* (Lindl.) Bl. Melalui Induksi Tunas secara *In Vitro* dengan Penambahan BAP dan NAA. [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau. Pekanbaru
- Maryani Y, Zamroni. 2005. Penggandaan Tunas Krisan melalui Kultur Jaringan. *Ilmu Pertanian*. 12(1): 51-55.
- Oliveira MLPDO, Marcio GCC, Crislene VDS, Wagner CO. 2010. Growth Regulators, Culture Media and Antibiotics in the *In Vitro* Bud Regeneration from Mature of Citrus Cultivars. *Pesq. Agropec. Bras*. 45. (7):654-660.
- Pierik RM. 1987. *In Vitro* Culture of Hinger Plant. Martinus Nijhoff Publisher. Netherlands.
- Purba L. 2013. Induksi Tunas secara *In Vitro* dari Biji Utuh dan Kotiledon Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) asal Kampar dengan Pemberian *Benzylaminopurine* (BAP). [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Rahmahayu. 2014. Induksi Tunas Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) asal Kampar dengan Pemberian *Benzylaminopurine* (BAP) dan Naphthalene Asetic Acid (NAA) secara *In Vitro*. [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Rahman IB, BS Purwoko, IS Dewi. 2008. Perbanyak Jeruk Besar *Citrus maxima* (Burm.) Merr, Kultivar Cikoneng dengan Eksplan Kotiledon dan Epikotil, Makalah Seminar Departemen Agronomi dan Hortikultura. Fakultas Pertanian IPB. Bogor.
- Rahmi I, Irfan S, Tamsil B. 2010. Pengaruh Pemberian Konsentrasi BAP dan NAA Terhadap Multiplikasi Tunas Pucuk Jeruk Kanci (*Citrus* sp.) secara *In Vitro*. *Jerami*. 3(3).
- Ramkrishna N, Khawale, SK Singh. 2005. *In Vitro* Adventitive Embryonic In Citrus: A Technique For Citrus gerImplasm Exchange. *Current Science*. New Dehli India.
- Sarma C, A Borthakur, S Singh, KM Modi, P Sen. 2011. Efficient *In Vitro* Plant Regeneration from Cotyledonary Explants of *Reticulate* L. Blanco, Scholars Research.
- Sarwono B. 1982. *Jeruk Nipis dan Pemanfaatannya*. PT. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Singh SBK, Ray S. Bhattacharyya, PC Deka. 1994. *In Vitro* Propagation of *Citrus reticulata* Balanco. and *Citrus limon* Burm. *F. Hortscienc*. 29: 214-216.
- Slamet, SJ Pardal, M. Herman, Wartono. 2011. Regenerasi Kedelai Melalui Kultur Epikotil dan Teknik Aklimatisasi. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 30: 1.
- Smith RH. 2000. *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. Second Edition. Academic Press. USA.
- Suryowinoto M. 1996. *Pemuliaan Tanaman secara In Vitro*. Kanisius. Yogyakarta.

- Sutrisno S. 1991. Current Fruit Fly Problems in Indonesia. *Proceeding of International Symposium on the Biology and Control of Fruit Flies*. Okinawa- Japan 2-4 September.72-78
- Wattimena GA. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh*. Pusat Antar Universitas. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wattimena GA, Gunawan WL, Mattjik AN, Syamsudin E, Wiendi AMN, Erawati A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. Pusat Antar Spesies. IPB. Bogor.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan*. Agromedia Pustaka. Jakarta.