

POTENSI PEMANFAATAN TEKNOLOGI EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO* DALAM PERBANYAKAN MASSAL BENIH JERUK BEBAS PENYAKIT

Potential Use of In Vitro Somatic Embryogenesis Technology for Mass Propagation of Disease-Free Citrus Seeds

Nirmala Friyanti Devy¹ dan Hardiyanto²

¹Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika
Jalan Raya Tlekung No. 1 Junrejo, Kota Batu 65301, Malang, Indonesia
Telp. (0341) 592683, Faks. (0341) 593047
E-mail: nfdevy@gmail.com; balitjestro@litbang.pertanian.go.id; webbalitjestro@gmail.com

²Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sumatera Barat
Jalan Raya Padang-Solok km 40 Sukarami, Solok 27366, Indonesia
Telp. (0755) 31122, 31564, Faks. (0755) 731138
E-mail: hardiyanto85@yahoo.com; bptp-sumbar@litbang.pertanian.go.id

Diterima: 12 Agustus 2015; Direvisi: 22 Oktober 2015; Disetujui: 3 November 2015

ABSTRAK

Mata tempel yang digunakan sebagai batang atas benih sebar jeruk di Indonesia berasal dari tanaman induk di Blok Penggandaan Mata Tempel (BPMT). Tanaman induk tersebut merupakan turunan dari produk *shoot tip grafting* (STG) *in vitro* yang menghasilkan induk jeruk bebas penyakit dan identik dengan induknya. Dengan makin berkembangnya teknologi kultur *in vitro*, benih sebar yang sehat dan serupa induknya dapat dihasilkan melalui teknologi embriogenesis somatik (ES). ES merupakan suatu proses di mana sel-sel somatik (haploid maupun diploid) berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio tanpa melalui fusi gamet. Banyak faktor yang memengaruhi keberhasilan proses tersebut, antara lain genotipe, jenis dan fase perkembangan eksplan, serta komposisi dan jenis media kultur. Tanaman jeruk hasil ES secara genetik identik dengan induknya, namun subkultur berulang dapat menyebabkan terjadinya variasi somaklonal. Teknologi ini juga efektif untuk mengeliminasi penyakit virus dan penyakit Huanglongbing (CVPD) yang terbawa induk. Namun adanya karakter juvenil pada produk tanamannya menghambat upaya penyediaan benih jeruk bebas penyakit di Indonesia secara cepat. Untuk mengatasinya dikembangkan teknik sambung embrio kotiledon atau planlet hasil ES pada batang bawah jeruk secara *ex vitro*. Dengan cara ini, tanaman yang dihasilkan dapat tumbuh, berbunga, dan berproduksi dengan rentang waktu normal di lapangan. Penggunaan teknologi ES diharapkan dapat mempercepat produksi massal benih jeruk bebas penyakit pada masa mendatang.

Kata kunci: Jeruk, embriogenesis somatik, perbanyakan tanaman, benih bebas penyakit

ABSTRACT

The buds used as stock material of citrus plants in Indonesia are produced from Budwood Multiplication Block (BMB). These plants are derivative of mother stock resulted from *in vitro* shoot-tip-grafting (STG) which produces the true-to-type and disease-free stock materials. By using the advanced *in vitro* culture technology, healthy and parent alike plants can also be generated through

somatic embryogenesis (SE) technology. SE is a process by which somatic cells (haploid and diploid) developed to form a new plant through the stages of embryo development without going through the fusion of gametes. Many factors could influence the success of the process, i.e. genotypes, type and phase of explant development, and type of culture media. ES-derived plants are genetically identical as their parents. In other hand, by subjecting the explants in some subculturing treatments, it would induce the somaclonal variation. Beside the true-to-type character, this technology also effectively eliminates viral diseases and the Huanglongbing disease (CVPD) carried away from its mother. However, the juvenile character of SE-product plants is a major obstacle in producing disease-free citrus plants in Indonesia. To overcome these problems, a technique of grafting the cotyledonary embryos or plantlets on to a citrus rootstock *ex vitro* is developed. In the field, those grafted plants have satisfactorily morphological performance. The use of SE technology is expected to accelerate mass production of disease-free citrus seeds in the future.

Keywords: Citrus, somatic embryogenesis, plant propagation, diseases-free seedlings

PENDAHULUAN

Benih jeruk bebas penyakit di Indonesia saat ini diperoleh melalui penyambungan batang bawah dengan mata tempel dari tanaman induk di Blok Penggandaan Mata Tempel (BPMT), sedangkan tanaman induk tersebut berasal dari tanaman kelas Blok Fondasi (BF). Alur ini merupakan tahapan standar dalam produksi benih secara nasional. Induk suatu varietas jeruk merupakan hasil pembersihan pohon induk tunggal (PIT) dengan teknologi *shoot tip grafting* (STG) *in vitro* sehingga induk bebas dari penyakit dan identik dengan induknya atau *true-to-type* (Balitjestro 2014).

Upaya memproduksi benih jeruk bebas penyakit dapat pula menggunakan teknologi embriogenesis somatik (ES) *in vitro*. ES merupakan suatu proses di mana

sel somatik (haploid maupun diploid) membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet. Keuntungan teknologi ini ialah hasil perbanyakannya secara genetik seragam, bebas virus, merupakan bahan untuk transformasi genetik, meregenerasi suatu tanaman dari sel tunggal (protoplas), serta merupakan bahan pada teknologi benih sintetik.

Maheshwari dan Rangaswamy (1958) pertama kali mempublikasi regenerasi embrio *in vitro* dari jaringan nuselus. Selanjutnya, Starantino dan Russo (1980) melaporkan untuk pertama kalinya penerapan metode tersebut dengan menggunakan eksplan ovul yang belum berkembang dan menghasilkan produk tanaman mini (planlet) yang secara genetik identik dengan induknya. Teknologi ES kemudian dikembangkan dan disempurnakan oleh peneliti lain dengan menggunakan berbagai jenis eksplan seperti daun, akar, dan bunga dari tanaman induknya. Secara umum, kalus akan tumbuh dari eksplan yang dikulturkan secara *in vitro* pada media yang sesuai, kemudian berkembang menjadi kalus embriogenik, embrio, dan tumbuh menjadi planlet (Gavish *et al.* 1992; Mendesda-Gloria *et al.* 1999; Tomaz *et al.* 2001; Han *et al.* 2002; Singh *et al.* 2006).

Menurut D'Onghia *et al.* (2001; 2002), teknologi ES pada tanaman jeruk dapat mengeliminasi penyakit *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus tristeza virus* (CTV), dan *Citrus variegation virus* (CVV) yang terbawa induk pada proses perbanyakan. Selain bebas dari penyakit virus, tanaman hasil perbanyakan dengan teknologi ini juga secara genetik sama dengan induknya (*true-to-type*), baik pada tanaman tebu (Devarumath *et al.* 2007), peach (Hashmi *et al.* 1997) maupun tanaman lainnya, misalnya *Populus deltoides* (Rani *et al.* 1995).

Berdasarkan hasil tersebut, teknologi perbanyakan jeruk dengan teknologi ES *in vitro* perlu dikembangkan dalam upaya memenuhi kebutuhan benih jeruk bebas penyakit serta identik dengan induknya. Walaupun ES secara umum mudah diterapkan pada varietas-varietas jeruk yang bersifat poliembrioni, banyak faktor yang memengaruhi keberhasilan pertumbuhan dan perkembangannya. Faktor-faktor tersebut meliputi genotipe, jenis dan fase perkembangan eksplan, serta komposisi media kultur (Carimi 2005).

Tujuan dan arah *review* ini ialah untuk memberikan informasi mengenai keberhasilan teknologi ES dalam perbanyakan massal benih jeruk *in vitro* skala laboratorium serta prospek dan kendalanya dalam menunjang program penyediaan tanaman jeruk bebas penyakit di Indonesia.

BAHAN TANAM *IN VITRO*

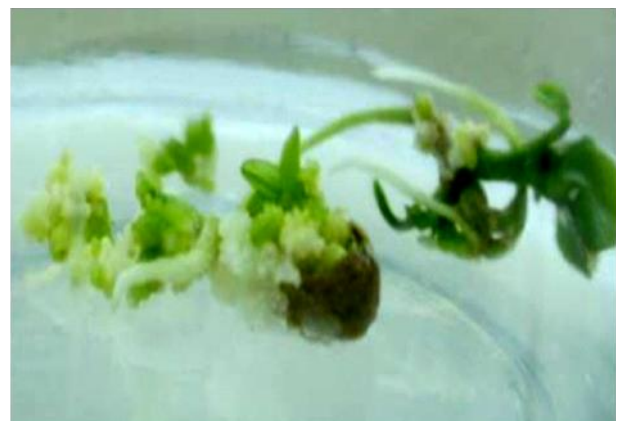
Pada perbanyakan secara *in vitro*, pembentukan kalus bergantung pada kondisi bahan jaringan yang dikulturkan. Inisiasi kalus relatif lebih cepat pada jaringan

muda dan mengandung sel hidup dibandingkan pada jaringan tua. Bahan tanam yang umum digunakan pada perbanyakan tanaman jeruk melalui ES adalah nuselus yang berasal dari biji buah muda umur 12–14 minggu setelah bunga mekar (Devy *et al.* 1997; Agisimanto *et al.* 2011; Wulansari *et al.* 2015), ovul yang belum berkembang (El-Sawy *et al.* 2006), jaringan endosperm (Kosmiatin *et al.* 2014), tangkai + putik, benang sari dan jaringan vegetatif semai biji, serta embrio yang ada dalam biji seperti pada tanaman buah lainnya (Sutanto dan Aziz 2006).

Eksplan nuselus merupakan suatu jaringan yang terbentuk bersamaan dengan perkembangan biji tanaman, sel-selnya mempunyai sifat somatik embriogenesis, yaitu akan berkembang menjadi kalus, dapat berdiferensiasi dan berkembang menjadi tanaman melalui fase embrio, sehingga pada tanaman jeruk proses somatik embriogenesis terjadi secara tidak langsung (Chapman *et al.* 2000). Jaringan nuselus yang ideal dapat diperoleh dari biji buah muda (umur 12–14 minggu setelah antesis). Makin tua umur buah, makin tidak efisien dalam pembentukan embrio (Park *et al.* 2004). Secara umum, kalus dan embrio akan tumbuh secara bersamaan dalam 15–60 hari setelah kultur (Devy 2004; Gholami *et al.* 2013) (Gambar 1). Selain nuselus, endosperma yang strukturnya berupa jeli juga dapat diisolasi dari biji buah jeruk umur 11–13 minggu setelah antesis (Kosmiatin *et al.* 2014).

Dengan menggunakan eksplan ini, induksi kalus embriogenik terbaik diperoleh pada media MS modifikasi + 3 mg/l BA + 500 mg/l CH (kasein hidrolisat) atau ME (malt ekstrak) berturut-turut 84% dan 80%. Persentase pendewasaan embrio somatik (ES) dengan morfologi embrio normal terbanyak (54,8%) diperoleh dari media MS modifikasi + 3 g/l phytigel. Pada media yang sama, ES dapat berkecambah secara langsung.

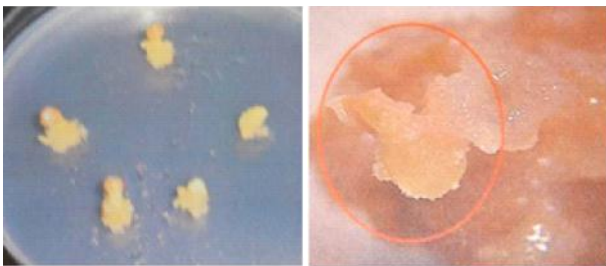
Bahan eksplan lain yang bersumber dari buah muda ialah jaringan ovul yang belum berkembang. El-Sawy *et al.* (2006) menggunakan buah muda umur 8 minggu setelah antesis sebagai sumber eksplan. Persentase eksplan tumbuh dan berkembang sangat dipengaruhi oleh



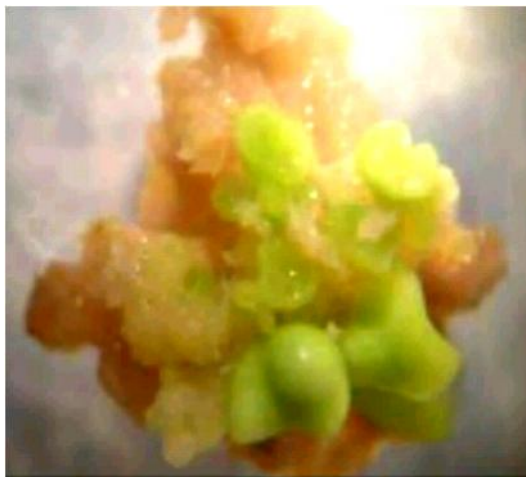
Gambar 1. Kalus dan embrio yang tumbuh dari jaringan nuselus jeruk (Devy *et al.* 2007).

genotipe dan media kultur, dengan nilai terendah (3%) dan tertinggi (50%) masing-masing terdapat pada jenis Grapefruit dan Sour Orange. Dari tiga macam komposisi media yang digunakan, media MS + ME 500 mg/l + BA 3 mg/l paling optimal untuk pertumbuhan eksplan.

Tangkai putik beserta kepala putik juga dapat digunakan sebagai bahan eksplan (Carimi *et al.* 1995; Meziane *et al.* 2012; El-Sawy *et al.* 2013; Meziane *et al.* 2015). Bahan tersebut berasal dari bunga yang belum membuka, setelah disterilkan dan dikulturkan pada media MS padat + ME 500 mg/l + sukrosa 146 mM + 6-bensilaminopurin (BAP) 3 mg/l. Secara umum, pada 7–10 hari setelah kultur sekumpulan kalus berwarna keputihan dengan struktur remah tumbuh pada irisan pangkal tangkai putik (Meziane *et al.* 2015; Gambar 2). Embrio somatik dari 34 kultivar jeruk yang dikulturkan dapat berkembang pada 38–150 hari setelah inisiasi kultur, bergantung pada jenisnya, dengan warna kehijauan dan mudah dipisahkan. Persentase tangkai putik yang respons bervariasi antara 2,35–80%. Selain embrio yang berkembang sempurna, embrio-embrio dengan fase yang berbeda juga berkembang pada saat yang bersamaan (Meziane *et al.* 2012; Gambar 3). Planlet tumbuh pada embrio yang dikulturkan pada MS standar + ME 500 mg/l + NAA 0,27 ppm (Meziane *et al.* 2015).



Gambar 2. Kalus yang tumbuh dari pangkal pada irisan pangkal tangkai putik dan embrio somatik yang berkembang dari kalus (Meziane *et al.* 2015).



Gambar 3. Embrio yang berkembang dari eksplan tangkai putik (60 hari setelah kultur) (Meziane *et al.* 2012).

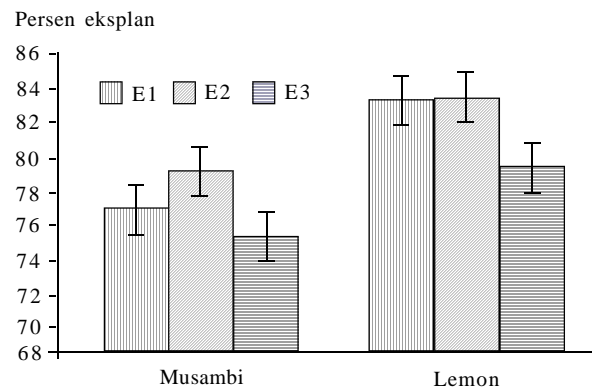
Selain putik, kultur kepala sari merupakan metode yang berkembang saat ini untuk embriogenesis mikrospora untuk mendapatkan tanaman homozigot yang lengkap dari induknya. Menurut Ramirez *et al.* (2003), fase yang paling responsif untuk embriogenesis adalah mikrospora yang mempunyai vakuola. Dengan menggunakan medium 'P', setelah 5 bulan kultur, secara mikroskopis kalus dengan warna cokelat muda mulai tumbuh. Pada umur 11 bulan setelah kultur, media PmT/BA menghasilkan jumlah kalus per cawan petri yang lebih baik dibandingkan media PmT/BA10 (Chiancone *et al.* 2015). Selain kalus, secara bersamaan embrio globuler juga mulai terbentuk.

Kultur eksplan jaringan yang berasal dari semaian biji *in vitro* juga dapat menghasilkan embrio somatik yang memuaskan. Dhillon *et al.* (1989) melaporkan, proembrio adventif tumbuh pada irisan batang semaian yang dikulturkan pada media $\frac{1}{2}$ MS + BA 5 mg/l. Selain ruas batang, kotiledon serta potongan daun semaian tersebut dapat digunakan sebagai sumber eksplan (Mukhtar *et al.* 2005). Dengan menggunakan media MS + 2,4-D 2 mg/l + 20% air kelapa (diinkubasi dalam keadaan gelap), eksplan yang menghasilkan kalus terendah adalah potongan daun (Gambar 4).

Kesehatan bahan eksplan sangat memengaruhi pertumbuhan dan perkembangan kalus serta embrio yang dihasilkan. Persentase kalus yang terbentuk, embrio somatik yang tumbuh, dan daya berkecambah embrio akan menurun bila eksplan yang dikultur berasal dari induk yang terinfeksi penyakit (El-Sawy *et al.* 2013).

KOMPOSISI MEDIA

Selain bahan eksplan, faktor penentu keberhasilan teknologi ES adalah jenis media dan komposisinya untuk regenerasi embrio somatik *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan menggunakan media dasar yang sama pada ES, respons pertumbuhan dan



Gambar 4. Pengaruh jenis eksplan pada persen eksplan yang mampu menginduksi kalus dua jenis jeruk; E1 = eksplan potongan batang semai (1–1,5 cm), E2 = kotiledon, E3 = potongan daun (1 cm²) (Mukhtar *et al.* 2005).

perkembangan kalus maupun embrio yang dihasilkan dapat berbeda. Pada umumnya, MS merupakan media standar ES pada semua fase pertumbuhan. Dengan menggunakan jeruk Juno, media ini memberikan pertumbuhan eksplan paling baik dibandingkan media White, LP, B5, dan SH (Park *et al.* 2004). Dengan mengurangi kandungan garamnya sampai 50% (1/2 MS), media ini sangat efektif untuk penyemaian embrio menjadi planlet walaupun tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (Al-Taha *et al.* 2012).

Berdasarkan jumlah proembrio dan tipe kalus yang dihasilkan, media MW lebih baik dibandingkan dengan MS dan MT untuk menginduksi kalus embriogenik dari eksplan nuselus jeruk siam Simadu dan siam Pontianak (Husni *et al.* 2010; Wulansari *et al.* 2015). Penambahan bahan organik CH, ME maupun biotin tunggal dalam media MW dapat menginisiasi kalus embriogenik asal eksplan endosperm siam Simadu dengan persentase antara 76–84% (Kosmiatin *et al.* 2014).

Karbohidrat merupakan komponen utama media pada proses metabolisme karbon, baik jenis maupun konsentrasinya. Sumber karbohidrat untuk media kultur adalah sukrose atau glukose. Sukrose dalam media secara cepat diubah menjadi glukose dan fruktose. Glukose diserap lebih dulu oleh eksplan dan diikuti oleh fruktose. Menurut Cunha dan Fernandes-Ferreira (2010), monosakarida dan disakarida memengaruhi performan kalus pada embriogenesis dan multiplikasi. Pada konsentrasi rendah (1% dan 2%), disakarida lebih efektif dibandingkan monosakarida dalam induksi somatik embriogenesis. Hasil yang sama dicapai dengan menggunakan monosakarida 4%. Peningkatan konsentrasi disakarida tidak meningkatkan proses tersebut secara nyata.

Selain sukrosa dan glukosa, bahan-bahan lain dapat digunakan sebagai sumber karbohidrat pada ES jeruk. Menurut Kayim dan Kock (2006), penambahan gliserol 4% dan 5% pada media MT menghasilkan embrio somatik tertinggi pada empat varietas jeruk dibandingkan dengan laktosa, sorbitol, manitol, glukosa, dan galaktosa. Pada media cair MS + ME 500 mg/l + BA 3 mg/l, kalus siam Kintamani (*Citrus reticulata*) memberikan respons perkembangan yang berbeda bila sumber karbohidratnya berbeda. Pada penambahan sukrosa 146 mM (kontrol), kalus berproliferasi dengan baik sampai subkultur kelima. Penambahan laktosa atau campuran sorbitol dan galaktosa 65% : 35% dengan konsentrasi yang sama menyebabkan kalus berhenti berproliferasi dan berkembang menjadi embrio (Devy *et al.* 2011a).

Zat pengatur tumbuh kinetin, NAA, BAP, ABA, IBA, dan GA3 umumnya ditambahkan dalam media untuk mendorong proliferasi, pendewasaan maupun pertumbuhan kalus dan embrio (Park *et al.* 2004; Mukhtar *et al.* 2005; Husni *et al.* 2010; Al-Taha *et al.* 2012). Kinetin dan NAA berpengaruh terhadap pembentukan kalus dan embrio, serta penambahan BAP pada media MS berpengaruh terhadap induksi pertumbuhan planlet pada *C. sinensis* and *C. aurantifolia* (Mukhtar *et al.* 2005). ABA

memberikan pengaruh yang berlainan terhadap pertumbuhan kalus maupun embrio. Husni *et al.* (2010) melaporkan, penambahan ABA pada media MW dengan konsentrasi > 0,1 mg/l memengaruhi proses pendewasaan embrio somatik jeruk siam. Namun, penelitian Kosmiatin *et al.* (2014) memperoleh hasil yang berbeda, yakni penambahan ABA cenderung menghambat perkecambahan embrio yang terbentuk dari kultur endosperm.

GA3 memengaruhi kemampuan perkecambahan embrio membentuk planlet. Semakin tinggi konsentrasi GA3 yang diberikan (0,1–0,5 mg/l), semakin banyak jumlah planlet yang dihasilkan (Husni *et al.* 2010). ZPT ini juga digunakan pada perkembangan planlet selanjutnya, dengan konsentrasi 2,5 mg/l pada media MS tanpa penambahan kinetin berpengaruh nyata terhadap perpanjangan planlet (Kosmiatin *et al.* 2014). Dengan menggunakan embrio jeruk Batu 55, penambahan GA3 konsentrasi 4 ppm dapat meningkatkan berat basah embrio. Pada tahap multiplikasi, aplikasi GA3 sampai 8 ppm menghasilkan persentase embrio untuk beregenerasi tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya (Firdiana *et al.* 2015). Selain ZPT, penambahan PEG sampai 10% dan peningkatan konsentrasi agar sampai 20 g/l pada media maturasi embrio mampu menunjang perkembangan embrio fase globuler menjadi fase kotiledon (Hidayati *et al.* 2013).

POTENSI PERBANYAKAN ES JERUK PADA MEDIA CAIR

Semua tahapan perbanyakan ES umumnya menggunakan media padat dengan bahan bakto agar maupun phytagel sebagai pematat. Menurut Scholten dan Pierik (1998), penggunaan berbagai jenis agar yang ada di pasaran sebagai bahan pematat pada kultur *in vitro* memberikan pengaruh yang beragam pada perkembangan eksplan, terutama pada fase pertumbuhan pucuk dan akar. Pada embriogenesis jeruk, peningkatan konsentrasi phytagel menjadi 3 g/l pada media MS mampu mendukung pembentukan dan pendewasaan ES yang cukup jumlahnya dengan pertumbuhan dan perkembangan embrio yang normal, bahkan 14,1% di antaranya dapat berkecambah pada media yang sama (Kosmiatin *et al.* 2014).

Selain media padat, media cair juga mulai digunakan pada perbanyakan kalus maupun embrio (Nhut *et al.* 2006). Pada volume yang rendah (100–500 mg kalus), perbanyakan eksplan dapat menggunakan erlemeyer 100–250 cc yang dikocok pada kecepatan 75–100 rpm. Bila volume eksplan lebih dari 500 mg, dapat digunakan alat bioreaktor sebagai wadah untuk perbanyakan massal tanaman hortikultura dan biofarmaka (Paek *et al.* 2005) serta produksi metabolit sekunder dari embrio somatik tanaman (Shohael dan Paek 2013). Hasil penelitian Agisimanto *et al.* (2011) dan Devy *et al.* (2012b) pada tanaman jeruk, masing-masing menggunakan kultur suspensi sel kalus asal biji muda limau madu (*Citrus suhuiensis* Hort. ex Tanaka) dan siam Kintamani (*Citrus*

suhuiensis cv Siam Kintamani) sebagai eksplan, menunjukkan bahwa pertumbuhan eksplan dalam media cair yang digoyang sangat dipengaruhi oleh konsentrasi BAP, kepadatan awal eksplan, dan sumber karbohidrat yang digunakan dalam media.

Pada perbanyakan massal dengan menggunakan bioreaktor, pertumbuhan dan perkembangan embrio jeruk juga sangat memuaskan (Devy *et al.* 2012a). Dengan menggunakan eksplan jeruk kalamondin, volume embrio yang dikultur meningkat 2 dan 3 kali lipat masing-masing dalam waktu 6 dan 10 minggu, dengan warna eksplan berubah dari putih kecokelatan menjadi putih kehijauan. Embrio yang dihasilkan dari bioreaktor dapat tumbuh dengan baik saat dikulturkan pada media padat MS + vit MS 2x + FeEDTA 2x, dengan persen embrio yang tumbuh menjadi planlet mencapai rata-rata 100% pada minggu keempat.

VARIASI SOMAKLONAL

Variasi somaklonal merupakan fenomena yang umum terjadi pada kultur sel tanaman, termasuk segala bentuk variasi pada tanaman atau sel yang dihasilkan dari kultur jaringan (Skirvin *et al.* 1994). Menurut Bairu *et al.* (2011), variasi tersebut dapat dipengaruhi oleh metode perbanyakan yang diaplikasikan, genotipe, jenis eksplan yang digunakan, jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh, serta jumlah dan lama subkultur. Pada metode perbanyakan dengan tahapan antaranya fase kalus, penggunaan eksplan yang tidak memiliki meristem (seperti akar, daun, dan batang), serta tingginya aplikasi zat pengatur tumbuh seperti BA, 2,4-D, dan tidak seimbang konsentrasi auksin dengan sitokinin akan menginduksi semakin tingginya variasi pada tanaman yang dihasilkan. Untuk menguranginya, dianjurkan untuk meminimalkan perlakuan subkultur, inisiasi eksplan baru secara teratur, serta penambahan zat pengatur tumbuh yang rasional. Namun demikian, dari berbagai penelitian, tanaman jeruk hasil perbanyakan dengan metode ES umumnya identik dengan induknya (Leroy *et al.* 2000; El-Sawy *et al.* 2013; Meziane *et al.* 2015).

Hasil pengujian kestabilan genetik jeruk siam Kintamani hasil ES pada berbagai fase pertumbuhan dengan menggunakan teknik PCR dan penanda *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR) menunjukkan bahwa planlet yang telah disubkultur lima kali tidak mengalami penyimpangan secara genetik, demikian pula pada jenis jeruk lainnya seperti JC dan Volkameriana (Yuliati *et al.* 2012).

Pada kalus yang disubkulturkan ≥ 10 kali, keseragaman tanaman yang dihasilkan mulai berubah. Penyimpangan yang terjadi pada fase kalus, embrio, planlet, dan semaian masing-masing adalah 17%, 4%, 10%, dan 0%, sementara pada jenis JC penyimpangannya masing-masing sebesar 2%, 12%, 12%, dan 6%; sedangkan pada Volkameriana, penyimpangan pada fase

planlet dan embrio serta pada semaian dan kalus masing-masing sebesar 15% dan 17%. Dengan menggunakan kalus jeruk siam umur 4 tahun sebagai bahan tanam, secara morfologi dan fenotipe, planlet yang dihasilkan menunjukkan keragaman 43% pada bentuk daun, warna daun, tinggi tunas, jumlah cabang, dan jumlah daun (Wulansari *et al.* 2015)

EFEKTIVITAS ES DALAM ELIMINASI PATOGEN

Menurut D'Onghia *et al.* (2001; 2002), teknologi ES dapat mengeliminasi penyakit virus, yakni *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus tristeza virus* (CTV), dan *Citrus variegation virus* (CVV) yang terbawa induknya pada tanaman hasil perbanyakan dari eksplan nuselus, putik maupun ovule (El-Sawy *et al.* 2006; Meziane *et al.* 2012). Sementara itu, Widyaningsih *et al.* (2013) melaporkan bahwa status penyakit Huanglongbing (CVPD) pada benih jeruk varietas JC Tulungagung, keprok Batu 55, dan siam Purworejo adalah negatif pada semua fase pertumbuhan (kalus, embrio dan plantlet), meskipun bahan eksplan berasal dari nuselus tanaman induk yang terinfeksi. Status penyakit CTV pada varietas lainnya (keprok Kinnow, siam Kintamani, nipis Tulungagung, dan JC Tlekung) sangat bervariasi. Semua materi yang dihasilkan pada fase kalus, embrio, dan plantlet adalah negatif, kecuali pada fase embrio jeruk JC menunjukkan tingkat infeksi CTV 40% dari contoh yang diuji.

PROSPEK PERBENIHAN JERUK BEBAS PENYAKIT HASIL ES

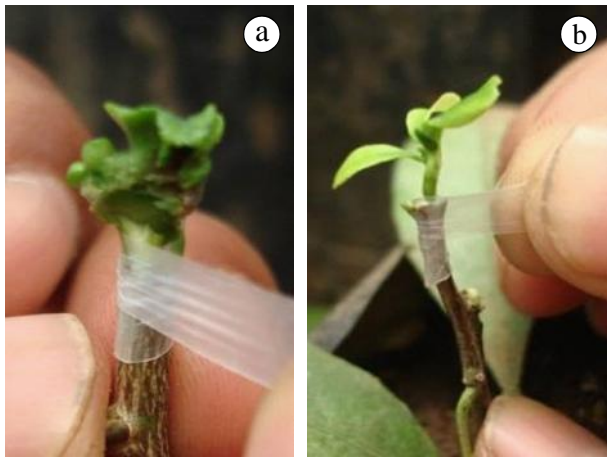
Embrio yang berasal dari perkawinan maupun dari jaringan somatik mempunyai sifat yang sama, yaitu menghasilkan tanaman yang memiliki fase vegetatif (juvenil) panjang, antara 12–15 tahun (Ligeng *et al.* 1995). Karakter ini merupakan hambatan besar dalam perbanyakan jeruk melalui teknologi ES (Ollitrault 1990). Panjangnya fase tersebut merupakan karakter kuantitatif dan dikontrol oleh multigen (Pillitteri *et al.* 2004).

Untuk mengatasi hambatan tersebut, dikembangkan teknik penyambungan embrio atau planlet pada batang bawah secara *ex vitro* untuk memotong fase juvenile tanaman. Karena ES efektif untuk mengeliminasi penyakit yang terbawa induk, materi tanaman yang didapat dari perbanyakannya dapat dipakai sebagai bahan batang atas jeruk yang sehat. Hasil penelitian penyambungan hasil ES menunjukkan bahwa dengan menggunakan embrio kotiledon dan planlet sebagai materi batang atas jeruk Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco), rata-rata persentase sambungan yang hidup tidak berbeda nyata (Tabel 1; Gambar 5) (Devy *et al.* 2011b).

Tabel 1. Rata-rata persen sambungan jadi pada tanaman umur 1, 4, 7, dan 10 bulan setelah penyambungan.

Batang atas	Rata-rata persentase sambungan jadi (bulan)			
	1	4	7	10
Embrio kotiledon	97,2	77,8	72,2	69,4
Planlet	100,0	86,1	86,1	83,3
BNT 5%*	tn	tn	tn	tn

Sumber: Devy *et al.* (2011b).



Gambar 5. Penyambungan planlet (a) dan embrio (b) Kalamondin pada batang bawah JC *ex vitro* (Devy *et al.* 2011b).

Pada fase pembenihan di dalam rumah kaca (sampai umur 10 bulan setelah sambung), pertumbuhan benih hasil sambung batang atas asal embrio maupun planlet dengan batang bawah JC (Japanese Citroen), berkembang secara normal. Pertumbuhan vegetatif tanaman jeruk Kalamondin asal embrio maupun planlet tidak berbeda nyata (Gambar 6a), sedangkan pada jeruk siam

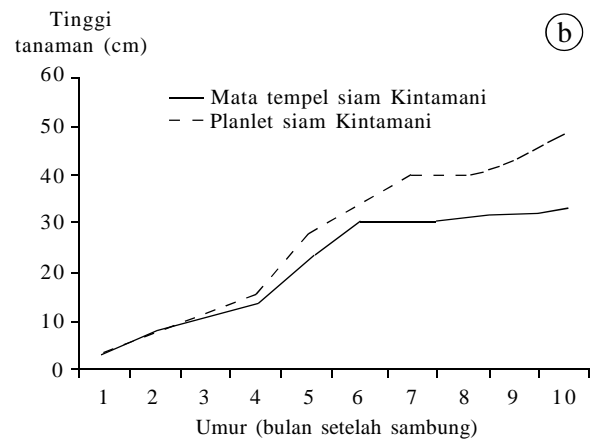
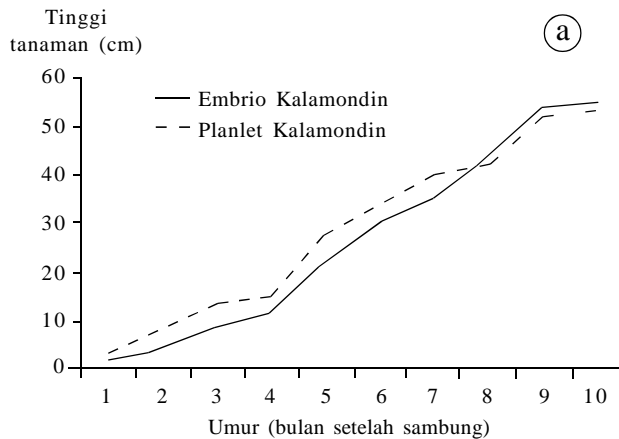
Kintamani pertumbuhan benih asal planlet secara nyata lebih baik dibandingkan kontrol (asal mata tunas) (Gambar 6b).

Hasil evaluasi keragaan morfologi tanaman tersebut di lapangan menunjukkan bahwa tanaman yang berasal dari embrio dan planlet memiliki pertumbuhan vegetatif maupun generatif yang baik. Pada tanaman jeruk Kalamondin dan siam Kintamani asal planlet, fase generatif masing-masing dimulai pada umur 8 dan 28 bulan setelah ditanam di lapangan, ditandai tumbuhnya bunga dan buah secara normal.

KENDALA APLIKASI METODE ES PADA PERBENIHAN JERUK BEBAS PENYAKIT

Perbanyak jeruk *in vitro* melalui teknologi ES di Indonesia relatif baru diteliti dan menunjukkan prospek yang positif untuk penyediaan jeruk bebas penyakit. Namun, beberapa kendala perlu dikaji lebih mendalam sebelum teknologi ini dikembangkan secara luas. Kendala tersebut adalah sebagai berikut:

- 1) Hasil penelitian teknologi ES pada jeruk di Indonesia masih relatif sedikit dan belum disosialisasikan secara luas pada semua *stakeholders* yang ada.
- 2) Belum adanya dukungan dari pemerintah penggunaan teknologi ES dalam menghasilkan benih jeruk bebas penyakit secara massal.
- 3) Belum dilakukannya pengkajian penggunaan teknologi ES pada setiap kultivar jeruk unggulan daerah karena setiap kultivar memberikan respons yang spesifik terhadap media dan perlakuan lainnya.
- 4) Belum adanya pengujian skala luas terhadap benih jeruk hasil ES di lapangan sehingga kestabilan keragaan morfologi, produktivitas, dan kualitasnya belum dapat dievaluasi.



Gambar 6. Tinggi tanaman hasil sambung embrio dan planlet pada jeruk Kalamondin (a) dan sambung planlet dan mata tempel pada siam Kintamani (Devy *et al.* 2011b; 2014).

KESIMPULAN

Perkembangan protokol teknologi ES *in vitro* dalam perbanyakan tanaman jeruk telah sampai kepada level yang memungkinkan untuk industrialisasi perbenihan. Dengan berkembangnya ES, diharapkan teknologi ini dapat mendukung program penyediaan benih jeruk bebas penyakit di Indonesia, dengan cara menyediakan materi planlet maupun embrio kotiledon sebagai materi batang atas yang bebas penyakit dan identik dengan induknya. Bila disambungkan dengan batang bawah secara *ex vitro*, tanaman yang dihasilkan akan tumbuh dan berkembang dalam rentang waktu yang normal di lapangan. Belum digunakannya teknologi ES dalam produksi benih jeruk secara nasional disebabkan belum terujinya produk ES secara luas di sentra produksi jeruk di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Agisimanto, D., N.M. Noor, R. Ibrahim, and A. Mohamad. 2011. Efficient somatic embryo production of Limau madu (*Citrus suhuiensis* Hort. ex Tanaka) in liquid culture. *Afr. J. Biotechnol.* 11(12): 2879–2888.
- Al-Taha, H.A., A.M. Jasim, and M.F. Abbas. 2012. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from nucleus tissues of local orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Acta Agriculturae Slovenica* 99(2): 185–189.
- Bairu, M.W., O. Adeyemi, Aremu, and V.S. Johannes. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 63: 147–173.
- Balitjestro. 2014. Inovasi teknologi terkini siap kawal jeruk nasional: Proses produksi pohon induk dan benih jeruk bebas penyakit. *Tabloid Sinar Tani Edisi 21 Desember 2014*. <http://tabloidsinartani.com/content/read/inovasi-teknologi-terkini-siap-kawal-jeruk-nasional/>.
- Carimi, F., F. de Pasquale, and F.G. Crescimanno. 1995. Somatic embryogenesis in *Citrus* from styles culture. *Plant Sci.* 105: 81–86.
- Carimi, F. 2005. Somatic embryogenesis protocol: *Citrus*. In S.M. Jain and P.K. Gupta (Eds.). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer, the Netherlands. pp. 321–343.
- Chapman, A., A.S. Blervacq, J.P. Tissier, B. Delbreil, J. Vasseur, and J.L. Hilbert. 2000. Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plants. I. Scanning and transmission electron microscopy study on embryos originating from direct, indirect, and adventitious pathways. *Can. J. Bot.* 78: 816–823.
- Chiancone, B., M. Mannes, G. Karasawa, V. Gianguzzi, A.M. Abdelgalel, I. Barany, P.S. Testillano, D.T. Marinoni, R. Botta, and M.A. Germana. 2015. Early embryo achievement through isolated microspore culture in citrus *Clementine* Hort. Ex Tan., cvs. ‘Monreal Rosso’ and ‘Nules’. *Frontiers on Plant Science* 6: 1–10.
- Cunha, A. and M. Fernandes-Ferreira. 2010. Influence of medium parameter on somatic embryogenesis from hypocotyls explants of Flax (*Linum usitatissimum* L.). *E papper*. 18 pp.
- D’Onghia, A.M., F. Carimi, F. de Pasquale, K. Djelouah, and G.P. Martelli. 2001. Elimination of Citrus psorosis virus by somatic embryogenesis from stigma and style cultures. *Plant Pathol.* 50: 266–269.
- D’Onghia, A.M., F. Carimi, F. de Pasquale, S. Fiore, K. Djelouah, and G.P. Martelli. 2002. Somatic embryogenesis from style and stigma cultures eliminates Citrus tristeza virus (CTV) and Citrus variegation virus (CVV). *Proc. Fifteenth IOCV Conference 2002*: 413–416.
- Devarumath, R.M., R.B. Doule, P.G. Kavar, S.B. Naikabawane, and Y.S. Nerkar. 2007. Field performance and RAPD analysis to evaluate genetic fidelity of tissue culture raised plants vis-a-vis conventional setts derived plants of sugarcane. *Sugar Technol.* 9(1): 17–22.
- Devy, N.F. A. Sutanto, dan Jati. 1997. Pengaruh umur buah terhadap pertumbuhan kultur nuselus *in vitro* beberapa varietas batang bawah jeruk. *J. Bioteknologi Pertanian* 2(2): 49–55.
- Devy, N.F. 2004. The propagation of free-virus citrus rootstock var. JC via nucellus culture *in vitro*. Paper presented in the 3rd Indonesian Biotechnology Conference 2004. An International Conference and Exhibition, Bali, 1–3 December 2004. 8 pp.
- Devy, N.F., Hardiyanto, dan Jati. 2007. Pengaruh macam media terhadap pertumbuhan kultur embrio nuselar JC *in vitro* dan metode perbanyakan planletnya. *Jurnal Hortikultura Edisi Khusus, Volume 3*: 215–224.
- Devy, N.F., F. Yulianti, dan Hardiyanto. 2011a. Pengaruh sumber karbohidrat terhadap induksi embrio dan daya multiplikasi kalus pada somatik embriogenesis siam Kintamani (*Citrus reticulata*). *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Hortikultura Indonesia 2011*. hlm. 647–656.
- Devy, N.F., A. Sugiyatno, dan F. Yulianti. 2011b. Daya tumbuh tanaman jeruk kalamondin hasil perbanyakan via somatik embriogenesis *in vitro* pada batang bawah JC. *Jurnal Hortikultura* 21(3): 214–224.
- Devy, N.F., F. Yulianti, dan Hardiyanto. 2012a. Perbanyakan massal embrio kalamondin (*Citrus mitis* Blanco) melalui teknologi somatik embriogenesis dengan menggunakan bioreaktor. *Jurnal Hortikultura* 22(1): 1–7.
- Devy, N.F., F. Yulianti, dan Hardiyanto. 2012b. Pengaruh densitas awal terhadap daya multiplikasi dan stabilitas genetik planlet siam Kintamani (*Citrus suhuiensis* cv siam Kintamani) hasil perbanyakan via somatik embriogenesis. *Jurnal Hortikultura* 22(4): 309–315.
- Devy, N.F., Yenni, and Hardiyanto. 2014. The growth performance of citrus derived from somatic embryogenesis planlet and scion stock. *Indones. J. Agric. Sci.* 15(2): 71–78.
- Dhilon, B.S., H. Raman, and D.S. Brar. 1989. Somatic embryogenesis in *Citrus paradisi* and characterization of regenerated plants. *Acta Horticulturae* 239: 113–116.
- El-Sawy, A., A. Gomaa, A. Reda, and N. Danial. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules of citrus. *Arab J. Biotechnol.* 9(1): 189–202.
- El-Sawy, A., A. Gomaa, M.H. Abd-El-Zaher, A. Reda, and N. Danial. 2013. Production of somatic embryogenesis via *in vitro* culture of stigma and style for elimination of Citrus psorosis virus (CPsV) from some citrus genotypes. *J. Hort. Sci. Ornamental Plants* 5(2): 110–117.
- Firdiana, E.F., S. Indriyani, and W. Widoretno. 2015. The effect of gibberellin on somatic embryo growth and maturation and plantlet regeneration of tangerine (*Citrus reticulata* Blanco.) var. Batu 55. *J. Exp. Life Sci.* 5(1): 19–23.
- Gavish, H., A. Vardi, and R. Fluhr. 1992. Suppression of somatic embryogenesis in citrus cell cultures by extracellular protein. *Planta* 186: 511–517.
- Gholami, A.A., S.V. Alavi, A. Majd, and F. Fallahian. 2013. Plant regeneration through direct and indirect somatic embryogenesis from immature seeds of citrus. *Eur. J. Exp. Biol.* 3(3): 307–310.
- Han, S.H., S.K. Kang, H.J. An, and H.Y. Kim. 2002. Effect of embryonic callus conditions on plant regeneration in Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *J. Plant Biotechnol.* 4(1): 29–32.

- Hashmi, G., R. Huettel, R. Meyor, L. Krusberg, and F. Hammerschlag. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Rep.* 16: 624–627.
- Hidayati, N., W. Widoretno, dan R. Mastuti. 2013. Pengaruh osmolit terhadap maturasi embrio somatik jeruk (*C. reticulata* Blanco.). *El-Hayah* 3(2): 83–87.
- Husni, A., A. Purwito, I. Mariska, dan Sudarsono. 2010. Regenerasi tanaman jeruk siam melalui embriogenesis somatik. *J. Agrobiogen* 6: 79–83.
- Kayim, M. and N.K. Kock. 2006. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. *Scientia Horticulturae* 109(1): 29–34.
- Kosmiatin, M., A. Purwito, G.A. Wattimena, dan I. Mariska. 2014. Induksi embriogenesis somatik dari jaringan endosperma jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.) cv Simadu. *J. Agron. Indones.* 42(1): 44–51.
- Leroy, X.J., K. Leon, G. Charles, and M. Branchard. 2000. Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. *Plant Cell Rep.* 19: 1102–1107.
- Ligeng, C., C. Keling, and Z. Guangyan. 1995. Genetic study and artificial regulation of juvenile period of citrus seedling. *Acta Horticulturae* 403: 205–210.
- Maheshwari, P. and N.S. Rangaswamy. 1958. Polyembryony and *in vitro* culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. *Ind. J. Hort.* 15: 275–282.
- Mendes-da-Gloria, F.J., F.A.A.M. Filho, C.G.B. Demetrio, and B.M.J. Mendes. 1999. Embryogenic calli induction from nucellar tissue of citrus cultivars. *Scientia Agricola* 56(4): 1111–1115.
- Meziane, M., M. Boudjeniba, A.M. D'Oghia, D. Frasher, A. Carra, and F. Carimi. 2015. Determination of genetic fidelity of Algerian citrus genotypes regenerated by somatic embryogenesis. *Akademik Plantform*, pp. 809–819.
- Meziane, M., M. Boudjeniba, D. Frasher, A.M. D'Oghia, A. Carra, F. Carimi, N. Haddad, S. Boukhalfa, and S. Braneci. 2012. Regeneration of Algerian citrus germplasm by stigma/style somatic embryogenesis. *Afr. J. Biotechnol.* 11(25): 6666–6672.
- Mukhtar, R., M.M. Khan, R. Rafiq, A. Shahid, and F.A. Khan. 2005. *In vitro* regeneration and somatic embryogenesis in *Citrus aurantifolia* and *Citrus sinensis*. *Intl. J. Agric. Biol.* 7(3): 518–520.
- Nhut, D.T., N.H. Nguyen, and D.T.T. Thuy. 2006. A novel *in vitro* hydroponic culture system for potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuber production. *Scientia Horticulturae* 110: 230–234.
- Ollitrault, P. 1990. Somatic embryo grafting, A promising technique for citrus breeding and propagation. ICSN 3rd Congress, Australia, July 1990. 10 pp.
- Paek, K.Y., D. Chakrabarty, and E.J. Hahn. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81: 287–300.
- Park, W.J., Y.M. Kang, J.Y. Min, D.J. Park, Y.D. Kim, C.S. Karigar, and M.S. Choi. 2004. *In vitro* propagation of Junos orange (*Citrus junos* Sieb.) through nucellar polyembrioid culture. *Korean J. Medical Crop Sci.* 12(5): 384–390.
- Pillitteri, L.J., C.J. Lovatt, and L.L. Willing. 2004. Isolation and characterization of terminal flower. Homolog and its correlation with juvenility in citrus. *Plant Physiol.* 135(3): 1540–1551.
- Ramirez, C., B. Chiancone, P.S. Testillano, B. Garcia-Fojeda, M.A. Germana, and M.C. Risueno. 2003. First embryonic stages of citrus microspore-derived embryos. *Acta Biologica Cracoviensia* 45(1): 53–58.
- Rani, V., A. Parida, and S.N. Raina. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Rep.* 14: 459–462.
- Scholten, H.J. and R.L.M. Pierik 1998. Agar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. *Sciencia Horticulturae* 77: 109–116.
- Shohael, A.M. and K.Y. Paek. 2013. Production of eleutherosides, total phenolics and total flavonoids from somatic embryos of Siberian ginseng affected by different aeration volumes in bioreactor. *Int'l J. Biosci. (IJB)* 3(4): 213–221.
- Singh, B., S. Sharma, G. Rani, G.S. Virk, A.A. Zaidi, and A. Nagpal. 2006. *In vitro* flowering in embryogenic cultures of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour x *C. deliciosa* Tenora). *Afr. J. Biotechnol.* 5(16): 1470–1474.
- Skirvin, R.M., D. Kenneth, McPheeters, and M. Norrton. 1994. Source and frequency of somaclonal variation. *Hort. Science* 29(11): 1232–1237.
- Starantino, A. and F. Russo. 1980. Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits polyembryonic citrus cultivars. *Hort. Science* 15: 296–297.
- Sutanto, A. dan M.A. Aziz. 2006. Induksi dan regenerasi embriogenesis somatik pepaya. *J. Hort.* 16(2): 89–95.
- Tomaz, M.L., B.M.J. Mendez, F. de Assis, A.M. Filho, C.G.B. Demetrio, N. Jansakul, and A.P.M. Rodriguez. 2001. Somatic embryogenesis in *Citrus* spp.: Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 37: 446–452.
- Widyaningsih, S., F. Yulianti, dan N.F. Devy. 2013. Keefektifan eliminasi penyakit sistemik (Huanglongbing dan Citrus Tristeza Virus) pada jeruk dengan embriogenesis somatik. *Jurnal Hortikultura* 23(2): 107–113.
- Wulansari, A., A. Purwito, A. Husni, dan E. Sudarmonowati. 2015. Kemampuan regenerasi kalus embriogenik asal nuselus jeruk siam serta variasi fenotipe tunas regeneran. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversity Indonesia* 1(1): 97–104.
- Yulianti, F., N.F. Devy, dan S. Widyaningsih. 2012. Evaluasi stabilitas genetik benih jeruk hasil perbanyakan melalui embriogenesis somatik. *Jurnal Hortikultura* 22(3): 210–216.