

Formula Media Kultur Endosperm Jeruk Hasil Persilangan Antarklon Siem dengan Keprok dan Jeruk Besar

Sunyoto ¹⁾, S. Purnomo ²⁾, dan Makful ¹⁾

¹⁾ Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika, Jl. Raya Solok-Arian km 8, Solok 27301

²⁾ Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Timur, Jl. Raya Karangploso km 4, Malang 65101
Naskah diterima tanggal 26 Januari 2010 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 9 November 2010

ABSTRAK. Pembentukan hibrida triploid renyah tanpa biji pada tanaman jeruk tipe keprok dapat dilakukan melalui kultur endosperm. Komposisi media yang tepat pada setiap tahapan kultur endosperm sangat menentukan keberhasilan pembentukan hibrida tersebut. Komposisi media induksi kalus sampai regenerasi jaringan endosperm jeruk belum banyak diketahui. Penelitian bertujuan memperoleh formula media *in vitro* terbaik untuk pertumbuhan dan regenerasi kalus endosperm jeruk hasil persilangan antarklon siem dengan keprok dan jeruk besar. Tanaman yang dihasilkan dari kultur tersebut diharapkan menjadi kandidat varietas jeruk unggul baru yang mempunyai sifat buah tanpa biji dan berdaging buah renyah. Percobaan dilakukan di Laboratorium Kultur Biak Pemuliaan dan Plasma Nutfah Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika Solok. Penelitian menggunakan analisis diskriptif yang terdiri atas dua tahap kegiatan yang dilakukan mulai bulan Januari 2005 sampai dengan Januari 2006. Kegiatan pertama ialah produksi kalus menggunakan media dasar MurashigeTungker (MT) dengan tiga formula. Kegiatan kedua yaitu regenerasi kalus menggunakan media dasar MT dan Murashige Skoog (MS) dengan enam formula media. Hasil percobaan menunjukkan bahwa media $M_3 = MT + 5 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm 2,4-D} + 500 \text{ ppm CH} + 0,5 \text{ ppm KT} + 500 \text{ ppm ME}$, merupakan formula media inisiasi kalus yang terbaik. Formula media tersebut mampu menginisiasi terbentuknya kalus lebih cepat, menginduksi kalus yang lebih banyak, kekompakan struktur kalus baik, dan berwarna hijau. Formula media regenerasi yang terbaik ialah $R_3 = MT + 0,25 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm GA}_3 + 500 \text{ ppm CH} + 40 \text{ ppm Ads}$. Media tersebut mampu mendukung terbentuknya tunas lebih panjang, jumlah daun, jumlah tunas, dan peningkatan jumlah akar dibandingkan persilangan lainnya. Kalus endosperm hasil persilangan intervarietas siem x keprok Dancy, dan siem x keprok Cina Konde merupakan kalus terbaik untuk diregenerasikan.

Katakunci: Jeruk; Persilangan; Kalus endosperm; Kultur *in vitro*; Regenerasi kalus.

ABSTRACT. Sunyoto, S. Purnomo, and Makful. 2010. Media Formula for Citrus Endosperm Culture of Hybridization between Clones of Tangerine and Clones of Mandarin and Pummelo. Formation of triploid hybrids of crunchy seedless mandarin types of citrus can be established through the induction of endosperm culture. The composition of appropriate media at each stage of endosperm culture determines the success of the hybrid production. The media compositions of callus of endosperm induction and its regeneration have not been known yet so far. The aim of this research was to determine the best formula of *in vitro* medium to induce and regenerate endosperm callus of citrus hybrids. Plantlets produced from the culture were expected to be new superior varieties bearing seedless and crispy fruits. Research was carried out in the Tissue Culture Breeding and Germplasm Laboratory, Indonesian Tropical Fruits Research Institute from January 2005 to January 2006. Descriptive analysis was used in this research. The research composed of consecutive activities. The first activity was to produce callus using basic medium MT (MurashigeTungker) with three medium composition treatments, and the second one, was to regenerate embryoid callus using MT and MS medium with six medium compositions. The results showed that medium of $M_3 = MT + 5 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm 2,4-D} + 500 \text{ ppm CH} + 0.5 \text{ ppm KT} + 500 \text{ ppm ME}$ was the best formula for callus initiation. This medium initiated faster growth of callus and gave higher percentage of callus formation that was more compact in structure, and green in color, than other tested media. The best medium for regeneration of embryoid callus was $R_3 = MT + 0.25 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm GA}_3 + 500 \text{ ppm CH} + 40 \text{ ppm Ads}$. This medium increased the length of shoots, the number of leaves, shoots, and roots more than the other media. Endosperm calli produced from hybridization intervarieties of tangerine x mandarin Dancy and tangerine x mandarin Cina Konde were the best calli for regeneration.

Keywords: Citrus; Hybridization; Endosperm callus; *In vitro* culture; Callus regeneration.

Pembentukan hibrida triploid renyah tanpa biji (steril) pada tanaman jeruk tipe keprok dapat diperoleh melalui persilangan antara tanaman tetraploid dan tanaman diploid dengan lebih dahulu menggandakan jumlah kromosom diploid menjadi tetraploid, kemudian disilangkan dengan diploid renyah yang menghasilkan keturunan triploid. Cara lain untuk mendapatkan tanaman

triploid ialah dengan menginduksi jaringan endosperm, karena berdasarkan teori pewarisan sifat bahwa jaringan endosperm bersifat triploid yang merupakan gabungan antara satu sperma dan dua inti polar. Chaturvedi *et al.* (2003) berhasil merakit tanaman triploid *Azadirachta indica* A. Juss. dari kultur endosperm buah muda diploid. Yang *et al.* (2000) berhasil merakit tanaman

triploid pamelos Tossa Buntan melalui kultur endosperm. Tanaman triploid bersifat steril atau *seedless* yang umumnya disukai konsumen.

Seperti terjadi pada persilangan antarindividu dengan ploida $4X \times 2X$ yang menghasilkan tanaman $3X$, persilangan antara tanaman diploid juga menghasilkan jaringan endosperm triploid dan bersifat steril. Sterilitas disebabkan adanya kelebihan satu set kromosom ($2n = 3X$) dalam genom tanaman. Pada pembelahan meiosis, konfigurasi kromosom pada umumnya berbentuk trivalen dan bivalen, sedangkan univalen jarang terjadi.

Kelemahan dari persilangan antara tetraploid dengan diploid sebagian besar adalah menghasilkan tanaman triploid, tetapi kadangkala diploid atau tetraploid. Hal tersebut disebabkan adanya pembentukan megaspora dan mikrospora yang tidak teratur selama pembelahan meiosis tetra tetraploid (Groose *et al.* 1988). Oleh karena penggandaan kromosom melalui induksi kolkisin dan persilangan tetraploid dengan diploid dipengaruhi oleh kestabilan genetik sel tanaman saat meiosis, maka perlu dilakukan metode penelitian lain untuk mendapatkan tanaman jeruk triploid yang secara genetik menghasilkan tanaman triploid (*seedless*).

Teknologi isolasi jaringan dengan memanfaatkan endosperm jeruk hasil silangan dengan teknik kultur *in vitro* merupakan salah satu cara untuk mendapatkan tanaman yang benar-benar secara genetik triploid, karena endosperm merupakan jaringan tempat menyimpan cadangan makanan bagi embrio yang memiliki sifat genetik (triploid) berbeda dengan jaringan lainnya. Jaringan endosperm merupakan gabungan dari tiga inti haploid, yaitu satu gametofit berasal dari induk jantan (sperma) dan dua gametofit berasal dari induk betina (inti polar). Jaringan ini dapat diregenerasikan membentuk tanaman baru yang bersifat triploid. Menurut Graitter *et al.* (1990) endosperm dari buah jeruk umur 12-14 minggu setelah polinasi (MSP) merupakan umur buah yang baik untuk dikulturkan karena endosperm pada umur tersebut bersifat seluler dengan struktur yang elastis dan paling responsif. Lebih jauh Graitter *et al.* (1990), menyatakan bahwa media dasar terbaik untuk mengkulturkan buah umur 14 MSP adalah MT+5 ppm BAP+2 ppm 2,4-D+500 ppm CH+0,5 ppm KT. Kalus endosperm pada

umur tersebut mampu membentuk embrio lebih baik dan lebih banyak, sedangkan media dasar terbaik untuk induksi embriogenesis adalah MT + 0,25 ppm BAP + 2 ppm GA₃ + 500 ppm CH + 40 ppm Ads.

Penampilan karakter organ tanaman poliploid seperti daun, batang, bunga, buah, dan karakter lainnya, seperti kandungan vitamin lebih tinggi, tekanan osmotik berkurang, dan masa vegetatif lebih panjang (Hagberg dan Akerberg 1961, Sanford 1983). Perbedaan tersebut terjadi karena penambahan jumlah kromosom dalam sel-sel tanaman yang memberikan pengaruh pada penampilan fenotipik. Sebagai contoh pada semangka triploid mempunyai hasil lebih tinggi dibanding diploidnya (Hagberg dan Akerberg 1961). Hibrida triploid tomat berkadar sari buah lebih banyak, tidak berbiji, rasa lebih enak, dan buahnya lebih besar daripada buah tanaman diploid (Kagan-Zur *et al.* 1991). Pada semangka dengan tingkat ploidi lebih tinggi terdapat perubahan bentuk buah lebih bulat, kulit buah semakin tebal, dan daging buah menjadi lebih padat (Henderson 1977). Apel triploid menghasilkan buah lebih besar, lebih vigor, dan berproduksi tinggi, sedang pada jeruk triploid selain buah lebih besar dan lebih vigor juga tidak berbiji (Sanford 1983, Soost dan Cameron 1980).

Induksi endosperm (triploid) hibrid dari planlet sampai tanaman siap menjadi pohon induk sebagai sumber mata tempel (sambung dini) diperlukan empat tahap kegiatan, yaitu (1) induksi pembentukan kalus, (2) induksi embriogenesis (embrio somatik), (3) aklimatisasi, dan (4) penyediaan bibit triploid sebagai sumber mata tempel (sambung dini). Setiap tahap kegiatan *in vitro* tersebut diperlukan komposisi media, zat pengatur tumbuh (ZPT), dan vitamin yang berbeda-beda. Tujuan penelitian ialah memperoleh formula media kalus dan formula media regenerasi endosperm jeruk hasil persilangan antara klon siem dengan jeruk besar untuk mendapatkan jeruk tanpa biji dan berdaging buah renyah.

BAHAN DAN METODE

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Kultur Biak Pemuliaan dan Plasma Nutfah

Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika Solok mulai Januari 2005-Januari 2006. Bahan eksplan yang digunakan dalam penelitian ini ialah endosperm jeruk hasil persilangan antara klon siem dengan beberapa tetua jantan jeruk besar yang mempunyai sifat renyah yaitu, besar Nambangan, pamelor Ratu, pamelor Raja, keprok Dancy, dan keprok Cina Konde berumur 12 MSP. Penelitian menggunakan analisis deskriptif komparatif, data hasil pengamatan dalam bentuk rerata diperbandingkan antarperlakuan untuk mendapatkan gambaran perlakuan komposisi media terbaik.

Endosperm ditumbuhkan pada media dasar MT (Murashige-Tungker) (Murashige dan Tungker 1969) dengan tiga formula media yang terdiri atas:

$M_1 = 5 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm 2,4-D} + 500 \text{ ppm CH,}$

$M_2 = 5 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm 2,4-D} + 500 \text{ ppm CH} + 0,5 \text{ ppm KT,}$

$M_3 = 5 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm 2,4-D} + 500 \text{ ppm CH} + 0,5 \text{ ppm KT} + 500 \text{ ppm ME.}$

Perlakuan tersebut terdiri atas tiga ulangan dengan masing-masing ulangan terdiri atas 10 botol kultur, setiap botol berisi tiga eksplan endosperm. Kalus-kalus embrionik yang tumbuh dari percobaan tahap inisiasi dikulturkan pada media regenerasi.

Kalus yang embrioid kemudian diregenerasikan menggunakan media :

$R_1 = \text{MT} + 0,25 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm GA}_3 + 500 \text{ ppm CH,}$

$R_2 = \text{MT} + 0,25 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm GA}_3 + 500 \text{ ppm CH} + 25 \text{ ppm Ads,}$

$R_3 = \text{MT} + 0,25 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm GA}_3 + 500 \text{ ppm CH} + 40 \text{ ppm Ads,}$

$R_4 = \text{MS} + 0,25 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm GA}_3 + 500 \text{ ppm CH,}$

$R_5 = \text{MS} + 0,25 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm GA}_3 + 500 \text{ ppm CH} + 25 \text{ ppm Ads,}$

$R_6 = \text{MS} + 0,25 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm GA}_3 + 500 \text{ ppm CH} + 40 \text{ ppm Ads.}$

Keterangan : BAP (*benzyl amino purin*), CH (*casein hydrolisate*), KT (*kinetin*), ME (*malt extract*), Ads (*adenosin*), sedangkan media

regenerasi menggunakan media dasar MT dan MS dengan penambahan ZPT yang berbeda-beda. Perlakuan media regenerasi terdiri atas tiga ulangan dengan masing-masing ulangan terdiri atas 10 botol kultur, setiap botol berisi tiga eksplan endosperm.

Media disiapkan dengan mencampurkan unsur makro, mikro, ZPT, dan vitamin yang diberikan sesuai dengan perlakuan yang ditentukan. Sukrose sebagai sumber energi diberikan ke dalam larutan media MT.

Pelaksanaan Kegiatan In Vitro

Buah jeruk dikelompokkan sesuai dengan perlakuan, kemudian dicuci dengan air mengalir. Buah yang sudah dicuci dimasukkan ke dalam gelas besar steril, selanjutnya dimasukkan ke dalam *laminar air flow cabinet* steril. Sterilisasi dilakukan dengan merendam buah dalam larutan alkohol 70% selama 10 menit, klorok 10% selama 10 menit, klorok 5% selama 5 menit, dan dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Buah yang telah steril dikupas dan daging buahnya diambil menggunakan pisau scalpel. Biji yang telah diambil dari daging buah dikupas kulit arinya hingga tinggal endosperm dan embrionya. Embrio zigotik yang berada di pangkal endosperm diambil dan dikulturkan pada media lain bukan sebagai perlakuan, selanjutnya endosperm dikulturkan pada media induksi kalus. Setelah tumbuh, kalus kemudian dipindahkan ke media regenerasi sesuai dengan perlakuan.

Pemeliharaan

Botol kultur yang berisi endosperm dipelihara di atas rak kultur. Selama 1 minggu kultur ditempatkan dalam ruang gelap, kemudian dipindahkan ke ruang terang dengan penyinaran lampu 1.000 lux. Ruang kultur dipertahankan pada kisaran suhu 24-25°C dengan periodisitas cahaya 16 jam terang dan 8 jam gelap. Subkultur pada media yang sama dilakukan setiap 2 minggu sekali.

Pengamatan

Pengamatan perlakuan dilakukan setiap minggu (dimulai minggu ke-1 sampai ke-14). Pengamatan kalus dilakukan terhadap waktu terbentuknya kalus (massa sel terlihat kompak), persentase pembentukan kalus, warna kalus,

kekompakan kalus, dan bobot kalus. Pengamatan regenerasi dilakukan terhadap jumlah embrio yang beregenerasi, jumlah regeneran, dan jumlah planlet.

Analisis data kuantitatif dilakukan dengan menghitung nilai rerata dari setiap perlakuan. Data kualitatif merupakan data kondisi rerata sampel yang diamati dari masing-masing perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

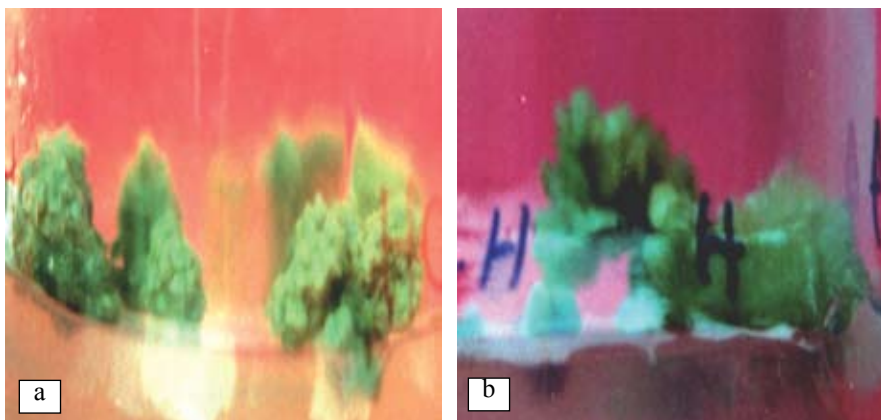
Inisiasi Eksplan

Komposisi media tumbuh terbaik untuk merangsang terjadinya pembentukan kalus ialah $M_3 = MT + 5 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm 2,4-D} + 500 \text{ ppm CH} + 0,5 \text{ ppm KT} + 500 \text{ ppm ME}$, kemudian diikuti oleh $M_2 = MT + 5 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm 2,4-D} + 500 \text{ ppm CH} + 0,5 \text{ ppm KT}$. Kalus yang terbentuk

Tabel 1. Pengaruh media dan sumber eksplan terhadap saat terbentuknya kalus, persentase terbentuknya kalus, struktur kalus, dan warna kalus endosperm jeruk hasil persilangan 6 dan 8 MSK (*The influence of medium and explant on the date of callus formation, callus structure, color of callus endosperm percentage of callus formation of citrus hybrids 6 and 8 WAC*)

Media (<i>Medium</i>)	Persilangan (<i>Hybridization</i>)	Waktu terbentuknya kalus (<i>Time of callus formation</i>)	Struktur kalus minggu ke... (<i>Callus structure on week...</i>)		Warna kalus minggu ke... (<i>Callus color on week...</i>)		Kalus terbentuk minggu ke- (<i>Callus formed on week</i>), %	
			6	8	6	8	6	8
M_1	SPK x Dancy	3	Remah (<i>Friable</i>)	Remah (<i>Friable</i>)	Putih (<i>White</i>)	Putih (<i>White</i>)	23	47
	SPK x KCK	3	Remah (<i>Friable</i>)	Remah (<i>Friable</i>)	Putih (<i>White</i>)	Putih (<i>White</i>)	24	43
	SPK x Ratu	5	Remah (<i>Friable</i>)	Remah (<i>Friable</i>)	Putih (<i>White</i>)	Putih (<i>White</i>)	5	33
	SPK x BN	5	Remah (<i>Friable</i>)	Remah (<i>Friable</i>)	Putih (<i>White</i>)	Putih (<i>White</i>)	8	36
	SPK x Raja	5	Remah (<i>Friable</i>)	Remah (<i>Friable</i>)	Putih (<i>White</i>)	Putih (<i>White</i>)	6	33
M_2	SPK x Dancy	3	Agak kompak (<i>Mild compact</i>)	Agak kompak (<i>Mild compact</i>)	Kuning hijau (<i>Yellow green</i>)	Kuning hijau (<i>Yellow green</i>)	20	52
	SPK x KCK	3	Agak kompak (<i>Mild compact</i>)	Agak kompak (<i>Mild compact</i>)	Kuning hijau (<i>Yellow green</i>)	Kuning hijau (<i>Yellow green</i>)	15	56
	SPK x Ratu	5	Remah (<i>Friable</i>)	Remah (<i>Friable</i>)	Putih (<i>White</i>)	Putih (<i>White</i>)	10	36
	SPK x BN	5	Remah (<i>Friable</i>)	Remah (<i>Friable</i>)	Putih (<i>White</i>)	Putih (<i>White</i>)	5	37
	SPK x Raja	5	Remah (<i>Friable</i>)	Remah (<i>Friable</i>)	Putih (<i>White</i>)	Putih (<i>White</i>)	5	35
M_3	SPK x Dancy	3	Kompak (<i>Compact</i>)	Kompak (<i>Compact</i>)	Kuning hijau (<i>Yellow green</i>)	Hijau kuning (<i>Green yellow</i>)	25	74
	SPK x KCK	3	Kompak (<i>Compact</i>)	Kompak (<i>Compact</i>)	Hijau kuning (<i>Green yellow</i>)	Hijau kuning (<i>Green yellow</i>)	26	75
	SPK x Ratu	5	Agak kompak (<i>Mild compact</i>)	Agak kompak (<i>Mild compact</i>)	Kuning hijau (<i>Yellow green</i>)	Putih kuning (<i>White yellow</i>)	10	36
	SPK x BN	5	Agak kompak (<i>Mild compact</i>)	Agak kompak (<i>Mild compact</i>)	Kuning hijau (<i>Yellow green</i>)	Kuning hijau (<i>Yellow green</i>)	10	31
	SPK x Raja	5	Agak kompak (<i>Mild compact</i>)	Agak kompak (<i>Mild compact</i>)	Kuning hijau (<i>Yellow green</i>)	Kuning hijau (<i>Yellow green</i>)	5	41

Keterangan : SPK (Siem Pekanbaru); KCK (Keprok Cina Konde); BN (Besar Nambangan)

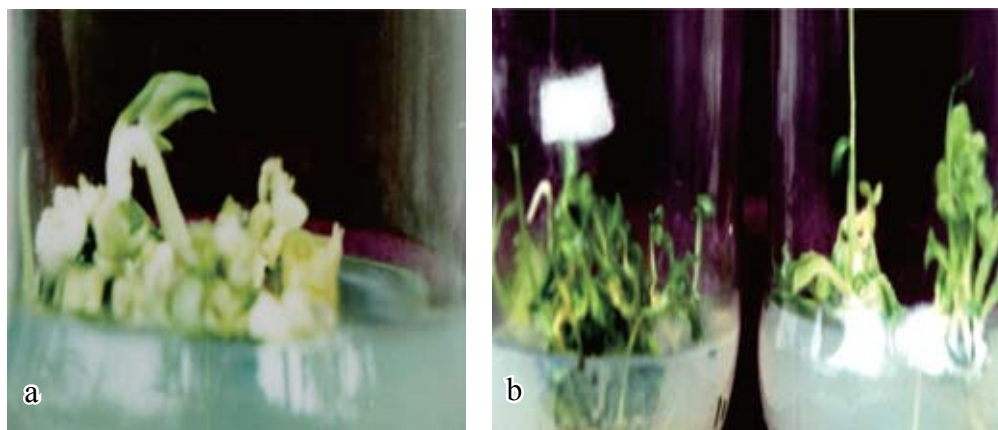


Gambar 1. (a) Kalus yang terbentuk pada media M_3 berwarna hijau muda pengamatan minggu ke-10 (*Callus formed on M_3 medium light green by 10 weeks of observation*), (b) kalus yang terbentuk pada media M_2 berwarna hijau pengamatan minggu ke-10 (*Callus formed on M_2 medium green by 10 weeks of observation*)

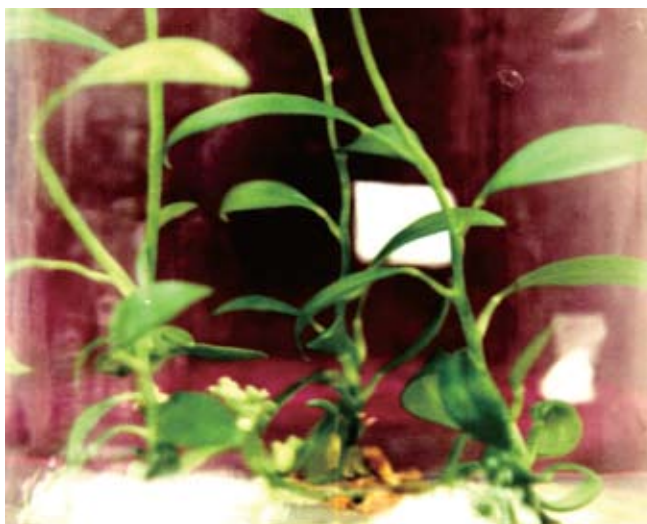
pada M_3 dan M_2 bersifat kompak dan berwarna hijau muda (Gambar 1). Komposisi media M_1 = (MT + 5 ppm BAP + 2 ppm 2,4-D + 500 ppm CH memberikan respons terendah (Tabel 1).

Eksplan yang dikulturkan pada media MT yang hanya diperkaya BAP membentuk kalus yang secara morfologi kelihatan kurang kompak, tidak berwarna hijau, jumlahnya sedikit, dan hanya tumbuh dari jaringan di tepi eksplan. Pada media yang diperkaya dengan BAP dan kinetin menunjukkan pertumbuhan kalus lebih kompak dan berwarna hijau. George dan Sherrington

(1984), Wang dan Chang (1987), Sunyoto *et al.* (1997), dan Sunyoto *et al.* (2002) menyatakan bahwa penggunaan ZPT dari golongan dan media yang sama berdampak lebih baik jika dibandingkan dengan pemakaian ZPT secara tunggal. Bila konsentrasi antara auksin dan sitokinin di dalam jaringan eksplan yang dikulturkan berada dalam keadaan seimbang, maka kalus terbentuk lebih cepat. Hal ini terbukti pada perlakuan yang diberi kinetin dan BAP, yang secara seimbang dapat menginduksi kalus lebih cepat. Selama pembentukan kalus, sel-sel yang



Gambar 2. (a) Kalus yang membentuk embrio (*Callus that formed embryo*), (b) kalus yang membentuk tunas pada minggu ke-12 (*Callus that formed shoots by 12 weeks of observation*)



Gambar 3. Embrio yang membentuk tunas dan akar pengamatan minggu ke-14 (*Embryos that formed shoots and roots by 14 weeks of observation*)

belum terdiferensiasi mengalami pembelahan secara cepat hingga terbentuk kalus yang kompak dan berwarna kuning kehijauan.

Pembentukan kalus pada persilangan antara tetua betina siem x keprok Dancy dan siem x keprok Cina Konde sekitar 2 minggu lebih cepat dibandingkan persilangan antara siem x besar Nambangan, siem x pamelo Raja, dan siem x pamelo Ratu. Lamanya pembentukan kalus dan jumlah kalus yang terbentuk pada persilangan jeruk siem dan jeruk besar diduga karena pembentukan endosperm tidak sempurna. Persilangan tersebut merupakan persilangan interspesies. Menurut Mu dan Liu (1979), endosperm tidak terbentuk secara utuh pada persilangan interspesies, karena kuantitas dan atau kualitas DNA penyusun genotip kedua spesies yang disilangkan pun berbeda.

Pertumbuhan dan perkembangan kalus endosperm diawali dengan pemanjangan atau elongasi sel-sel endosperm yang secara berangsur-angsur membentuk klorofil pada umur 3 minggu setelah kultur (MSK), terutama pada persilangan antara jeruk siem dengan jeruk keprok Dancy dan keprok Cina Konde (intervarietas). Kemudian disusul oleh persilangan interspesies antara jeruk siem dengan jeruk besar Nambangan, pamelo Ratu, dan pamelo Raja. Proses tersebut diduga disebabkan karena pengaruh laju serapan ZPT oleh kalus embrioid yang bersentuhan dengan

media. Zat pengatur tumbuh tersebut selanjutnya ditranslokasikan ke seluruh jaringan eksplan untuk merangsang pertumbuhan kalus embrioid. Memasuki minggu ke-4, sel-sel endosperm mulai berproliferasi di bagian pinggir eksplan membentuk kalus dengan cepat. Semua sel-sel endosperm berubah menjadi sel-sel kalus setelah umur 6 minggu. Perkembangan kalus ke arah pembentukan embrio terjadi pada umur kultur 10 minggu. Sel-sel kalus yang kompak berubah menjadi bulatan-bulatan yang bergerombol menyerupai telur ikan. Bhojwana dan Razdana (1983) menyebutnya sebagai fase pembentukan embrio globular yang selanjutnya berubah menjadi tonjolan-tonjolan yang menjulur ke berbagai arah, tetapi dari tonjolan-tonjolan itu belum jelas apakah akan terbentuk tunas atau akar. Pada endosperm yang berasal dari kalus spesies yang berbeda mulai terbentuk pada 5 MSK, tetapi tidak semua endosperm yang dikulturkan membentuk kalus dan membentuk globular dan embrio.

Menurut Graitter *et al.* 1990, endosperm jeruk manis kurang respons terhadap media dasar MT atau MS yang hanya ditambah BAP, tetapi sangat respons terhadap kedua media dasar tersebut apabila ditambah dengan kinetin atau GA_3 dan ME. Kenyataan ini membuktikan bahwa ME merupakan zat yang secara umum mampu memacu terbentuknya kalus dan memproduksi kalus yang

berstruktur kompak dan berwarna hijau yaitu media $M_3 = MT + 5 \text{ ppm BAP} + 2 \text{ ppm } 2,4\text{-D} + 500 \text{ ppm CH} + 0,5 \text{ ppm KT} + 500 \text{ ppm ME}$ (Gambar 2). Kinetin berperan mendorong morfogenesis sel. Adanya kinetin yang ditambahkan ke media tumbuh mengakibatkan fase transkripsi dan translasi RNA berlangsung lebih cepat (Duncan dan Widhom 1990 dalam Wijayani 2002).

Sepuluh MSK, kalus yang terbentuk semakin banyak terutama pada endosperm persilangan antarvarietas kalus yang terbentuk berwarna lebih hijau dan mampu memproduksi embrio. Dengan

berjalannya waktu, embrio yang terbentuk membesar yang diikuti dengan tumbuhnya tunas dan akar (Gambar 2).

Regenerasi Kalus

Pada minggu ke-12 setelah kultur, embrio dan calon tunas yang terbentuk tumbuh menjadi tanaman yang lengkap (planlet) (Gambar 3). Menurut Wang dan Chang (1987), bahwa kalus-kalus embrioid kompak dan berwarna hijau tersebut mampu membentuk tunas dan akar apabila ditumbuhkan pada media yang sesuai.

Tabel 2. Pengaruh media dan sumber eksplan terhadap saat pembentukan embrio dan persentase embrio yang diregenerasi, pada kultur endosperm jeruk hasil silangan 10 MSK (*The influence of medium and explant on the date of embryo formation and percentage of regenerated embryo on citrus hybrids endosperm culture of 10 WAC*)

Media (Medium)	Persilangan (Hybridization)	Waktu terbentuk embrio (Time of embryo formation) Minggu (Weeks)	Persentase embrio (Percentage of embryo) %
R ₁	SPK x Dancy	7	35
	SPK x KCK	7	34
	SPK x Ratu	9	16
	SPK x BN	8	15
	SPK x Raja	9	15
R ₂	SPK x Dancy	6	36
	SPK x KCK	6	34
	SPK x Ratu	9	19
	SPK x BN	8	10
	SPK x Raja	8	17
R ₃	SPK x Dancy	6	75
	SPK x KCK	6	69
	SPK x Ratu	8	20
	SPK x BN	8	25
	SPK x Raja	8	26
R ₄	SPK x Dancy	7	35
	SPK x KCK	7	35
	SPK x Ratu	8	20
	SPK x BN	8	5
	SPK x Raja	8	10
R ₅	SPK x Dancy	7	35
	SPK x KCK	7	39
	SPK x Ratu	8	15
	SPK x BN	8	10
	SPK x Raja	8	10
R ₆	SPK x Dancy	6	45
	SPK x KCK	6	55
	SPK x Ratu	8	20
	SPK x BN	9	16
	SPK x Raja	8	23

Tabel 3. Pengaruh media dan sumber eksplan terhadap panjang tunas, jumlah daun, jumlah tunas, jumlah akar pada kultur endosperm jeruk hasil silangan 14 MSK (*The influence of medium and explant on the shoot length, number of leaves, number of shoots, number of roots on endosperm culture of citrus hybrids 14 WAC*)

Media (Medium)	Persilangan (Hybridization)	Panjang tunas (Length of shoot) cm	Rerata jumlah daun (Mean number of leaves)	Rerata jumlah tunas (Mean number of shoots)	Jumlah akar (Number of roots)
R ₁	SPK x Dancy	2,61	2,75	2,82	1,15
	SPK x KCK	2,37	2,85	2,70	1,55
	SPK x Ratu	2,20	2,21	1,13	1,15
	SPK x BN	2,22	2,40	1,62	1,55
	SPK x Raja	2,28	2,14	1,62	1,42
R ₂	SPK x Dancy	2,80	2,84	3,23	1,95
	SPK x KCK	2,70	2,65	3,24	1,98
	SPK x Ratu	3,15	2,10	1,30	1,80
	SPK x BN	2,20	2,30	1,16	1,66
	SPK x Raja	3,22	2,25	1,80	1,65
R ₃	SPK x Dancy	3,56	2,84	4,74	2,38
	SPK x KCK	3,68	2,65	4,94	2,15
	SPK x Ratu	3,22	2,34	2,30	1,95
	SPK x BN	3,00	2,30	1,60	1,66
	SPK x Raja	3,22	2,45	2,34	1,35
R ₄	SPK x Dancy	2,45	2,76	2,10	1,95
	SPK x KCK	2,65	2,65	2,20	1,15
	SPK x Ratu	2,10	2,24	1,30	1,50
	SPK x BN	2,10	2,35	0,95	1,10
	SPK x Raja	2,15	2,20	1,34	1,82
R ₅	SPK x Dancy	2,45	2,35	3,74	1,95
	SPK x KCK	2,95	2,36	2,94	1,78
	SPK x Ratu	2,20	2,22	1,20	1,50
	SPK x BN	2,20	2,15	1,20	1,66
	SPK x Raja	2,10	2,25	1,25	1,50
R ₆	SPK x Dancy	2,61	2,45	2,82	2,15
	SPK x KCK	2,37	2,55	2,50	1,95
	SPK x Ratu	2,20	2,21	1,45	1,80
	SPK x BN	2,15	2,22	1,62	1,55
	SPK x Raja	2,46	2,14	1,62	1,60

Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan kalus embrionik pada perlakuan media regenerasi R₃ = MT + 0,25 ppm BAP + 2 ppm GA₃ + 500 ppm CH + 40 ppm Ads. mampu meregenerasi kalus embrionik lebih baik daripada media lain dengan jumlah tunas rerata sebanyak 4,74 pada keprok Dancy dan 4,94 pada keprok Cina Konde (Tabel 3). Tunas-tunas yang terbentuk tersebut berwarna hijau dengan pertumbuhan sempurna (Gambar 3), sedangkan pada eksplan kalus embrionik hasil persilangan antara jeruk siem x jeruk besar (Nambangan, Ratu, Raja) menghasilkan regenerasi dengan jumlah lebih rendah serta kualitas tunas dan daun yang

terbentuk kurang sempurna. Dari hasil penelitian diperoleh informasi bahwa komposisi genom pada embrio yang *abortif* dan yang *viable* sama, tetapi komposisi endospermnya berbeda. Kegagalan pembentukan biji ini sering disebabkan oleh ketidakcocokan antara endosperm dengan tetua betina yang memengaruhi pertumbuhan selanjutnya. Kesulitan penggabungan inti juga dialami oleh Grosser dan Candler (1987) saat melakukan fusi protoplas pada jeruk Ponicros dan Servinia Lor.

Penambahan BAP pada semua media perlakuan mampu menginduksi kalus embrionik menjadi tunas kecil-kecil pada umur 12 MSK,

terbentuk akar, dan daun pada umur 14 MSK. Tunas kalus endosperm jeruk hasil silangan antara jeruk siem dan silangan antarvarietas terbentuk banyak dan lebih cepat dibandingkan tunas yang berasal dari persilangan antarspesies. Hal ini diduga karena BAP mulai diserap melalui bagian kalus embrionik yang bersentuhan dengan media dan selanjutnya ZPT tersebut ditranslokasikan ke seluruh jaringan kalus embrionik untuk merangsang pertumbuhan tunas. Pembentukan tunas pada semua media tersebut diduga karena pengaruh penambahan sitokinin (BAP) dan GA_3 . Embriogenesis dan pengakaran diinduksi dari kalus dengan menambahkan 30.MU.M GA_3 pada media dasar MS (Yang *et al.* 2000). Penggabungan dua jenis ZPT merangsang pemanjangan sel ke arah tunas yang lebih baik, karena pengaruh sinergi di antara dua ZPT. Menurut Gei *et al.* (1982) sitokinin berperan dalam merangsang sintesis DNA dan RNA serta memacu sintesis protein pada tahap mitosis dan sitokinensis, sedangkan GA_3 berperan dalam merangsang pertumbuhan dan perkembangan sel (Tanjung 2007).

Memasuki minggu ke-14 eksplan yang dikulturkan mulai menunjukkan perbedaan pertumbuhan, yaitu eksplan yang dikulturkan pada media regenerasi $R_3 = MT + 0,25$ ppm BAP + 2 ppm GA_3 + 500 ppm CH + 40 ppm Ads. dan kalus endosperm menghasilkan tunas dengan jumlah yang lebih banyak dan terlihat lebih hijau dibandingkan dengan perlakuan lain. Menurut Wong (1984), sitokinin mampu merangsang pertumbuhan tunas pada konsentrasi tertentu, tetapi dapat menghambat pertumbuhan tunas pada konsentrasi yang semakin tinggi apabila konsentrasi mencapai optimum.

KESIMPULAN

1. Persilangan klon jeruk siem x jeruk keprok Dancy dan jeruk siem x keprok Cina Konde menghasilkan kalus dan beregenerasi lebih baik dibandingkan dengan persilangan antarspesies jeruk besar, besar Nambangan, pamelo Ratu, dan pamelo Raja.
2. Media $M_3 = MT + 5$ ppm BAP + 2 ppm 2,4-D + 500 ppm CH + 0,5 ppm kinetin + 500 ppm ME merupakan formula terbaik untuk

produksi kalus. Formula media tersebut dapat menginduksi saat pembentukan kalus lebih cepat, persentase pembentukan kalus lebih banyak, struktur kalus kompak, dan kalus yang terbentuk berwarna hijau.

3. Media $R_3 = MT + 0,25$ ppm BAP + 2 ppm GA_3 + 500 ppm CH + 40 ppm Ads. merupakan formula media regenerasi yang menghasilkan tunas lebih panjang, jumlah tunas, daun, maupun akar lebih banyak dibandingkan dengan formula lain.

PUSTAKA

1. Bhojwania, S. S. and M. K. Razdana. 1983. *Plant Tissue Culture: Teory and Practice*. Elsevier. Sci. Pub. Co. Amsterdam. 171 p.
2. Chaturvedi, R., M. K. Razdana, and S. S. Bhojwania. 2003. An Efficient Protocol for the Production of Triploid Plants from Endosperm Callus of Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. *J. of Plant Physiol.* 160:557-564.
3. Gei, Y. L., S. R. Gu, and T. Y. Nu. 1982. Studies on Morfological Differentiation of Endosperm Plantlet, of Chinese Goossberry In Vitro in Chinese with English Summary. *Acta Bot Sinica.* 24:216-221.
4. George, E. F. and P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetic Ltd., England. 709 p.
5. Graitter, F. G., X. B. Jr Ling, and X. B. Deng. 1990. Induction of Triploid Citrus Plants from Endosperm Calli In Vitro. *Theor. Appl. Genes.* 8:735-740.
6. Groose, R. W., W. P. Kojis, and E.T. Bingham. 1988. Combining Ability Differences between Isogenic Diploid and Tetraploid Alfalfa. *Crop Sci.* 28:7-10.
7. Grosser, J. W. and J. L. Candler. 1987. Aseptic Isolation of Leaf Protoplasts from Citrus, x Ponicros Hybrids and SeveriniaLor Use in Somatic Hybridization Experiments. *Sci.Hortic.* 31:253-257.
8. Hagberg, A. and E. Akerberg. 1961. *Mutations and Polyploidy in Plant Breeding*. Svenska Bokforlagest, Bonniers. Stockholm. 59-60 p.
9. Hartman, H. T. and D. E. Kester. 1983. *Plant Propagation Principle and Practices* (4 th ed.) Prentice-Hall, New York. 277 pp.
10. Henderson, W. R. 1977. Effect of Cultivar, Polyploidy, and Reciprocal Hybridization on Characters Important in Breeding Triploid Seedless Watermelon Hybrids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102(3):293-277.
11. Kagan-Zur, V., Y. Mizrahi, D. Zamir, and N. Navot. 1991. A Tomato Triploid Hybrid Whose Double Genome Parent is the Male. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(2):342-345.
12. Mu, S. and S. Q. Liu. 1979. Studies on Initiation of Apple Endosperm Callus and Variation of Chromosomal Ploidy of Callus Cell of Endosperm (In Chinese with English Summary) *Acta. Hort. Sinica.* 21:309-311.

13. Murashige, T. and D. P. H. Tungker. 1969. Growth Factor Requirements of Citrus Tissue Culture. *Proceeding First Citrus Symposium*. 3:1155-1161.
14. Sanford, J. C. 1983. Ploidy Manipulations. In Morre, J.N. and J. Janick. (Eds.). *Methods in Fruit Breeding*. Purdue University Pres. West Lafayette, Indiana. 100-123 pp.
15. Sunyoto, E. Nasir, Sukmayadi. 1997. Kultur In Vitro Kotiledon Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *J. Stigma*. (2):28-32.
16. _____, S. Purnomo, R. Triatminingsih, dan D. Djatmiadi. 2002. Regenerasi Kalus Embrio Pepaya Secara In Vitro. *J. Hort*. 12(2):71-80.
17. Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1980. Oroblanco A Triploid Pummelo Graffruit Hybrid. *Hort. Sci*. 20:1134-1135.
18. Tanjung, M. 2007. The Effectiveness Of Gibberellic Acid (GA₃) Supplementation in Stimulating The Efficiency Conversion Ingested (Eci) and the Efficiency Conversion Digested (ECD) and Growth of the Silkworm (*Bombyx Mori* L.). *J. Biol. Sumatera*. 2(2)33-36.
19. Wang D. and C.J. Chang. 1987. Triploid Citrus Plantlet from Endosperm Culture (In Chinese) *Sci. Sinica*. 21: 822-827.
20. Wareing, P. F. and I. D. J. Philips. 1981. *Growth and Differentiation in Plant*. Pergamon Press. Oxford (3rd Edition). 343 pp.
21. Wijayani, A. 2002. Pertumbuhan Kentang pada Berbagai Intensitas Cahaya dan Konsentrasi Benzyl Amino Purin. *Agrivet*. 5(2):98-104.
22. Wong, W. C. 1986. In Vitro Propagation of Banana (*Musa*) Initiation Proliferation and Development of Shoot Tip Culture Defined Media. *Plant Cell Tissue and Organ Cult*. 6:159-166.
23. Yang, X., K. Akira, and H. Kojiro. 2000. Callus Induction and Embryoid Regeneration from the Endosperm Culture of Tosa-Buntan Pummelo (*Citrus grandis* L. Osb.). *Environ. Control in Biol*. 38(4):241-246.