

Peningkatan Toleransi Aluminium pada Jeruk Batang Bawah dengan Teknik Seleksi *In Vitro* Berulang

Mia Kosmiatin, Rosa Yunita, dan Ali Husni

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

ABSTRACT

Aluminum Tolerance Improvement of Rootstock Citrus through Repeated *In Vitro* Selection. *Mia Kosmiatin, Rosa Yunita, and Ali Husni.* National orange productivity was trend to decrease because of pathogen attack and reducing of planting area. One of alternative ways to preserve and increase orange productivity was using marginal soil mainly acid soil. This matter pushed the breeder to prepare tolerant rootstock and stable in the acid soil. *In vitro* culture technique was effective and efficient methods to produce tolerant and stable rootstock in acid soil through simulation of acid soil with addition of high aluminum and low pH in the medium. By the simulation the selection could be done in cell level, so cell was selected after induction of variation. A rootstock which high compatibility with scion, useful rooting, and aluminum tolerance could be increased orange productivity through acid soil development. The research was conducted in 3 phase: (1) induction of embryogenic calli, (2) improvement of genetic variation through mutation, and (3) *In vitro* selection with $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ for aluminum and low pH tolerant. Immature embryos of rootstock were use as explant. The result showed that the best embryogenic calli were induced on MS basal medium with MW vitamin + NAA 7,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l. Before selection, 1.000 rad dosage was the most tolerant dosage to growth embryogenic calli. After selection, 2.000 rad dosage was the best dosage to produce shoots which stable tolerant to aluminum. Selected 88 mutant shoots were produced after three times selection on the same medium which $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ added at low pH.

Key words: Citrus rootstock, *Japansche citroen*, aluminum tolerance, *In vitro* selection.

PENDAHULUAN

Produktivitas jeruk nasional belakangan ini cenderung mengalami penurunan. Menurunnya produktivitas jeruk tersebut antara lain disebabkan oleh serangan hama dan penyakit, terutama CPVD, dan berkurangnya areal pertanaman yang subur akibat peralihan fungsi keluar sektor pertanian (Martias 2004). Pemuliaan jeruk tidak hanya diarahkan untuk perbaikan mutu dan produktivitas buah yang menjadi tanggung jawab batang atas tanaman tetapi juga perbaikan tipe batang bawah yang dapat mendukung pertum-

buhan dan kelangsungan hidup batang atas (Anonim 2003).

Terdesaknya areal pertanian, khususnya areal tanaman jeruk, menuntut para pemulia tanaman jeruk untuk menghasilkan varietas baru jeruk sebagai sumber batang bawah (*rootstock*) yang toleran terhadap cekaman abiotik di lahan marginal. Selain itu tanaman ini juga mempunyai kompatibilitas genetik yang tinggi dengan batang atas (*scion*), tahan penyakit, dan mempunyai sistem perakaran yang bagus (Spiegel-Roy dan Goldsmith 1996). Sumber batang bawah juga harus mempunyai keunggulan lain seperti toleran terhadap lahan marginal (keracunan aluminium dan pH rendah).

Berdasarkan atlas tata ruang pertanian nasional, lahan marginal masam yang dapat digunakan untuk pengembangan tanaman tahunan termasuk tanaman jeruk tersedia 50,94 juta ha yang tersebar di Sumatera, Kalimantan, Papua, Maluku, Jawa, dan Sulawesi (Makarim 2005). Dalam sistem taksonomi tanah, tanah yang termasuk jenis Podsolik Merah Kuning dan terdapat di lahan kering adalah Ultisols, Inceptisols, dan Oxisols. Ketiga jenis tanah tersebut memiliki sebaran yang luas di Indonesia masing-masing 41,9 juta, 40,9 juta, dan 14,1 juta ha (Mulyani *et al.* 2003) yang meliputi 32% dari lahan di Indonesia (Subagyo *et al.* 2000). Penggunaan lahan marginal masam untuk pertanian memerlukan biaya yang tinggi, karena perlu pengapuran dan pemupukan yang tinggi untuk memperbaiki kualitas tanahnya.

Dengan luasnya lahan marginal kering masam dan terdesaknya areal pertanian yang subur maka penggunaan jenis atau kultivar tanaman batang bawah jeruk yang toleran terhadap tanah masam merupakan cara yang paling efektif dan efisien untuk mengatasi pengembangan pertanian jeruk di lahan masam, sehingga biaya produksi dapat ditekan seminimal mungkin.

Japansche citroen (JC) merupakan salah satu jenis jeruk yang banyak digunakan sebagai batang bawah yang disambungkan dengan jeruk siam dan keprok di Indonesia. Jenis ini paling banyak digunakan petani sebagai batang bawah, karena tingkat kompatibilitasnya dengan batang atas sangat tinggi dan sistem perakarannya juga baik, tetapi tidak tahan ter-

hadap cekaman aluminium (Al) dan pH rendah (Triatminingsih dan Karsinah 2004). Kultur *in vitro* dapat dilakukan untuk mendapatkan jenis atau kultivar tanaman jeruk batang bawah yang toleran terhadap keracunan aluminium dan pH rendah secara efisien dan efektif di lahan masam. Kombinasi perlakuan fisik (iradiasi) dengan kimia (simulasi Al dengan pH rendah) terhadap populasi sel embriogenik jeruk varietas JC dalam media *in vitro* merupakan salah satu cara yang efektif dan efisien untuk mendapatkan tanaman jeruk batang bawah unggul yang toleran terhadap keracunan Al dan pH rendah di lahan masam.

Aplikasi teknik *in vitro* untuk seleksi lebih mudah dan merata di seluruh media, sehingga terhindar dari lolos (*escape*) pada saat penyaringan. Dengan demikian, hanya sel yang benar-benar tahan terhadap derasan Al dan pH masam yang dapat tumbuh dan berkembang, membentuk tanaman utuh atau benih somatik (planlet). Seleksi *in vitro* dapat dilakukan secara bertahap di mana seleksi dilakukan beberapa kali dengan meningkatkan konsentrasi agen penseleksi. Seleksi juga dapat dilakukan beberapa kali dengan konsentrasi agen penseleksi yang sama dalam tiap tahapan seleksinya. Seleksi dilakukan beberapa kali untuk menyaring sel-sel yang tahan terhadap agen penseleksi yang tetap hidup dan diregenerasikan membentuk tanaman (Kosmiatin *et al.* 2000). Pada tanaman krisan, populasi sel toleran terhadap *Septoria obesa* diperoleh setelah dua kali seleksi pada media dengan penambahan filtrat patogen pada konsentrasi yang sama (Kumar *et al.* 2008).

Regenerasi sel-sel mutan yang toleran terhadap Al dalam media dengan pH rendah melalui jalur embriogenesis somatik memberikan peluang yang tinggi untuk mendapatkan mutan tanpa kimera, karena berasal dari sel tunggal sehingga sifat ketahanannya lebih pasti (Witjaksono dan Litz 2003). Toleransi yang diperoleh dari seleksi *in vitro* melalui embriogenesis somatik dapat dipertahankan pada tanaman regenerannya di lapang (Jayasankar *et al.* 2001). Toleransi ini berkaitan dengan kemampuan individu tersebut mengeluarkan senyawa tertentu dalam proses fisiologis.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan batang bawah tanaman jeruk JC yang toleran terhadap keracunan Al untuk mendukung pengembangan jeruk pada lahan masam di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan adalah jeruk batang bawah jenis JC yang banyak digunakan oleh petani jeruk di Indonesia. Penelitian dilakukan dalam 3 tahap, yaitu (1) induksi kalus embriogenik, (2) pening-

katan keragaman genetik dengan mutasi dan regenerasinya, dan (3) seleksi *in vitro* toleransi Al dan pH rendah pada media seleksi dengan komponen seleksi $AlCl_3 \cdot 6H_2O$.

Induksi Kalus Embriogenik

Tahap awal induksi kalus dilakukan dengan mensterilisasi buah muda dengan cara dibakar. Isolasi dilakukan dengan bantuan mikroskop. Embrio yang digunakan untuk induksi kalus berukuran 1-2 mm, sedangkan nuselus yang diisolasi adalah nuselus yang masih berbentuk cair. Eksplan dikulturkan pada media induksi seri 1, yaitu (1) MS + vitamin Morrel dan Weitmore (MW) + BA 3 mg/l + sukrosa 5%, (2) MS + vitamin (MW) + BA 3 mg/l + sukrosa 5% + ekstrak malt 500 mg/l, dan (3) MS + thidiazuron 0,3 mg/l + BA 3 mg/l + sukrosa 5%.

Eksplan yang masih hidup (berwarna hijau atau putih kekuningan/kehijauan) yang dikulturkan pada media induksi seri 1 disubkultur pada media: (1) MT (Murashige dan Tucker) + NAA 10 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 3%, (2) MS + NAA 10 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 3%, dan (3) MS + vitamin (MW) + sukrosa 3%.

Induksi kalus seri kedua dilakukan dengan mengkulturkan embrio muda pada formulasi media: (1) MT + NAA 7,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 3%, (2) MT + NAA 10 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 3%, (3) MT + NAA 12,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 3%, (4) MS + vitamin (MW) + NAA 7,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 3%, (5) MS + vitamin (MW) + NAA 10 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 3%, dan (6) MS + vitamin (MW) + NAA 12,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 3%. Kalus yang terbentuk disubkultur pada media MS + (MW) + ekstrak malt 500 mg/l + sukrosa 3%.

Peningkatan Keragaman Genetik dengan Mutasi dan Regenerasinya

Induksi Mutasi dilakukan menggunakan sinar gamma. Sebelum iradiasi, populasi massa sel embriogenik dan embrio muda disubkultur dalam media tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT). Perlakuan iradiasi dilakukan di Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi Badan Tenaga Atom Nasional (PAIR BATAN) dengan dosis 0, 1.000, 2.000, dan 3.000 rad.

Setelah iradiasi, massa sel embriogenik dipindahkan pada media pemulihan, MS + vitamin (MW) + NAA 7,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 3%, kemudian dipindahkan ke media regenerasi, MS + vitamin (MW) + ekstrak malt 500 mg/l + sukrosa 3%, sampai terbentuk struktur embrio somatik fase globular dari sel-sel mutan hasil iradiasi. Kultur diinkubasi

pada ruang kultur yang diberi cahaya fluorescen ± 800 lux, 16 jam/hari dengan suhu 21-25°C.

Seleksi *In Vitro* Toleransi Al dan pH Rendah pada Media Seleksi dengan Komponen Seleksi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Populasi embrio somatik globular mutan yang hidup dari masing-masing dosis radiasi disubkultur untuk diseleksi pada media MSKd yang mengandung $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebagai komponen seleksi (Mariska 2001) dengan konsentrasi 0, 250, 500, 750, dan 1.000 ppm. Kemasaman media dibuat rendah $\pm \text{pH}$ 4. Masing-masing perlakuan diulang 20 kali. Seleksi dilakukan selama 8 minggu.

Setelah seleksi biakan dipindahkan pada media pemulihan dengan komposisi yang sama tetapi tanpa penambahan Al dan pH media normal ($\pm 5,8$). Pemulihan dilakukan selama 4 minggu, kemudian dilakukan kembali seleksi tahap II dan III. Seleksi tahap II dan III dilakukan pada media seleksi yang sama seperti pada seleksi tahap I.

Selama seleksi, pemulihan dan regenerasi, kultur disimpan di ruang kultur yang diberi cahaya fluorescen ± 800 lux 16 jam/hari dengan temperatur ruangan 21-25°C.

Pengamatan dilakukan terhadap banyaknya struktur embrio somatik yang terbentuk dan hidup, tumbuh dan berkembang membentuk embrio somatik ke tahap yang lebih lanjut dari masing-masing perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus Embriogenik

Hasil penelitian menunjukkan bahwa media induksi I (MS + vitamin MW BA 3 mg/l + sukrosa 5%; MS + vitamin MW + BA 3 mg/l + sukrosa 5% + ekstrak malt 500 mg/l; MS + thidiazuron 0,3 mg/l + BA 3 mg/l + sukrosa 5%) hampir seluruh formulasinya tidak berhasil menginduksi pembentukan kalus baik pada eksplan embrio maupun nuselus, induksi kalus yang terbentuk membutuhkan waktu yang lama, yaitu lebih dari 12 minggu setelah tanam. Padahal penambahan BA 3 mg/l pada eksplan jeruk siam cukup efektif untuk menginduksi pembentukan kalus (Husni *et al.* 2008, Mendez-da-Gloria *et al.* 2003).

Eksplan yang gagal menginduksi pembentukan kalus tetapi tetap hidup ditunjukkan dengan warna jaringan yang masih hijau. Jaringan tersebut kemudian disubkultur pada media MT + NAA 10 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + ekstrak malt 500 mg/l + sukrosa 3%; MS + vitamin MW + NAA 10 mg/l + kinetin 0,5 mg/l +

sukrosa 3%; MS + vitamin MW + sukrosa 3%. Pada media dengan penambahan NAA kalus berhasil diinduksi sedangkan pada media tanpa penambahan NAA tidak berhasil menginduksi pembentukan kalus. Keberhasilan induksi kalus disajikan pada Tabel 1.

Hasil penelitian seri 2 menunjukkan bahwa konsentrasi penggunaan NAA 10 mg/l dan penggunaan vitamin MW berhasil menginduksi pembentukan kalus dengan hasil yang baik (Tabel 2). Penggunaan eksplan embrio memberikan persentase induksi kalus tertinggi pada media dengan penambahan NAA 12,5 mg/l pada media dasar MT tetapi kalus yang dihasilkan tipenya kompak dan berwarna kecoklatan. Untuk kalus dengan penambahan NAA dengan konsentrasi lebih rendah menghasilkan kalus dengan tipe lebih remah (*friable*) dengan warna putih kehijauan, umumnya tipe kalus seperti ini lebih mudah diregenerasikan dibandingkan tipe kompak dengan warna kecoklatan. Kalus dari eksplan nuselus menghasilkan tipe kalus yang relatif sama, yaitu putih dengan struktur remah, kecuali pada media dengan penambahan vitamin (MW) dan NAA 7,5 mg/l di mana kalusnya berwarna putih kehijauan.

Kalus yang terbentuk disubkultur pada media untuk ditingkatkan keragamannya dengan meradiasi dengan sinar gamma dan selanjutnya diseleksi pada media seleksi MSKd dengan penambahan $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Peningkatan Keragaman Genetik dengan Mutasi Radiasi Sinar Gamma

Kalus embrionik yang terbentuk disubkultur ke media terbaik induksi kalus kemudian kalus diradiasi dengan dosis 0, 1.000, 2.000, dan 3.000 rad. Radiasi dilakukan dengan radiasi sinar gamma cobalt 60 di PAIR BATAN. Kalus yang sudah diradiasi disubkultur ke media pemulihan untuk melihat pengaruh dosis radiasi pada kalus. Pertumbuhan kalus 4 minggu setelah diradiasi pada media pemulihan disajikan pada Tabel 3. Pada media pemulihan terlihat bahwa pencoklatan kalus meningkat dengan meningkatnya dosis radiasi. Meskipun demikian pada kalus yang diradiasi dengan dosis 1.000 rad, terlihat pembentukan embrio somatik.

Tabel 1. Persentase pembentukan kalus embriogenik dari eksplan JC pada formulasi media dengan penambahan NAA dan kinetin, 8 minggu setelah subkultur.

Formulasi media (mg/l)	Pembentukan kalus (%)
MT + NAA 10 + kinetin 0,5	35,14
MS + vitamin MW + NAA 10 + kinetin 0,5	76,47
MS1/2 + vitamin MW	0

MT = Murashige dan Tucker, MS = Murashige dan Skoog, MW = Morrel dan Weitmore.

Kalus-kalus yang sudah dipulihkan selama 4 minggu kemudian disimulasikan pada media MS modifikasi (MSKd) dengan penambahan $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan pH rendah (pH 4).

Seleksi *In Vitro* untuk Peningkatan Ketahanan terhadap Al pada pH Rendah

Kalus-kalus yang terbentuk baik kalus mutan maupun tidak diradiasi digunakan dalam simulasi cekaman Al. Simulasi dilakukan pada media MSKd (MS yang dimodifikasi) dengan penambahan $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4. Bahan tanaman diperlakukan pada media seleksi selama 4 minggu kemudian disubkultur pada media pemulihan. Kalus yang tidak diradiasi setelah diseleksi disubkultur pada media pemulihan dan kalus-kalus yang tetap hidup setelah diseleksi ditampilkan pada Tabel 4.

Dari Tabel 4 terlihat bahwa persentase kalus yang hidup menurun dengan peningkatan konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Pada media tanpa penambahan $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

(kontrol) juga terlihat kematian kalus, hal ini menunjukkan bahwa kalus JC tidak toleran untuk ditumbuhkan pada pH rendah (pH 4). Pada kalus yang hidup terbentuk struktur embrio somatik yang kemudian dapat membentuk benih somatik. Kalus yang berhasil tumbuh pada media dengan $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 ppm memperlihatkan persentase kalus hidup tertinggi tetapi struktur embrio somatik yang terbentuk lebih rendah daripada kalus dari media tanpa penambahan $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Struktur embrio somatik yang terbentuk pada media seleksi lebih dari 100 ppm $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pertumbuhan struktur embrio somatik lambat dan struktur globularnya tidak berkembang menjadi struktur embrio somatik yang lebih dewasa.

Peningkatan konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada media menurunkan persentase kalus yang hidup dan pembentukan struktur embrio somatik. Hal yang menarik terlihat pada kalus yang tetap hidup pada media dengan $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 750 ppm di mana kalus yang hidup lebih tinggi dari $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 500 ppm tetapi struktur

Tabel 2. Persentase pembentukan kalus jeruk batang bawah dengan eksplan nuselus dan embrio muda pada berbagai formulasi media.

Formulasi media (mg/l)	Eksplan	Pembentukan kalus (%)	Visual biakan
MT + N 7,5 + K 0,5	Embrio	29,41	Kalus putih hijau, remah
MT + N 10 + K 0,5		73,33	Kalus putih, remah
MT + N 12,5 + K 0,5		100	Kalus coklat kompak
MS + vit MW + N 7,5 + K 0,5		61,54	Kalus putih hijau, remah
MS + MW + N 10 + K 0,5		73,68	Kalus putih, remah
MS + MW + N 12,5 + K 0,5	Nuselus	85,71	Kalus coklat kompak
MT + N 7,5 + K 0,5		78,26	Kalus putih, remah
MT + N 10 + K 0,5		35,29	Kalus putih, remah
MT + N 12,5 + K 0,5		60	Kalus putih, kompak
MS + MW + N 7,5 + K 0,5		80	Kalus putih hijau, remah
MS + MW + N 10 + K 0,5		70	Kalus putih, remah
MS + MW + N 12,5 + K 0,5		56,52	Kalus putih, kompak

N = NAA, K = kinetin, MT = Murashige dan Tucker, MS = Murashige dan Skoog, MW = Morrel dan Weitmore. Angka dibelakang N dan K merupakan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan.

Tabel 3. Pengaruh radiasi terhadap pertumbuhan dan perkembangan kalus jeruk batang bawah JC, 4 minggu setelah tanam pada media pemulihan.

Perlakuan radiasi (rad)	Kalus putih (%)	Kalus coklat (%)	Jumlah struktur embrio somatik
0	86,67	13,33	0
1.000	57,45	42,55	4
2.000	53,85	46,15	0
3.000	42,31	57,69	0

Tabel 4. Persentase kalus yang hidup pada media seleksi dengan berbagai taraf konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4.

Konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ppm)	Kalus hidup (%)	Jumlah struktur embrio somatik dewasa	Penampakan biakan
0	91,67	8	Kuning coklat, berakar
100	92,31	3	Kuning coklat
250	66,27	0	Kuning coklat
500	23,08	0	Putih coklat, berakar
750	50,00	0	Putih coklat, berakar

kalusnya lebih kompak dibandingkan dengan kalus dari media kontrol.

Pada kalus hasil mutasi dengan radiasi sinar gamma diseleksi pada media yang sama dengan media untuk kalus yang tidak diradiasi. Kalus mutan menunjukkan pertumbuhan kalus yang berbeda dengan kalus yang tidak diradiasi di mana warna kalus mutan hampir seluruhnya berwarna putih coklat dan strukturnya lebih kompak, meskipun demikian setelah dipulihkan selama 4 minggu setelah diradiasi kalus tersebut diseleksi. Hasil seleksi menunjukkan bahwa kalus mutan tidak ada yang hidup pada media seleksi dengan konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 750 ppm. Bahkan pada konsentrasi 250 dan 500 ppm $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, hanya kalus yang diradiasi dengan dosis 1.000 yang dapat hidup (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa dosis lebih dari 1.000 menimbulkan penurunan kemampuan kalus untuk terus hidup dan beregenerasi sehingga ketika dalam kondisi cekaman Al pada pH rendah, kalus ini tidak mampu bertahan hidup.

Kalus-kalus mutan yang bertahan hidup disubkultur pada media untuk meregenerasikan kalus membentuk struktur embrio somatik pada media MS dengan penambahan vitamin MW dan ekstrak malt 500 mg/l.

Tunas mutan yang tumbuh dan berukuran 2 buku dengan 4 daun yang diseleksi pada media dengan penambahan $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4, menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada media menurunkan persentase tunas yang hidup. Tunas yang hidup umumnya menunjukkan pelayuan yang tinggi pada daunnya. Selain ditunjukkan dengan terbentuknya kalus pada pangkal tunas dari tunas yang tumbuh baik pada media seleksi ini (Tabel 6). Tunas yang tetap hidup disubkultur pada media MS + vitamin MW + ekstrak malt 500 mg/l untuk pemulihan.

Pada seleksi tahap 2 terlihat stabilitas toleransi terhadap $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dari mutan dengan dosis radiasi lebih tinggi, 2.000 dan 3.000, lebih baik daripada dosis 1.000 rad. Bahkan pada tunas-tunas yang diseleksi tidak hanya mampu bertahan hidup tetapi juga mampu beregenerasi. Regenerasi terbaik diperoleh dari tunas mutan 3.000 rad terseleksi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 750 mg/l di mana rata-rata multiplikasinya 4,6 (Tabel 7).

Tunas-tunas yang hidup setelah seleksi 2 dipulihkan pada media pemulihan. Setelah satu bulan setiap tunas diseleksi kembali untuk tahap 3 dengan menggunakan konsentrasi media yang sama dengan 2 kali seleksi sebelumnya.

Tabel 5. Persentase kalus mutan yang hidup pada media pemulihan setelah diseleksi pada media berbagai taraf konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4.

Konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ppm)	Dosis radiasi (rad)	Kalus hidup (%)
0	1.000	63,60
	2.000	23,07
	3.000	12,50
250	1.000	11,11
	2.000	0
	3.000	0
500	1.000	20
	2.000	0
	3.000	0
750	1.000	0
	2.000	0
	3.000	0

Tabel 6. Respon tunas mutan yang hidup pada media seleksi *in vitro* tahap 1 untuk toleransi terhadap alumunium dengan berbagai taraf konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4.

Dosis radiasi (rad)	Konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ppm)	Tunas hidup (%)	Rata-rata daun layu	Kalus (%)
1.000	0	100	0	33,33
	250	100	0	33,33
	500	40	0	40
	750	20	2	0
2.000	0	0	-	-
	250	30	0	30
	500	33,33	2	0
	750	50	0	0
3.000	0	100	0	100
	250	50	2	25
	500	33,33	2	0
	750	10	-	-

Pada seleksi tahap 3 terlihat bahwa tunas-tunas yang beregenerasi ketika diseleksi tahap 2 memperlihatkan gejala vitrifikasi yang tidak dapat diatasi ketika pemulihan. Tunas-tunas vitrifikasi ini tidak dapat bertahan hidup ketika diseleksi pada tahap 3. Pada seleksi tahap 3 hanya mutan yang diradiasi dengan dosis 2.000 rad yang memperlihatkan stabilitas ketahanan seperti pada 2 kali seleksi sebelumnya (Tabel 8). Pada mutan ini semua tunas yang diseleksi seluruhnya hidup pada semua konsentrasi penyeleksi.

Setelah 3 kali seleksi diperoleh 88 tunas mutan yang terseleksi pada berbagai konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan 27 tunas mutan yang tidak diseleksi dan tetap hidup pada media kontrol. Tunas-tunas ini kemudian dinomori sebagai individu dan selanjutnya akan diperbanyak secara klonal untuk evaluasi pada konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 750 mg/l, pH 4, serta untuk melihat akumulasi asam organik dari masing-masing individu. Asam organik seperti asam malat, asam sitrat, asam pufat,

asam fenolat, asam humat umumnya dihasilkan oleh tanaman yang toleran Al. Asam organik tersebut sebagai penyangga organik yang kuat yang dapat mengelat Al (Delhaize *et al.* 1993).

KESIMPULAN DAN SARAN

Media terbaik untuk menginduksi kalus embriogenik dari embrio muda adalah MS + vitamin MW + NAA 7,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l. Dosis radiasi yang masih dapat ditoleransi oleh kalus embriogenik batang bawah JC adalah 1.000 rad, tetapi selanjutnya ketika diseleksi dosis 2.000 rad lebih stabil dalam ketahanannya terhadap aluminium. Dari seleksi *in vitro* yang diulang secara bertahap sebanyak 3 kali telah diperoleh 88 tunas mutan yang terseleksi pada berbagai konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4.

Untuk mendapatkan kepastian sifat toleransi terhadap Al, maka perlu dilakukan evaluasi terhadap

Tabel 7. Respon tunas mutan terseleksi tahap 1 yang hidup pada media seleksi *in vitro* tahap 2 untuk toleransi terhadap aluminium dengan berbagai taraf konsentrasi $\text{AlClO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4.

Dosis radiasi (rad)	Konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4 (tahap 1)	Konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4 (tahap 2)	Jumlah Tunas				Penampakan biakan
			Tanam	Hidup	Mati	Rata-rata multiplikasi	
1.000	0	0	5	3	2	-	-
	250	250	4	3	1	-	Kematian tunas mulai dari pucuk
	500	500	7	8	2	1,6	Beberapa tunas membentuk kalus pada pangkalnya
	750	750	6	7	1	1,4	Kematian tunas mulai dari daun layu, 1 tunas membentuk akar
2.000	250	250	3	4	-	1,33	-
	500	500	1	1	-	1,0	Tidak ada pertumbuhan
	750	750	1	3	-	3,0	-
3.000	0	0	1	1	-	1,0	-
	250	250	4	6	-	1,5	-
	500	500	12	29	-	2,42	-
	50	750	5	23	-	4,6	1 tunas layu tapi masih terlihat pertumbuhan

Tabel 8. Respon tunas mutan terseleksi tahap 2 yang hidup pada media seleksi *in vitro* tahap 3 untuk toleransi terhadap aluminium dengan berbagai taraf konsentrasi $\text{AlClO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4.

Dosis radiasi (rad)	Konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4 (tahap 2)	Konsentrasi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pH 4 (tahap 3)	Jumlah Tunas				Visual biakan
			Tanam	Hidup	Mati	Persentase kematian	
1.000	0	0	10	10	-	0	-
	250	250	8	8	-	0	-
	500	500	8	4	4	50	Beberapa tunas membentuk kalus pada pangkalnya
2.000	750	750	11	11	-	0	-
	0	0	5	5	-	0	-
	250	250	12	12	-	0	-
	500	500	9	9	-	0	-
3.000	750	750	10	10	-	0	-
	0	0	12	12	-	0	-
	250	250	6	4	2	33,3	-
	500	500	26	14	12	-	Tunas vitrifikasi
	750	750	18	13	5	-	Tunas vitrifikasi

akumulasi asam organik ketika regenerasi dikondisikan dalam cekaman Al. Evaluasi akumulasi asam organik akan dilakukan pada jaringan akar dan daun.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2003.** Tata cara produksi benih inti dan benih penjenis jeruk. Badan Litbang Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura. 11 hlm.
- Delhaize, E., P.R. Ryan, and P.J. Randall. 1993.** Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103:695-702.
- Husni, A., M. Kosmiatin, I. Mariska, dan A. Purwito. 2008.** Penerapan teknologi fusi protoplas dalam perakitan jeruk lokal tipe baru. Laporan Hasil Penelitian Program Riset Insentif Terapan Tahun Anggaran 2007. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Kementerian Riset dan Teknologi.
- Jayasankar, S., Z. Li, and D.J. Gray. 2001.** *In vitro* selection of *Vitis vinifera* "Chardonnay" with *Elsinoe ananelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance enhanced secretion of chitinase. *Planta* 211:200-208.
- Kosmiatin, M., I. Mariska, A. Husni, Y. Rusyadi, Hobir, dan M. Tombe. 2000.** Seleksi silang ketahanan tunas *in vitro* panili terhadap asam fusaric dan ekstrak *Fusarium oxysporum*. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 5(2):77-83.
- Kumar, S., S. Kumar, S.P. Negi, and J.K. Kanwar. 2008.** *In vitro* selection and regeneration of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Tzelev) plants resistant to culture filtrate of *Septoria obesa* Syd. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 44(6):474-479.
- Makarim, A.K. 2005.** Cekaman abiotik utama dalam peningkatan produktivitas tanaman. Makalah Seminar Nasional Pemanfaatan Bioteknologi untuk Mengatasi Cekaman Abiotik pada Tanaman. BB-Biogen, Bogor, 22 September 2005. 15 hlm.
- Mariska, I. 2001.** Peningkatan ketahanan terhadap aluminium pada pertanaman kedelai melalui kultur *in vitro*. Laporan Riset Unggulan Terpadu (RUT) Tahun Anggaran 2001. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jakarta. 37 hlm.
- Martias. 2004.** Respon pertumbuhan bibit jeruk JC terhadap pemberian CaCO_3 dan pupuk P pada tanah Ultisol. *Jurnal Hortikultura* 14(1):33-40.
- Mendez-da-Gloria, F.J., F.D.A.A.M. Filho, L.E.A. Camargo, and B.M.J. Mendez. 2003.** Caipira sweet orange + Rangpur lime: A somatic hybrid with potential for use as rootstock in the Brazilian citrus industry. *Genet. Mol. Biol.* 23(3):2000-2009.
- Mulyani, A., Hikmatullah, dan H. Subagyo. 2003.** Karakteristik dan potensi tanah masam lahan kering di Indonesia. Makalah Simposium Nasional Penggunaan Tanah masam. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanah dan Agroklimat. Bogor. 23 hlm.
- Spiegel-Roy, P. and E.E. Goldschmidt. 1996.** Biology of Citrus. Cambridge University Press. London. 230 p.
- Subagyo, H., N. Suharta, dan A.B. Siswanto. 2000.** Tanah-tanah pertanian di Indonesia. Sumber Daya Lahan Indonesia dan Pengelolaannya. Pusat Penelitian Tanah dan Agroklimat, Bogor. hlm. 21-66.
- Triatminingsih, R. dan Karsinah. 2004.** Perbanyakan bibit jeruk Citromelo dan JC secara *in vitro*. *Jurnal Hortikultura* 14(4):238-245.
- Witjaksono and R.E. Litz. 2003.** *In vitro* regeneration and transformation of avocado (*Persea americana* Min). In Jaiwal, P.K. and R.P. Singh (Eds.). *Plant Genetic Engineering. Improvement of Fruit.* Crop. Sci. Tech Publ. (6):145-161.
-