

MIKROPROPAGASI JERUK

Mia Kosmiatin dan Ali Husni

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian

Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

PENDAHULUAN

Jeruk (*Citrus* spp.) adalah buah yang disukai karena banyak mengandung gizi dan vitamin C yang sangat bermanfaat bagi kesehatan. Selain digunakan untuk konsumsi buah segar dan minuman sari buah segar, buah jeruk juga banyak digunakan untuk industri produk buah kalengan, minuman, pektin, asam sitrat, *seed oil*, *peel oil*, *essential distilated oil*, *citrus alcohol*, *citrus wines* dan *brandies*, *citrus jams*, *jelly* dan *gel* yang dapat digunakan sebagai campuran dalam industri makanan dan farmasi. Berdasarkan banyaknya kegunaan yang dapat diambil dari buah jeruk tersebut maka kebutuhan pasar dunia terhadap buah jeruk akan terus meningkat dari tahun ke tahun (Spiegel-Roy & Goldschmidt 1996).

Di Indonesia jeruk merupakan komoditas buah yang termasuk 5 besar produksi buah nasional. Jeruk merupakan buah dengan tingkat produksi nasional ke 4 setelah Pisang, nanas dan mangga, walaupun demikian impor jeruk terus meningkat dari tahun ke tahun. Peningkatan impor jeruk segar ini selain karena kualitas jeruk impor yang lebih baik juga karena produksi nasional yang berkurang akibat serangan penyakit yang menyebabkan berkurangnya areal pertanaman jeruk. Berkurangnya luas per-

tanaman jeruk menyebabkan kebutuhan akan bibit jeruk meningkat, sehingga pada tahun 2018 kementan menetapkan sebagai tahun bibit nasional dan jeruk termasuk salah satu komoditas yang harus disediakan bibitnya dengan target pengadaan 1 juta bibit.

Budi daya komoditas jeruk dilakukan dengan menggunakan batang bawah, sehingga dalam penyediaan bibit, penangkar perlu menyediakan bibit untuk batang atas dan bibit batang bawah. Secara konvensional, penangkar bibit jeruk perlu menyediakan batang bawah yang umumnya disediakan dengan menambahkan biji, sementara batang atas disediakan dengan mata tempel yang kemudian diokulasikan pada bibit batang bawah. Sertifikasi bibit dilakukan oleh BPSB untuk memastikan kesehatan bibit (BAPPENAS 2010). Sampai saat ini, pengawasan sertifikasi bibit jeruk belum berjalan dengan baik, karena di pasar masih banyak bibit jeruk yang tidak bersertifikat dijual dan diduga menjadi sarana penyebaran penyakit seperti CVPD.

Perbanyakan bibit dapat dilakukan melalui dua pendekatan yaitu seksual dan aseksual. Perbanyakan seksual melibatkan fusi gamet dari tetuanya, sehingga turunannya akan membawa rekombinasi dari kedua tetuanya. Sementara perbanyakan aseksual tidak melalui fusi gamet tetapi dilakukan secara vegetatif sehingga secara genetik turunannya akan sama dengan tanaman induknya. Turunan yang berasal dari perbanyakan vegetatif biasa disebut sebagai klon. Umumnya teknik perbanyakan vegetatif dipilih bila biji yang dihasilkan tidak viabel, masa juvenil yang panjang dan memastikan keseragaman dengan induknya. Banyak tanaman budi daya diperbanyak secara vegetatif dan tumbuh sebagai klon dari tanaman induknya. Perbanyakan klonal ini umum dilakukan pada tanaman hortikultura baik yang herba maupun pohon berkayu, dan sangat berkembang pesat dengan teknik kultur jaringan/kultur *in vitro* atau dikenal juga sebagai mikropropagasi, teknik ini berperan besar dalam men-

dukung pemuliaan terutama pemuliaan modern. Hal yang harus diperhatikan dalam mikropropagasi adalah biaya dan aspek agronomi. Dengan mikropropagasi perbanyakan dapat dilakukan dalam skala besar dan tidak memerlukan lahan yang luas serta tidak dibatasi oleh musim, produksi bibit dapat dilakukan terus menerus sehingga dapat mengurangi biaya produksi dibandingkan bila dilakukan secara konvensional, yang memerlukan lahan yang luas dan hanya dapat dilakukan saat lingkungan optimum untuk produksi bibit. Teknik mikropropagasi memerlukan metode yang tepat sehingga keseragaman dengan tanaman induk dapat dipertahankan dan dari segi agronomis bibit yang dihasilkan akan berproduksi sama baiknya dengan tanaman induknya.

Penyediaan bibit yang seragam dengan tetuanya (*true to type*), dalam pengembangan pertanian menjadi hal yang berperan penting untuk menentukan keberhasilan perolehan hasil yang sama dengan induknya. Pada jeruk perbanyakan klonal diperlukan baik untuk batang bawah maupun batang atas, selain itu juga untuk memperbanyak jenis-jenis tanaman jeruk yang diintroduksi dari luar negeri perlu dilakukan perlindungan agar tidak turut menyebarkan penyakit yang terbawa benih. Biasanya jeruk diintroduksi dalam bentuk biji untuk tujuan keamanan karena jarang sekali penyakit penting dalam budi daya jeruk ditularkan melalui biji. Perkecambahan embrio nuselar dari biji introduksi secara *in vitro* yang diikuti dengan mikropropagasi dilakukan untuk menghindari *off type* pada bibit klonalnya (Sykes 2011). Perbanyakan juga perlu dilakukan pada jenis jeruk yang mulai langka karena tidak dibudidayakan secara ekonomis. *Citrus halimii* var. Stone adalah jeruk liar yang endemik dan langka, di Malaysia diperbanyak secara klonal untuk meningkatkan jumlah populasinya (Normah *et al.* 1997).

Pada jeruk pemuliaan lebih banyak dilakukan melalui pendekatan non konvensional karena persilangan seksual mengha-

dapi kendala system reproduksi jeruk yang unik. Jeruk adalah komoditas hortikultura penting dengan tingkat heterozigositas, poliembrionik dan apomiksis yang cukup tinggi, serta masa juvenile yang panjang, sehingga proses pemuliaan memerlukan waktu yang sangat panjang, lebih dari 10 tahun (Imai *et al.* 2016; Rai & Shekhawat 2014).

Mikropropagasi dilakukan tidak hanya untuk kepentingan perbanyak klonal dari varietas-varietas yang sudah berkembang saja tetapi juga sangat diperlukan untuk mendukung pemuliaan jeruk yang lebih banyak dilakukan melalui pemuliaan non konvensional, seperti hibridisasi somatik, transformasi, induksi mutasi dan poliploidisasi, serta hasil variasi genetik lainnya. Teknik ini memungkinkan untuk memperbanyak sel atau jaringan homozygous hasil variasi genetik (Perz-Tornero *et al.* 2010; Tallon & Porras 2010). Berkembangnya teknik *in vitro* sangat mendukung program pemuliaan jeruk baik untuk peningkatan kualitas buah, peningkatan produktivitas maupun peningkatan ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik.

TEKNIK MIKROPROPAGASI

Perkembangan teknologi *in vitro* secara umum menyebabkan berkembangnya berbagai teknik untuk memperbanyak tanaman atau mikropropagasi, tidak hanya menggunakan organ yang memiliki bakal tunas saja, tetapi juga menggunakan bagian-bagian tanaman yang secara tradisional tidak digunakan sebagai bahan untuk memperbanyak tanaman karena tidak memiliki meristem tunas. Saat ini perkembangan teknik *in vitro* sudah banyak menggunakan sel-sel tunggal sebagai bahan tanaman induk.

Jeruk adalah salah satu tanaman berkayu dengan respons *in vitro* yang tinggi, sehingga jeruk sering digunakan sebagai tanaman model untuk aplikasi teknik *in vitro* pada tanaman berkayu. Respons yang tinggi terhadap perlakuan *in vitro* menye-

babkan jeruk dapat diregenerasikan baik melalui organogenesis maupun embriogenesis dengan menggunakan berbagai jenis eksplan baik jaringan muda yang bersifat meristematis maupun jaringan yang dewasa dengan daya regenerasi yang sudah berkurang. Jeruk dilaporkan sebagai tanaman berkayu pertama yang dilaporkan dapat diregenerasikan melalui embriogenesis somatik dengan menggunakan eksplan jaringan nuselar, meskipun pada saat itu dilaporkan juga tingginya epigenetik pada regenerannya (Singh *et al.* 2004). Keberhasilan regenerasi jeruk sangat dipengaruhi oleh genotipe, formulasi media, zat pengatur tumbuh dan kondisi kultur antara lain intensitas cahaya (± 16 jam, densitas flux foton $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), eksplan (jaringan muda-tua; jaringan somatic-reproduksi), dengan tipe wadah-*vessel* kultur (petridish-botol kultur) (Carimi 2005; Khan *et al.* 2009; Molina *et al.* 2007; Marques *et al.* 2011).

TEKNIK ORGANOGENESIS

Organogenesis merupakan proses pembentukan dan perkembangan tunas dari jaringan meristem. Proses organogenik dimulai dengan perubahan sel parenkim tunggal atau sekelompok kecil sel, di mana selanjutnya membelah menghasilkan suatu masa sel globuler atau meristemoid, dan berkembang menjadi primordium pucuk atau akar (Bely 2005). Proses ini dapat terjadi karena suatu bagian tertentu secara alami memiliki sel/jaringan yang meristematis atau sel yang diinduksi untuk memiliki kemampuan meristematis. Jaringan yang secara alami sudah memiliki bagian meristematis adalah tunas terminal/apikal, bakal tunas lateral/ samping dan ujung akar. Jaringan atau sel yang pada awalnya tidak memiliki kemampuan meristematis dapat diinduksi untuk berdiferensiasi sehingga memiliki kemampuan seperti jaringan meristematis alami.

Pada mikropropagasi *in vitro*, perbanyakan klonal dapat dilakukan melalui Organogenesis yang terjadi secara langsung pada eksplan atau tidak langsung melalui pembentukan kalus.

ORGANOGENESIS LANGSUNG

Organogenesis langsung adalah proses pembentukan organ langsung pada eksplan yang secara alami memiliki meristem tunas. Pada beberapa jenis tanaman, proses organogenesis dapat terjadi pada jaringan yang sudah dewasa seperti pada irisan daun dan biji dewasa manggis (Thengane *et al.* 2006). Pada jeruk perbanyakan organogenesis dengan menggunakan eksplan jaringan dewasa menjadi tantangan tersendiri karena jaringannya keras dengan kemampuan regenerasi yang rendah. Eksplan dari tanaman juvenile biasanya sangat keras, fase juvenile panjang sehingga lambat berproduksi dan sering memunculkan karakter negatif dari fase juvenile. Penggunaan eksplan dari tanaman dewasa jarang digunakan karena tingkat kontaminasi yang tinggi, penurunan kemampuan regenerasi dan sulit menginduksi akar (Perz-Tornero *et al.* 2010). Eksplan *internode* yang diisolasi dari bibit yang berumur 2 bulan lebih respons dibandingkan dengan yang diisolasi dari yang berumur 12 bulan (Molina *et al.* 2007).

Hassanein & Azooz (2004), melakukan mikropropagasi pada jeruk keprok dengan menggunakan eksplan buku satu tunas yang diisolasi dari kecambah *in vitro*, jaringan ini cukup muda dan mampu membentuk tunas aksilar pada medium MS dengan penambahan BA 1 mg/l, Kinetin 0,5 mg/l dan NAA 0,5 mg/l. Sementara (Tavano *et al.* 2009) menggunakan hipokotil dari kecambah *in vitro* *C. volkameriana* yang dikulturkan pada medium MS yang diperkaya dengan BA 1 mg/l. Sementara eksplan epikotil *C. citrange*, dapat membentuk tunas adventif secara langsung pada medium yang ditambah dengan NAA 0,1 mg/l

dan BA 1 mg/l (Germana *et al.* 2011). Eksplan ujung akar dari kecambah *in vitro* pommelo, mampu diinduksi pembentukan tunasnya pada media MS yang diperkaya dengan BA 1 mg/l (Tyas *et al.* 2016).

Eksplan yang diisolasi dari jaringan dewasa umumnya memerlukan formulasi media yang lebih kompleks dengan kombinasi zat pengatur tumbuh tertentu. Regenerasi eksplan dari inter nodal *C limon*, berhasil diregenerasikan membentuk tunas adventif secara langsung pada media yang diperkaya dengan kombinasi BA dan GA (Perz-Tornero *et al.* 2010). Eksplan hipokotil pommelo dapat membentuk tunas pada media yang dikombinasikan dengan BA 2 mg/l dan NAA 0,5 mg/l (Tyas *et al.* 2016). Khan *et al.* (2009), berhasil menginduksi pembentukan tunas pada tepi daun dewasa jeruk manis Valencia pada medium MT dengan penambahan zat pengatur tumbuh BA 0,5 mg/l, Kinetin 0,5 mg/l dan NAA 0,1 mg/l.

Penggunaan medium dasar MS pada hampir semua jenis, baik jeruk batang bawah maupun batang atas, efektif digunakan baik untuk tujuan organogenesis maupun embriogenesis somatik tetapi pada mikropropagasi jeruk limon penggunaan medium dasar DKW memberikan hasil yang lebih baik dalam pembentukan tunas aksilarnya (Perz-Tornero *at al.* 2010; Begum *et al.* 2003). Medium DKW memiliki komposisi yang lebih kaya dibandingkan dengan medium MS, tetapi penggunaannya untuk mikropropagasi jeruk harus lebih hati-hati karena jeruk termasuk tanaman yang mudah mengalami variasi genetik.

ORGANOGENESIS TIDAK LANGSUNG

Regenerasi tanaman dengan organogenesis tidak langsung terjadi melalui pembentukan kalus atau massa sel yang tidak berdiferensiasi dan diinduksi pembentukan tunas adventifnya. Tunas adventif adalah tunas yang tumbuh pada jaringan yang

tidak biasa untuk tumbuh tunas. Kemampuan pembentukan tunas adventif secara alami dapat terbentuk pada tepi daun (seperti pada cocor bebek) atau pada ujung akar (seperti pada sukun). Secara alami pembentukan tunas adventif ini merupakan organogenesis langsung. Secara tidak langsung, kemampuan organogenesis dari jaringan yang tidak memiliki kemampuan meristematis dapat dilakukan dengan merubah sel yang sudah terdiferensiasi menjadi tidak terdiferensiasi sehingga terbentuk masal sel kalus yang dapat diarahkan untuk diferensiasi membentuk tunas.

Eksplan yang dapat digunakan untuk memperbanyak melalui organogenesis tidak langsung dapat berasal dari jaringan muda yang meristematis maupun jaringan yang lebih dewasa yang kurang meristematis. Penggunaan eksplan yang diisolasi dari tanaman muda lebih kompeten dibandingkan dengan eksplan yang diisolasi dari tanaman dewasa (Tavano *et al.* 2009). Eksplan yang digunakan internode dari tanaman jeruk *C. aurantium* yang berumur 12 bulan, pada media kombinasi BA (1–3 mg/l) dan NAA 0,1 mg/l lebih respons membentuk tunas dibandingkan dengan internode yang diisolasi dari tanaman dewasa di lapang, yang sudah berumur ± 5 tahun (Marques *et al.* 2011).

Penggunaan wadah atau tempat untuk mengkulturkan eksplan sedikit banyak mempengaruhi keberhasilan induksi tunas adventif, meski tidak secara signifikan. Penggunaan cawan petri lebih baik untuk menginduksi pembentukan tunas adventif dari internode dibandingkan dengan penggunaan botol kultur-*culture jar* 250 ml pada kondisi lingkungan yang sama, tetapi penggunaan cawan ini tidak dapat mendukung elongasi tunas (Marques *et al.* 2011) sehingga tunas adventif harus segera di-subkultur pada botol kultur.

Kondisi pengkulturkan sangat berpengaruh pada regenerasi eksplan. Volume kapasitas udara yang berkaitan dengan kandungan oksigen, carbondioksida dan etilene mempengaruhi

kemampuan regenerasi tunas (Tisserat & Vaughn 2008). Kelembaban yang tinggi dapat menyebabkan rendahnya transpirasi dan evaporasi yang berkorelasi terhadap kemampuan membentuk tunas adventif (Marques *et al.* 2011).

INDUKSI PEMBENTUKAN AKAR

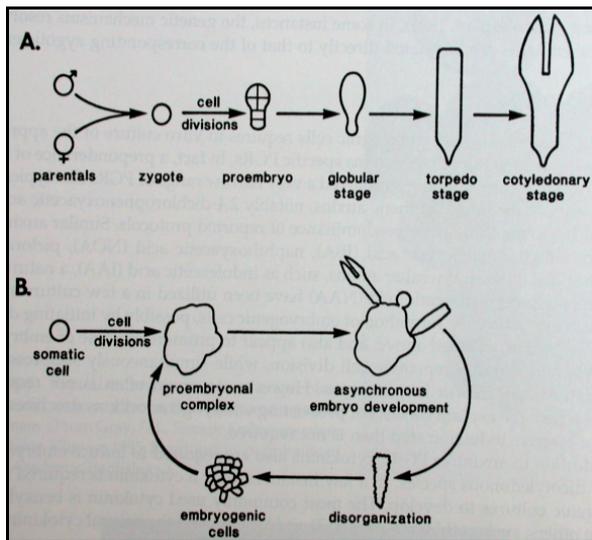
Dalam organogenesis baik langsung maupun tidak langsung, pembentukan akar harus diinduksi karena tunas terbentuk unipolar sehingga tidak terdapat meristem akar pada tunas aksilar maupun tunas adventif (Germana *et al.* 2011). Penggunaan auksin tunggal maupun kombinasi biasa digunakan untuk menginduksi pembentukan akar (Quatrini *et al.* 2003). Pada jeruk manis dan Pommelo induksi akar umum digunakan dengan NAA dan atau IBA (Begum *et al.* 2003), tetapi pada jeruk limon kombinasi terbaik untuk induksi akar adalah kombinasi IAA dan IBA. Pada jeruk keprok, formulasi media untuk menginduksi pembentukan akar tidak hanya memerlukan auksin tetapi juga memerlukan sedikit penambahan sitokinin (Hassanein & Azooz 2004). Pada *C. halimii*, induksi akar dapat dilakukan pada medium yang lebih sederhana yaitu medium MS dengan penambahan NAA 5 mg/l (Normah *et al.* 1997).

Induksi pembentukan akar pada tunas adventif maupun aksilar, hampir tidak dapat membentuk akar tunggang/primer. Pada tanaman berkayu akar tunggang yang kuat akan mendukung kehidupan dari batang atas. Hal ini menjadi kelemahan pada mikropropagasi tanaman berkayu melalui organogenesis, terutama untuk tanaman yang umum digunakan sebagai batang bawah. Akar yang terinduksi adalah akar lateral atau akar sekunder, akar ini penetrasi jauh kedalam tidak sebaik akar primer.

EMBRIOGENESIS SOMATIK

Embriogenesis somatik adalah proses perkembangan sel-sel tubuh/somatik untuk membentuk embrio dengan tahapan perkembangan yang sama dengan perkembangan embrio zigotik sehingga terbentuk embrio somatik dengan sistem vaskular yang terpisah dari tanaman induknya. Tahapan embriogenesis somatik meliputi berbagai tahap regenerasi yang dimulai dari pembentukan massa proembrionik (embriogenesis tidak langsung), yang diikuti dengan pembentukan embrio somatik, pendewasaan, desikasi dan perkecambahan planlet (Arnold *et al.* 2002).

Keuntungan mikropropagasi melalui embriogenesis somatik dibandingkan dengan organogenesis adalah potensi laju propagasi yang sangat tinggi karena setiap sel embriogenik berpotensi untuk menjadi tanaman lengkap. Selain itu pertumbuhan embrio somatik yang bipolar, dapat menginduksi pertumbuhan bakal



Sumber: Bely, 2005

Gambar 2.10. Ilustrasi embriogenesis zigotik (A) dan embriogenesis somatik (B)

akar untuk membentuk akar tunggang yang sangat diperlukan dalam perbanyakan untuk tanaman-tanaman berkayu (Thengane *et al.* 2006; Arnold *et al.* 2002). Di sisi lain peningkatan laju propagasi yang ditentukan oleh peningkatan jumlah embrio somatik yang dihasilkan seringkali menginduksi abnormalitas pada planlet (Arnold *et al.* 2002), sehingga formulasi medium harus ditimbang sedemikian rupa sehingga meskipun laju propagasinya tinggi, variasi somaklonal dapat diminimalisir.

Pada jeruk, teknik regenerasi melalui embriogenesis somatik lebih banyak ditujukan untuk membantu pemuliaan yang lebih banyak dilakukan nonkonvensional tanpa melalui persilangan seksual yang terkendala oleh sistem reproduksi jeruk yang unik (antara lain: heterozigositas yang tinggi, poliembrio, apomiksis, gamet steril, masa juvenil yang panjang). Secara alami jeruk merupakan jenis tanaman yang memiliki karakter embriogenesis somatik yang tinggi yang diperlihatkan oleh jaringan nuselar yang mampu tumbuh menjadi embrio nuselar (Gavish *et al.* 1992). Jaringan yang diisolasi dari ovul ini, dapat berkembang menjadi embrio normal hingga menjadi tanaman normal yang dapat berbuah (Carimi 2005).

EMBRIOGENESIS SOMATIK LANGSUNG

Embriogenesis somatik tidak langsung adalah proses pembentukan embrio somatik tanpa melalui pembentukan massa sel yang tidak terdiferensiasi. Umumnya eksplan yang digunakan adalah jaringan muda yang sangat meristematis, seperti biji muda (Thengane *et al.* 2006), embrio nuselar (Gavish *et al.* 1992), mikrospora, ovul (Carimi 2005), zigot, embrio somatik, dan tanaman muda (bibit) (Arnold *et al.* 2002). Embrio somatik tumbuh pada bagia periferi eksplan dan setelah membentuk fase *cotyledonary* (embrio somatik dewasa), embrio somatik akan lepas

dari jaringan eksplan/induknya dan berkecambah pada medium diluar jaringan induknya (Thengane *et al.* 2006).

Keberhasilan embriogenesis langsung saling ditentukan oleh keterkaitan antara keberadaan zat pengatur tumbuh dan kondisi fisiologis eksplan. Hal ini sering menjadi kegagalan mikropropagasi karena embrio somatik yang diberi berbagai perlakuan saat kondisi *in vitro* akan terlihat abnormalitasnya saat ditumbuhkan secara *ex vitro* (Arnold *et al.* 2002).

Pembentukan embrio somatik yang langsung dari jaringan eksplan, dapat mengurangi kemungkinan variasi somaklonal yang kerap terjadi pada jaringan yang diinduksi untuk aktif membelah. Hal ini terjadi karena sel-selnya merupakan sel yang bersifat *embryogenically predetermined* (sel-sel somatik yang berkemampuan membentuk embrio) sehingga tidak memerlukan perlakuan untuk merubah karakter sel seperti pada embriogenesis somatik tidak langsung (Arnold *et al.* 2002).

Formulasi media untuk meregenerasikan eksplan melalui embriogenesis langsung umumnya lebih sederhana dibandingkan dengan embriogenesis tidak langsung, meskipun tetap memerlukan komposisi, terutama media dasar dan zat pengatur tumbuh yang unik. Media dasar MT banyak digunakan untuk mendukung embriogenesis somatik dengan eksplan ovul (Carimi 2005). Medium dasar ini memiliki komposisi hara makro dan mikro yang sama dengan medium dasar MS yang memiliki komposisi lengkap yang sesuai untuk berbagai jenis tanaman dan tujuan pengkulturan, tetapi untuk embriogenesis jeruk memerlukan konsentrasi vitamin yang lebih tinggi, hingga 10 kali dari yang terkandung pada medium MS (Carimi 2005).

Regenerasi melalui embriogenesis langsung, tetap membutuhkan penambahan zat pengatur tumbuh didalam formulasi medianya meskipun tidak sekompleks formulasi medium untuk embriogenesis tidak langsung. (Carimi, 2005), menambahkan BA hingga 0-6 mg/l atau kombinasi BA 0,1 mg/l dan 2,4-D 0,01 mg/l,

untuk meinduksi pembentukan embrio somatik dari jaringan eksplan. Perkecambahan embrio somatiknya dilakukan dengan menghilangkan zat pengatur tumbuh pada formulasi medium dasarnya.

EMBRIOGENESIS SOMATIK TIDAK LANGSUNG

Embriogenesis somatik tidak langsung adalah proses pembentukan embrio somatik melalui pembentukan sel-sel *undetermined* dan massa sel/kalus yang tidak terdiferensiasi (Arnold *et al.* 2002). Massa sel ini terdiri dari *proembryogenic masses*–PEMs, yang perkembangannya sangat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh. Menurut (Arnold *et al.* 2002), regenerasi melalui embriogenesis somatik tidak langsung secara umum terdapat 4 tahap, yaitu: (1) Inisiasi pembentukan massa/kalus embriogenik, umumnya menggunakan auksin dan terkadang dikombinasikan dengan sitokinin; (2) Proliferasi kalus embriogenik dengan mensubkultur pada media yang sama dengan media induksi; (3) Prapendewasaan embrio somatik pada medium yang dikurangi zpt-nya sehingga menstimulasi perkembangan embrio somatik (Husni *et al.* 2010); (4) Pendewasaan embrio somatik pada medium yang diperkaya dengan ABA dan senyawa penerun tekanan osmotik (Kosmiatin *et al.* 2014; Gavish *et al.* 1992); dan (5) Perkecambahan embrio somatik pada medium tanpa zat pengatur tumbuh.

Stigma dan stilus pada *C. myrtifolia*, *C. limon* yang ditumbuhkan dengan teknik *TCL-Thin Cell Layers* pada media dengan penambahan turunan fenilurea dapat diinduksi embriogenesis somatik tidak langsungnya lebih baik dibandingkan dengan BA yang biasa digunakan untuk induksi embriogenesis somatik (Carra *et al.* 2006). Sementara (Carimi 2005) dan Meziane *et al.* (2017), menginduksi pembentukan kalus embriogenik dengan menggunakan eksplan stigma dan stilus tanpa pengirisan, pada

medium dasar MT dengan penambahan 500 mg/l ekstrak malt BA 0–3 mg/l dan dilakukan sub kultur berulang pada medium yang sama setiap 4–5 minggu hingga kalus mampu membentuk embrio somatik.

Stabilitas genetik atau tingkat *true to type*-kesamaan dengan induk, dari embriogenesis somatik melalui pembentukan kalus sering mengalami variasi pada bibitnya. Pada jeruk lemon (*C. limon*) yang diregenerasikan melalui embriogenesis somatik tidak langsung menggunakan eksplan stigma/stilus, polimorfis pada tingkat bibit 0% sedangkan pada jeruk keprok tingkat polimorfismenya tinggi hingga 50% dengan menggunakan 12 primer ISSR (Meziane *et al.* 2017)

AKLIMATISASI

Aklimatisasi merupakan tahapan terakhir dalam mikropropagasi dan sangat menentukan keberhasilan dalam perbanyakan massal. Aklimatisasi adalah tahap penyesuaian planlet dari kondisi artifisial *in vitro* di dalam botol (heterotrof) ke kondisi lingkungan alami, *ex vitro* (autotrof). Terdapat tiga hal utama yang menentukan keberhasilan mikropropagasi yaitu kontrol fisik (lingkungan saat aklimatisasi) dan biokimia (media tanam) serta *biohardening* (praperlakuan *in vitro* sesaat sebelum aklimatisasi (Chandra 2010).

Planlet yang ditumbuhkan dalam keadaan steril dengan lingkungan optimal (sumber karbon berlebih, kelembaban tinggi, cahaya rendah dan aseptik) memiliki morfologi stomata yang tidak fungsional, sistem perakaran yang lemah dan kutikula yang tipis, sangat rentan terhadap lingkungan luar (sumber karbon, temperatur tinggi, kelembaban rendah, cahaya lebih dan gangguan dari mikroba) (Jo *et al.* 2009; Chandra 2010; Hazarika 2003). Hal ini menyebabkan proses aklimatisasi dari laboratorium ke lapang (rumah kaca) harus dilakukan secara bertahap.

Aklimatisasi dapat dilakukan di rumah kaca dengan kelembaban yang tinggi dan berangsur-angsur disesuaikan dari kondisi optimal dalam botol dengan kondisi lapangan. Aklimatisasi memerlukan kombinasi yang optimal dari media tumbuh dan lingkungan optimal, terutama kelembaban untuk menghindari dehidrasi dari planlet (Clapa *et al.* 2013). Keberhasilan aklimatisasi juga dipengaruhi oleh formulasi medium praperlakuan sebelum aklimatisasi, seperti konsentrasi sukrosa untuk aklimatisasi jeruk kinnow (Kumar *et al.* 2001), dan penambahan retardan (Hazarika 2003). Pada jeruk dan beberapa komoditas hortikultura lain, praperlakuan ini ditujukan untuk mengurangi tekanan osmotik planlet, daun lebih hijau (peningkatan klorofil), memendekkan buku, menginduksi pembentukan lapisan lilin epikutikular pada planlet, dan menebalkan akar (Hazarika 2003; Cham *et al.* 2010).

Planlet yang dapat diaklimatisasi adalah planlet yang mempunyai daun dan akar sempurna, sehingga pada kondisi lingkungan luar planlet dapat melanjutkan pertumbuhannya dengan baik. Kondisi morfologi planlet sangat menentukan keberhasilan aklimatisasi. Planlet yang diregenerasikan secara organogenesis, harus dipastikan terbentuk hubungan antara vascular akar dan tunas. Pertumbuhan akar dapat dilakukan secara *in vitro*, maupun secara *ex vitro*, meskipun akar yang ditumbuhkan secara *in vitro* akan membentuk hubungan vaskular yang lebih baik (Hazarika 2003).

Pada jeruk, aklimatisasi dengan *biohardening* dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi gula (biokimia) dan aplikasi endofit (*biohardening*) (Quatrini *et al.* 2003; Carimi 2005), Aklimatisasi jeruk dapat dilakukan tanpa *biohardening*, tetapi harus dilakukan pada lingkungan dengan tingkat kelembaban yang tinggi (95%), selama 4 minggu kemudian diturunkan secara gradual. Kelembaban yang tinggi pada lingkungan tanam biasanya akan menginduksi serangan patogen, sehingga saat tanaman

mulai meningkat vigoritasnya, kelembaban perlu segera diturunkan.

POTENSI MIKROPROPAGASI UNTUK PRODUKSI BIBIT JERUK MASSAL

Secara umum mikropropagasi akan lebih menguntungkan dibandingkan dengan teknik konvensional. Mikropropagasi hanya memerlukan bagian kecil dari tanaman yang digunakan sebagai eksplan, tidak memerlukan ruang yang luas, dan ditumbuhkan secara aseptik maka bahan tanaman yang dihasilkan biasanya bebas penyakit. Dalam mikropropagasi pengaturan faktor-faktor yang mempengaruhi dapat diatur lebih fleksibel termasuk pengaturan nutrisi dan zpt dengan memformulasikan media untuk setiap tahapan pertumbuhannya. Pengaturan formulasi media memungkinkan perbanyakan tanaman yang sangat lambat atau sulit dilakukan dengan perbanyakan vegetatif biasa, selain itu juga dimungkinkan untuk menginduksi pertumbuhan karakter yang diinginkan seperti mempercepat pertumbuhan sulur, anak-anak berjumlah lebih banyak,

Produksi bibit dapat dilakukan sepanjang tahun bahkan untuk produksi massal sekalipun. Produksi dapat dilakukan sepanjang tahun karena tidak bergantung musim, bahan tanaman/eksplan vegetatif dapat disimpan dalam waktu yang lama. Produksi massal relatif tidak memerlukan ruang yang luas, investasi terbesar terjadi pada awal perbanyakan untuk memformulasikan media untuk induksi tunas dan multiplikasinya. Produksi massal efektif dilakukan melalui embriogenesis somatik, karena laju multiplikasi sangat tinggi, di mana setiap sel dapat diregenerasikan menjadi satu bibit.

Pada jeruk, mikropropagasi diutamakan untuk memperbanyak jeruk yang digunakan sebagai batang bawah, karena pada umumnya bibit jeruk yang berasal dari kultur jaringan/*in vitro*

akan mengalami fase juvenil yang panjang dan menunda fase reproduksi. Perbanyakkan batang bawah tidak perlu segera mengalami fase reproduksi, sementara batang atas harus segera menghasilkan buah. Selain itu dalam perbanyakkan batang bawah jeruk yang harus dipastikan adalah terbentuknya akar yang baik yang dapat mendukung pertumbuhan batang atas. Hal ini menyebabkan produksi masal jeruk batang bawah harus dipastikan mampu membentuk akar tunggang yang menjadi syarat utama sebagai batang bawah yang baik. Perbanyakkan melalui embriogenesis somatik menjadi pilihan, karena pertumbuhan embrio somatik yang bipolar memastikan pertumbuhan akar tunggang, sementara perbanyakkan melalui organogenesis tidak disarankan karena pertumbuhannya unipolar dan akar yang diinduksi merupakan akar serabut, yang kurang dapat mendukung pertumbuhan batang atas.

Mikropropagasi melalui embriogenesis somatik juga sangat berperan penting dalam pemuliaan jeruk yang banyak dilakukan melalui pemuliaan modern. Melalui embriogenesis somatik, satu sel yang unik dapat diregenerasikan menjadi individu tanaman yang unik pula. Karakter yang unik dari sel-sel tanaman jeruk dapat diperoleh baik dari sifat alami sel tersebut (seperti sel-sel gamet), protoplas yang rentan terintroduksi oleh materi genetik disekitarnya maupun sel-sel yang sudah mengalami perubahan baik melalui variasi somaklonal (mutasi alami maupun yang diinduksi), hiridisasi somatik (fusi protoplas) maupun pemuliaan molekuler (introgresi gen melalui transformasi dan pengeditan genom). Tanaman unik yang diperoleh melalui pemuliaan modern, dapat diperbanyak secara klonal sehingga diperoleh bibit yang memiliki keunikan yang sama dengan tanamannya.

KESIMPULAN

Mikropropagasi merupakan salah satu alternatif untuk menyediakan bibit dalam jumlah banyak dan diharapkan sama dengan tanaman induknya. Pemilihan teknik yang tepat dalam mikropropagasi jeruk sangat ditentukan oleh jenis jeruk yang akan diperbanyak. Pada jeruk batang bawah yang bertanggung jawab untuk mendukung pertumbuhan batang atas, perbanyak-an masal melalui embriogenesis somatik lebih direkomendasikan karena perkembangannya yang bipolar, sehingga bibit yang dihasilkan akan memiliki akar tunggang yang sangat diperlukan sebagai batang bawah. Pada jeruk batang atas yang akan dipanen buahnya, regenerasi dengan teknik embriogenesis somatik memungkinkan satu sel tanaman dapat diregenerasikan menjadi tanaman yang lengkap, sehingga sel-sel unik baik alami maupun hasil induksi perubahan (pemuliaan) dapat diregenerasikan menjadi tanaman yang unik pula.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, Von S, Sabala I, Boshkov P, Dyachok J, Filanova L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. pp. 233-249.
- Begum F, Amin M, Islam S, Azad MAK, Rehman MM. 2003. *In vitro* Plant regeneration from cotyledon derived-callus of three varieties pummelo (*Citrus grandis*). On Line J Biol Sci. 3:751-759.
- Carimi F. 2005. Somatic embryogenesis protocol : citrus. pp. 321-343. In: Jain SM, Gupta SK, editors. Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Springer. Printed in the Netherlands. pp. 321-343.

- Carra A, ÆF De Pasquale, Ricci ÆA. 2006. Diphenylurea derivatives induce somatic embryogenesis in Citrus. [Online] 41-48. Available from: doi:10.1007/s11240-006-9132-0.
- Cha-um S, Ulziibat B, Kirdmanee C. 2010. Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth characters of Phalaenopsis adapted to *in vivo*. Aust J Crop Sci. 4:750-756.
- Chandra S. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets□: From laboratory to land. [Online] (July 2017). Available from: doi:10.1007/s10529-010-0290-0.
- Clapa D, Fira A, Joshee N. 2013. An Efficient Ex Vitro Rooting and Acclimatization Method for Horticultural Plants Using Float Hydroculture. Hortscience. 48:1159-1167.
- Gavish H, Vardi A, Fluhr R. 1992. Suppression of somatic embryogenesis in Citrus cell cultures by extracellular proteins. Planta. 511-517.
- Germana MA, Micheli M, Chiancone B, Standard A. 2011. Organogenesis and encapsulation of *in vitro*-derived propagules of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L .) Osb . 3 *Poncirus trifoliata* (L .) Raf]. Plant Cell Tiss Organ Cult. [Online]. 106:299-307. Available from: doi:10.1007/s11240-011-9921-y.
- Hassanein AM, Azooz M. 2004. Propagation of Citrus reticulata via *in vitro* seed germination and shoot cuttings. Biol Plant. 47:173-177.
- Hazarika BN. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Sci. [Online]. 85:1704-1712. Available from: doi:10.1007/s10529-010-0290-0.

- Husni A, Mariska I, Sudarsono, Purwito A. 2010. Regenerasi jeruk siam melalui embriogenesis somatik. *J AgroBiogen*. 6:75-83.
- Imai A, Kuniga T, Yoshioka T, Nonak K. 2016. Evaluation of the best linear unbiased prediction method for breeding values of fruit-quality traits in citrus. *Tree Genetics & Genomes*. [Online] *Tree Genetics & Genomes*. Available from: doi:10.1007/s11295-016-1078-8.
- Khan EU, Fu X, Wang J., Fang Q, Huang X, Zhang G, She J, Liu J. 2009. Regeneration and characterization of plants derived from leaf *in vitro* culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars. *Sci Hortic, Elsevier*. 120:70-76.
- Kosmiatin, Purwito MA, Mariska I, Wattimena GA. 2014. Induksi embriogenesis somatik dari jaringan endosperma jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.) var. Simadu Somatic Embryogenesis Induced from Endosperm Tissues of *Citrus nobilis* Lour. *Simadu*. 42 (1), 2014.
- Kumar K, Dhatt AS, Gill MIS. 2001. In-vitro plant regeneration in Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour. × *C. deliciosa* Tenora). *Indian J Hortic*. 58:299-302. Horticultural Society of India (Regd.),
- Marques NT, Nolasco GB, Leitão JP. 2011. Factors affecting *in vitro* adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. *Sci Hortic, Elsevier*. 129:176-182.
- Meziane M, Frasher D, Carra A, Boudjeniba M, Onghia AMD, Mercati F, Djelouah K, Carimi F. 2017. Attempts to eradicate graft-transmissible infections through somatic embryogenesis in *Citrus* ssp. and analysis of genetic stability of regenerated

- plants. [Online] Eur J Plant Pathol. 85-95. Available from: doi:10.1007/s10658-016-1072-x.
- Molina RV, Castello S, García-Luis A, Guardiola JL. 2007. Light cytokinin interactions in shoot formation in epicotyl cuttings of Troyer citrange cultured *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult, Springer. 89:131-140.
- Normah MN, Hamidah S, Ghani FD. 1997. Micropropagation of *Citrus halimii*—an endangered species of South-East. Plant Cell Tissue Organ Cult 50:225-227.
- Perz-Tornero O, Tallon CI, Porras I. 2010. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. Plant Cell Tiss Organ Cult. [Online] 100:263-271. Available from: doi:10.1007/s11240-009-9643-6.
- Quatrini P, Gentile M, Carimi F, De Pasquale F, Puglia AM. 2003. Acclimatization citrus Quatrini. J Hortic Sci Biotechnol. 78:39-45.
- Rai MK, Shekhawat N. 2014. Recent advances in genetic engineering for improvement of fruit crops. Plant Cell Tiss Organ Cult. [Online]. 116:1-15. Available from: doi:10.1007/s11240-013-0389-9.
- Rajesh EJÆ, Tewari K, Paek EHÆK. 2009. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. [Online] 307-315. Available from: doi:10.1007/s11240-008-9488-4.
- Spiegel-Roy P, Goldschmidt EE. 1996. The biology of citrus. New York (USA): Cambridge University Press.
- Sykes SR. 2011. Characterisation of citrus rootstock germplasm introduced as seeds to Australia from the People's Republic of China. Scientia horticulturae. Elsevier, 127:298-304.

- Tavano ECR, Stipp LCL, Muniz FR, Mourão Filho FAA, Mendes BMJ. 2009. *In vitro* organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium*. *Biol plantarum*. Springer, 53:395-399.
- Thengane SR, Deodhar SR, Bhosle SV, Rawal SK. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration in *Garcinia indica* Choiss. *Curr Sci*. 91:6-10.
- Tisserat B, Vaughn SF. 2008. Growth, morphogenesis, and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in vitro*. *In Vitro Cell Develop Biol Plant*. Springer, 44:40-50.
- Tyas KN, Susanto S, Dewi IS, Khumaida N. 2016. Organogenesis tunas secara langsung pada pamelon (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.). *J Krbogor.lipi.go.id*. 19:1-10.