

INDUKSI TUNAS SECARA *IN VITRO* DARI BIJI UTUH DAN KOTILEDON JERUK SIAM (*Citrus Nobilis* Lour.) 'KAMPAR' DENGAN PEMBERIAN BENZYL AMINO PURINE (BAP)

Siti Fatonah, Wahyu Lestari, dan Lamtiur Purba

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Riau

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan tipe eksplan dan konsentrasi BAP terbaik dalam induksi tunas jeruk siam 'Kampar'. Penelitian berbentuk percobaan faktorial yang dirancang secara acak kelompok (RAK), terdiri dari dua factor dua faktor perlakuan (eksplan biji utuh, kotiledon) dan konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP pada medium MS (0 mg/l (B1); 1 mg/l (B2); 2 mg/l (B3); 3 mg/l (B4); 4 mg/l (B5); dan 5 mg/l (B6)). Terdapat 12 kombinasi perlakuan, dengan 12 ulangan, secara keseluruhan terdapat 144 unit percobaan. Hasil penelitian menunjukkan, persentase pembentukan tunas, jumlah tunas yang terbentuk, dan tinggi tunas lebih tinggi pada eksplan biji utuh dibandingkan kotiledon, namun pembentukan tunas lebih cepat pada eksplan kotiledon. Pemberian BAP cenderung menurunkan persentase pembentukan tunas, jumlah tunas yang terbentuk dan tinggi tunas lebih tinggi pada perlakuan tanpa pemberian BAP. Pemberian BAP cenderung menurunkan, baik pada eksplan biji utuh maupun kotiledon. Pemberian BAP 3 mg/l cenderung meningkatkan jumlah daun, baik pada eksplan biji utuh maupun kotiledon.

Kata Kunci: Jeruk Siam (*Citrus Nobilis* Lour.) 'Kampar', induksi tunas, eksplan biji, eksplan kotiledon, BAP

PENDAHULUAN

Jeruk merupakan salah satu buah yang disukai, karena rasa, aroma, kenampakan dan kasiatnya bagi kesehatan. Salah satu jenis jeruk yang banyak diusahakan di Propinsi Riau adalah jeruk siam (*Citrus Nobilis* Lour.). Selain dikonsumsi sebagai buah segar, jeruk siam juga umum digunakan sebagai produk olahan, antara lain jus, es krim, sirup, sari buah dan permen. Kabupaten Kampar merupakan daerah yang potensial dalam pengembangan komoditas buah-buahan, antara lain jeruk siam.

Keberadaan jeruk siam di Kabupaten Kampar saat ini semakin berkurang, akibat serangan hama dan penyakit antara lain penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*). Akibatnya petani jeruk siam mengganti lahannya dengan tanaman lain, terutama kelapa sawit. Saat ini tanaman jeruk yang masih bertahan merupakan tanaman jeruk yang tahan terhadap penyakit. Dari kebun jeruk yang ada di kampar, masih banyak terdapat kebun jeruk di Kecamatan Tamabang dan Bangkinang barat. Individu tanaman jeruk yang berpotensi untuk dikembangkan lebih banyak ditemukan di desa Aur Sati Kecamatan Tambang (Wahibah, dkk, 2010). Perlu upaya mempertahankan tanaman jeruk siam khas kampar yang masih bertahan dan mengembangkannya. Untuk itu perlu pengadaan bibit dalam

jumlah banyak. Upaya perbanyak bibit yang umum dilakukan adalah secara vegetatif dengan memanfaatkan tanaman induk melalui cangkok dan okulasi. Keterbatasan tanaman induk menjadi kendala dalam pengadaan bibit jeruk siam dalam skala besar. Teknik kultur jaringan (kultur *in vitro*) dapat dimanfaatkan dalam membantu upaya perbanyak bibit dalam jumlah banyak dan seragam.

Tahap awal pada teknik kultur *in vitro* untuk tujuan propagasi atau perbanyak tanaman adalah induksi tunas dari bahan tanaman (eksplan). Salah satu eksplan yang dapat digunakan untuk induksi tunas adalah biji. Biji jeruk umumnya bersifat poliermbrioni, yang bila dikecambahkan menghasilkan dua macam anakan, yaitu anakan generatif yang berasal dari fertilisasi (zigot), dan anakan vegetatif atau disebut anakan nuselar, yang berasal dari embrio yang terbentuk dari sebuah atau sekelompok sel pada nuselus maupun integument. Adanya embrio nuselar memungkinkan anakan yang tumbuh dari sel somatik yang mempunyai sifat sama dengan induknya (Setiono dan Supriyanto, 2005; Chanana and Gill, 2008). Jumlah embrio nuselar pada biji jeruk dapat mencapai 12 embrio, tetapi yang mampu tumbuh umumnya tidak lebih dari 4 semaian (bibit). Bagian biji yang mengandung embrio nuselar adalah kotiledon (Koltunow, et al., 1996; Jajoo, 2009). dan hasil perbanyak jeruk secara *in vitro* menggunakan eksplan kotiledon yang diuji dengan penanda *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) menunjukkan sifat yang sama dengan induknya (Ramkrishna et al 2005).

Induksi tunas langsung dari eksplan dapat dilakukan melalui penambahan zat pengatur tumbuh pada medium kultur, yaitu zat pengatur tumbuh golongan sitokinin misalnya BAP (6-Benzylaminopurine), kinetin, baik tunggal maupun kombinasi dengan auksin, misalnya NAA, atau IBA. Medium perbanyak jeruk secara *in vitro* yang banyak diujikan dan dipakai yaitu medium MS (Murashige dan Skoog). Penambahan BAP 1,5 mg/l memacu pembentukan tunas dari biji jeruk lemon (*Citrus Jambheri* Lush.) (Altaf et al., 2008). Kultur *in vitro* dengan eksplan biji jeruk *Citrus limonia* Osbeck. pada medium MS dengan penambahan 0,5 mg/l BAP mampu menginduksi tunas dengan jumlah tertinggi (18,26 tunas), penambahan NAA menurunkan jumlah tunas yang terbentuk (Jajoo, 2010). Induksi tunas dari nodus jeruk siam (*Citrus Nobilis* Lour) asal Tawangmangu dengan pemberian BAP 0,5 BAP meningkatkan jumlah tunas yang terbentuk (Samanhudi, et al., 2010).

Perbanyak tunas secara *in vitro* juga telah dilakukan menggunakan kotiledon sebagai eksplan. Perbanyak tanaman dari kotiledon *Citrus limonia* Osbeck. secara *in vitro* pada media MS dengan pemberian 0,5 mg/l BAP mampu menginduksi tunas dengan jumlah tertinggi, sedangkan jika dikombinasikan dengan NAA menurunkan jumlah tunas yang terbentuk (Jajoo 2010). Pembentukan tunas dari kotiledon tanaman *Citrus clementina* kultivar "Monreal", "SRA 63" dan "SRA 64" dipicu dengan pemberian BAP dalam media. Kultivar "Monreal" dengan pemberian 4 mg/l BAP memberikan respons menginduksi tunas paling banyak, sedangkan kultivar "SRA 63" dan "SRA 64" menginduksi tunas paling banyak dengan pemberian 3 mg/l BAP (Lombardo et al. 2011). Rahman et al. (2006) menyatakan bahwa eksplan kotiledon lebih baik daripada epikotil untuk pertumbuhan tinggi tanaman, jumlah daun dan jumlah akar yang terbentuk dalam perbanyak tanaman jeruk besar (*Citrus maxima* Burn.) secara *in vitro*. Eksplan kotiledon *Citrus reticula* L. dalam 5 mg/l BAP memberikan

respons multiplikasi tunas terbanyak dibanding penggunaan kombinasi BAP dengan NAA (Sarma *et al.* 2011).

Dari beberapa hasil penelitian tersebut, biji utuh dan kotiledon berpotensi sebagai eksplan, yang bila dikulturkan dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP dapat menghasilkan tunas dalam jumlah banyak. Untuk perbanyakan tanaman jeruk siam asal kampar, perlu dicoba menggunakan eksplan biji dan kotiledon dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP dengan berbagai konsentrasi pada medium MS. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan eksplan dan konsentrasi BAP terbaik dalam induksi tunas jeruk siam 'Kampar'.

METODE PENELITIAN

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Biologi Terpadu Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau pada bulan Maret sampai Juni 2012.

Alat yang digunakan, yaitu : *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) merk LabTech, autoklaf merk AllAmericana tipe 25X-2, *oven* merk PSelecta tipe 2001244, timbangan analitik merk Kern tipe ABJ 120-4M, *hot plate* merk PSelecta tipe 048432, rak kultur, erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, pipet tetes, botol kultur, pinset, *scalpel*, lampu bunsen, botol *sprayer*, aluminium foil, kertas pH, kertas label, kertas saring, karet gelang, plastik, tisu gulung. Bahan yang digunakan sebagai eksplan adalah biji jeruk siam dari kebun jeruk di desa Belimbing 2, kecamatan Kuok, kabupaten Kampar, media MS (*Murashige and Skoog*) merk Phyto Technology Laboratories, agar-agar merk Fisons sebagai pematat, sukrosa, zat pengatur tumbuh BAP merk Merck, natrium hipoklorit (bayclin), alkohol 70%, aquades, detergen, spiritus, NaOH 1 N, HCl 1 N, betadine, fungisida merk Dithane M-45, bakterisida merk Plantomycin.

Penelitian berbentuk percobaan faktorial yang dirancang secara acak kelompok (RAk), terdiri dari dua factor dua faktor perlakuan yaitu : Tipe eksplan biji dan konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP pada medium MS. Tipe eksplan terdiri dari dua macam yaitu biji utuh (E1) dan bagian kotiledon (E2). Konsentrasi BAP terdiri dari 6 taraf, yaitu: 0 mg/l (B1); 1 mg/l (B2); 2 mg/l (B3); 3 mg/l (B4); 4 mg/l (B5); dan 5 mg/l (B6). Secara keseluruhan terdapat 12 kombinasi perlakuan, yang masing-masing dengan 12 ulangan. Dengan demikian terdapat 144 unit percobaan.

Tahapan penelitian yang dilakukan selama induksi tunas adalah Persiapan dan sterilisasi alat, pembuatan media tanam, pemilihan eksplan dan sterilisasi eksplan, penanaman eksplan dan pemeliharaan. Parameter yang diamati adalah waktu terbentuk tunas, jumlah eksplan yang membentuk tunas, jumlah tunas, jumlah daun dari setiap tunas. Analisis data secara kuantitatif dilakukan menggunakan Anova (*analysis of variance*) berdasarkan uji F taraf 5% dan apabila berpengaruh nyata dilakukan uji lanjut DMRT taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Pembentukan Tunas dari eksplan biji utuh dan kotiledon jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.) 'Kampar'

Persentase pembentukan tunas dari eksplan biji utuh dan eksplan kotiledon terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase pembentukan tunas dari eksplan biji utuh dan eksplan kotiledon

Konsentrasi BAP (mg/l)	Persentase Pembentukan Tunas (%)	
	Biji utuh	Kotiledon
0	100	91,67
1	83,33	75
2	83,33	41,67
3	100	58,33
4	50	33,33
5	75	33,33

Tabel 1 menunjukkan eksplan biji utuh persentasenya lebih tinggi dibandingkan biji utuh. Pemberian BAP menurunkan persentase pembentukan tunas, baik pada biji utuh maupun kotiledon. Dari hasil tersebut menunjukkan, persentase pembentukan tunas tertinggi pada eksplan biji utuh dengan tanpa pemberian BAP pada medium MS. Biji memiliki berbagai hormon endogen seperti auksin, sitokinin, giberelin yang mencukupi untuk pertumbuhan dan morfogenesis biji tersebut sehingga pemberian BAP eksogen tidak mempengaruhi bahkan dapat menghambat pertumbuhan eksplan tersebut.

Waktu terbentuk Tunas, Jumlah Tunas, Tinggi Tunas, Jumlah Daun

Dari hasil ANOVA terhadap Waktu terbentuk Tunas, Jumlah Tunas, Tinggi Tunas, dan Jumlah Daun menunjukkan, tidak terdapat interaksi antara tipe eksplan dan perlakuan BAP. Tipe eksplan berpengaruh nyata terhadap semua parameter, kecuali jumlah daun per tunas. Rerata dan hasil uji lanjut terlihat pada tabel 2. Perlakuan pemberian BAP hanya berpengaruh terhadap parameter tinggi tunas.

Tabel 2. Waktu terbentuk tunas (HST), Jumlah tunas (buah), Tinggi tunas (cm), Jumlah daun (buah) pada induksi jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.) 'Kampar' dengan pemberian BAP (*Benzil Amino Purine*) secara *in vitro*.

Parameter	Jenis eksplan	Konsentrasi BAP (mg/l)						Rerata
		0	1	2	3	4	5	
Waktu terbentuk tunas (HST)	Biji utuh	16	19	19	16	20	18	18 ^A
	Kotiledon	10	14	15	12	19	14	14 ^B
	Rerata	13 ^a	16,5 ^a	17 ^a	14 ^a	19,5 ^a	16 ^a	16
Jumlah tunas (buah)	Biji utuh	4,08	2,5	2,75	3,08	2,00	2,92	2,89 ^A
	Kotiledon	1,50	1,50	0,75	1,33	1,08	0,75	1,15 ^B
	Rerata	2,79 ^a	2,00 ^a	1,75 ^a	2,21 ^a	1,54 ^a	1,83 ^a	2,02
Tinggi tunas (cm)	Biji utuh	3,34	1,87	1,63	1,89	1,00	1,29	1,84 ^A
	Kotiledon	3,10	1,55	1,04	1,00	0,46	0,42	1,26 ^B
	Rerata	3,22 ^c	1,71 ^b	1,33 ^{ab}	1,45 ^{ab}	0,73 ^a	0,85 ^a	1,55

Jumlah	Biji utuh	2,00	2,50	2,80	3,02	1,55	2,40	2,38 ^A
daun/tunas	Kotiledon	2,30	2,40	2,15	2,44	1,30	1,06	1,94 ^A
(buah)	Rerata	2,15 ^a	2,45 ^a	2,47 ^a	2,73 ^a	1,43 ^a	1,73 ^a	2,16

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) pada uji DMRT.

Dari hasil tabel 2 menunjukkan, eksplan kotiledon lebih cepat membentuk tunas dibandingkan eksplan biji utuh. Namun, jumlah tunas yang terbentuk, tinggi tunas, dan jumlah daun per tunas lebih tinggi pada eksplan biji utuh.

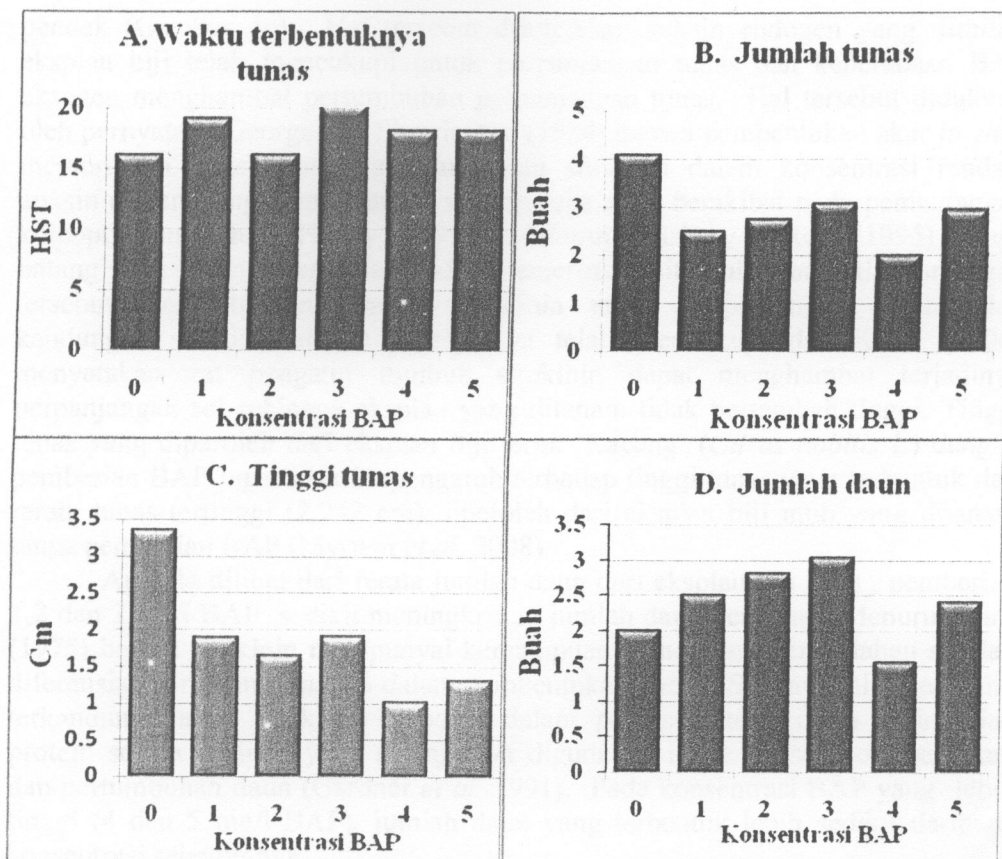
Pada penelitian ini, waktu yang dibutuhkan untuk menginduksi tunas pada eksplan kotiledon lebih cepat daripada eksplan biji utuh. Eksplan kotiledon yang dibelah menjadi dua bagian dan diatur dengan posisi terbentang di atas permukaan media tersebut membantu penyerapan nutrisi dari media kultur dan mempercepat proses kemunculan tunas sedangkan pada biji utuh, kedua bagian kotiledon masih menyatu dan biji harus mengalami proses imbibisi sehingga kedua kotiledon pecah dan pertumbuhan tunas dapat terlihat dengan jelas.

Rerata jumlah tunas (2,89), tinggi tunas (1,84 cm) dari eksplan biji utuh lebih tinggi daripada rerata jumlah tunas dan tinggi tunas dari eksplan kotiledon (1,15 dan 1,26 cm). Penggunaan eksplan sangat mempengaruhi tunas yang terbentuk. Kotiledon pada biji jeruk merupakan sumber nutrisi dan embrio nuselar tetapi aktivitas enzimatis pada kotiledon diatur oleh embrio axis/ zigotik sehingga proses metabolisme pada kotiledon dapat terganggu jika dipisahkan dari embrio axis (Singh *et al.* 1981). Maka tunas yang terbentuk dari eksplan biji utuh lebih banyak daripada eksplan kotiledon.

Pada penelitian ini, eksplan biji yang digunakan adalah biji yang tidak memiliki kulit biji. Pelepasan kulit biji pada penelitian ini bertujuan untuk mempercepat waktu munculnya tunas. Menurut Mendes *et al.* (2008) bahwa percepatan pembedakan planlet karena perlakuan fisik seperti pelepasan kulit biji disebabkan kontak langsung dari embrio dengan media kultur yang menyebabkan biji lebih cepat mengambil air dan nutrisi dari media kultur. Perlakuan pelepasan kulit untuk mempercepat pembentukan planlet juga terbukti dari penelitian beberapa kultivar jeruk antara lain: *Citrus sinensis* 'Hamlin', *C. reshni* Hort. Ex Tan., *Poncirus trifoliata*, *C. paradisi* Macf. x *P. trifoliata* (Niedz PR 2008, Mendes *et al.* 2008).

Pengaruh Pemberian BAP Terhadap Induksi Tunas dari Eksplan Biji Utuh

Berdasarkan ANOVA, perlakuan BAP tidak berpengaruh nyata terhadap waktu terbentuk tunas, jumlah tunas dan jumlah daun. Namun, jika dilihat dari rerata jumlah tunas, pemberian BAP cenderung menurunkan jumlah tunas yang terbentuk. Pemberian BAP juga cenderung memperlambat waktu munculnya tunas, dan menurunkan tinggi tunas, namun pemberian BAPntras sampai konsentrasi 3 mg/l mampu meningkatkan jumlah daun per tunas (gambar 1).



Gambar 1. Pengaruh pemberian BAP pada eksplan biji utuh : A. Waktu terbentuknya tunas, B. Jumlah tunas, C. Tinggi tunas dan D. Jumlah daun

Menurut Miryam *et al.* (2008n), pemberian BAP tidak mempengaruhi jumlah tunas dari eksplan biji *Citrus nobilis* L. var. Kacang dan rerata jumlah tunas tertinggi pada eksplan yang ditanam tanpa pemberian BAP. Tingginya tunas pada eksplan tanpa BAP karena Auksin endogen yang dimiliki eksplan biji telah mencukupi untuk perpanjangan tunas. Penambahan BAP eksogen menurunkan rasio auksin, sehingga menghambat pemanjangan tunas. Menurut Auksin merangsang pemanjangan sel dan juga akan berakibat pada pemanjangan koleoptil dan batang. batang yang sedang memanjang tidak memerlukan sitokinin (Salisbury & Ross (1995). zat pengatur tumbuh sitokinin dapat menghambat terjadinya perpanjangan sel sehingga eksplan yang ditanam tidak bertambah tinggi (Klerk, 2006). Tinggi tunas yang diperoleh dari eksplan biji jeruk 'Kacang' (*Citrus nobilis* L) dengan pemberian BAP juga tidak berpengaruh terhadap tinggi tunas yang terbentuk dan rerata tunas tertinggi (2,242 cm) diperoleh dari eksplan biji utuh yang ditanam tanpa pemberian BAP (Myriam *et al.* 2008).

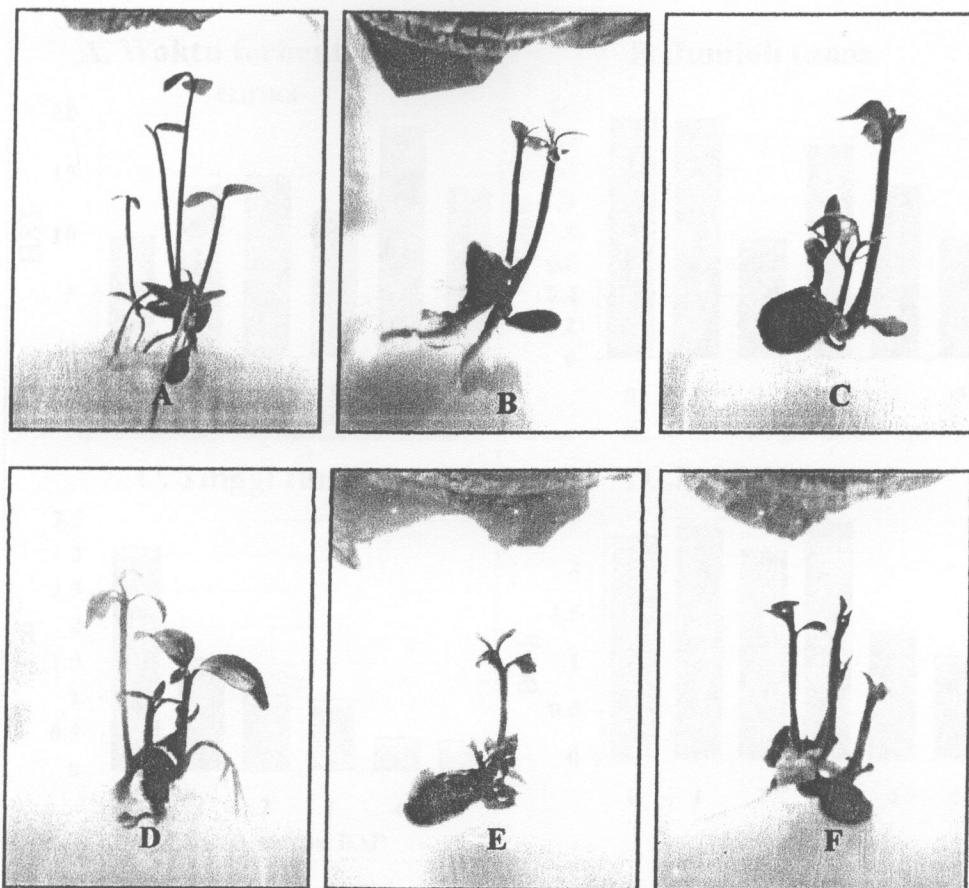
Rerata tinggi tunas paling tinggi diperoleh dari eksplan yang ditanam pada media tanpa pemberian BAP. Tunas yang berasal dari eksplan yang ditanam pada media MS tanpa pemberian BAP lebih tinggi daripada tunas pada perlakuan pemberian BAP bahkan pemberian BAP cenderung menurunkan tinggi tunas sehingga tunas yang berasal dari eksplan yang diberikan perlakuan BAP lebih

pendek (Gambar 1c). Hal tersebut disebabkan auksin endogen yang dimiliki eksplan biji telah mencukupi untuk perpanjangan tunas dan keberadaan BAP eksogen menghambat pertumbuhan perpanjangan tunas. Hal tersebut didukung oleh pernyataan George dan Sherrington (1984) bahwa pembentukan akar *in vitro* memerlukan auksin tanpa sitokinin atau sitokinin dalam konsentrasi rendah, auksin merangsang pemanjangan sel dan juga akan berakibat pada pemanjangan koleoptil dan batang (Heddy S 1996). Menurut Salisbury & Ross (1995) bahwa batang yang sedang memanjang tidak memerlukan sitokinin atau walaupun organ tersebut membutuhkan hormon sitokinin untuk perpanjangan batang dan kandungan sitokinin dalam jaringannya telah mencukupi dan Klerk (2006) menyatakan zat pengatur tumbuh sitokinin dapat menghambat terjadinya perpanjangan sel sehingga eksplan yang ditanam tidak bertambah tinggi. Tinggi tunas yang diperoleh dari eksplan biji jeruk 'Kacang' (*Citrus nobilis* L) dengan pemberian BAP juga tidak berpengaruh terhadap tinggi tunas yang terbentuk dan rerata tunas tertinggi (2,242 cm) diperoleh dari eksplan biji utuh yang ditanam tanpa pemberian BAP (Myriam *et al.* 2008).

Apabila dilihat dari rerata jumlah daun dari eksplan biji utuh, pemberian 1,2 dan 3 mg/l BAP sedikit meningkatkan jumlah daun per tunas. Menurut Hans (1975) bahwa sitokinin mempunyai kemampuan mendorong pembelahan sel dan diferensiasi jaringan terutama dalam pembentukan pucuk. Senyawa nitrogen yang terkandung dalam sitokinin berperan dalam proses sintesis asam amino dan protein secara optimal yang selanjutnya digunakan untuk proses pembentukan dan pertumbuhan daun (Gardner *et al.* 1991). Pada konsentrasi BAP yang lebih tinggi (4 dan 5 mg/l BAP), jumlah daun yang terbentuk lebih sedikit daripada konsentrasi sebelumnya.

Walaupun berdasarkan analisis ragam BAP tidak berpengaruh terhadap jumlah tunas dan jumlah daun yang terbentuk. Namun, BAP mempengaruhi morfologi tunas. Berdasarkan pengamatan secara visual, tunas yang berasal dari eksplan biji yang ditanam tanpa pemberian BAP terlihat lebih tinggi, diameter batang kecil sehingga batang terlihat kurus, akar lebih panjang sedangkan tunas yang berasal dari eksplan yang ditanam pada media MS dengan pemberian 1-5 mg/l BAP, memiliki diameter batang lebih besar sehingga terlihat lebih kokoh, batang dan akar lebih pendek (Gambar 2). Menurut Salisbury dan Ross (1995) bahwa pemberian sitokinin eksogen menyebabkan jaringan batang menjadi lebih tebal karena terjadi pemelaran sel ke arah samping.

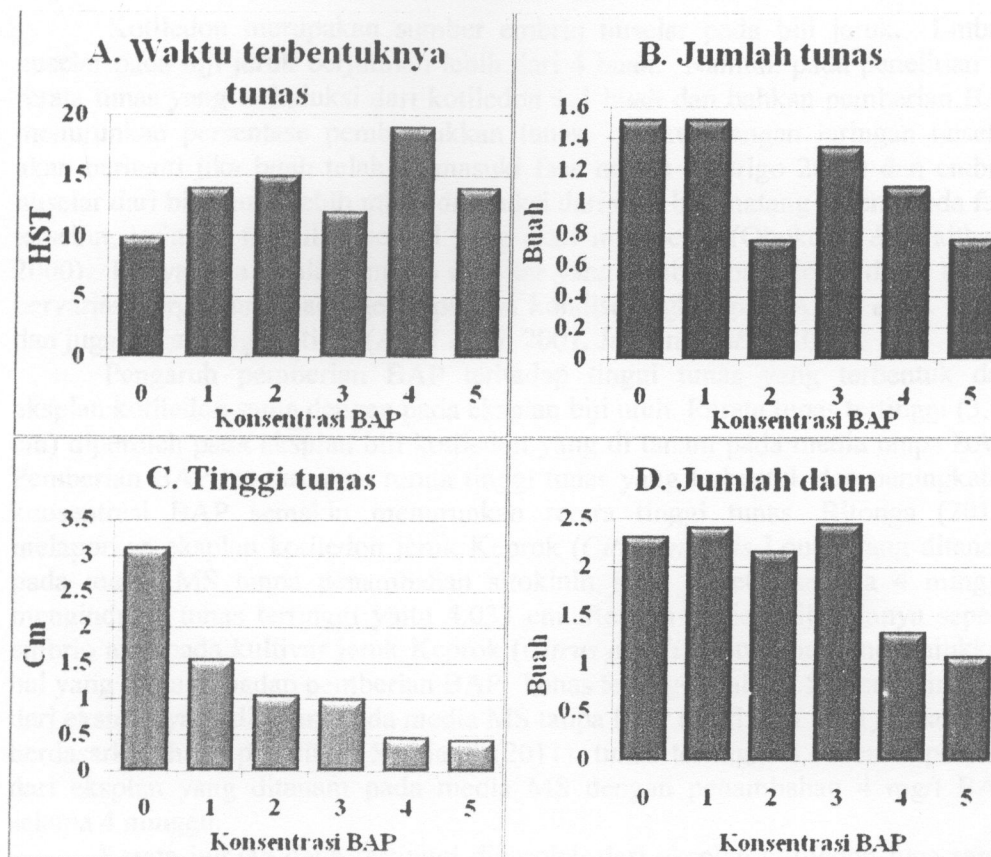
Daun yang berasal dari tunas dengan perlakuan BAP terlihat sedikit lebih hijau (Gambar 2). Tunas yang berasal dari eksplan biji utuh yang di tanam dengan pemberian BAP membentuk daun yang lebih lonjong dan kecil. Hal tersebut terlihat lebih jelas pada perlakuan pemberian 5 mg/l BAP. Hal tersebut menunjukkan bahwa BAP mempengaruhi morfologi daun yang terbentuk. Sitokinin mendorong pembentukan protein pada kloroplas sehingga dapat mendorong pembentukan grana dan meningkatkan laju pembentukan klorofil pada daun (Salisbury dan Ross 1995).



Gambar 2. Kenampakan tunas yang tumbuh dari eksplan biji utuh setelah dikulturkan selama 42 hari (HST) pada perlakuan A: 0 mg/l BAP, B: 1mg/l BAP, C: 2 mg/l BAP, D: 3mg/l BAP, E: 4mg/l BAP, F: 5 mg/l BAP

Pengaruh Pemberian BAP Terhadap Induksi Tunas dari Eksplan Kotiledon

Berdasarkan ANOVA, perlakuan BAP tidak berpengaruh nyata terhadap waktu terbentuk tunas, jumlah tunas dan jumlah daun. Namun, jika dilihat dari rerata jumlah tunas, pemberian BAP cenderung menurunkan jumlah tunas yang terbentuk (kecuali perlakuan 1 mg/l BAP). Pemberian BAP juga cenderung memperlambat waktu munculnya tunas, dan menurunkan tinggi tunas, namun pemberian BAP konsentrasi 3 mg/l sedikit meningkatkan jumlah daun per tunas (gambar 1).



Gambar 3. Pengaruh pemberian BAP pada eksplan kotiledon : A. Waktu terbentuknya tunas, B. Jumlah tunas, C. Tinggi tunas dan D. Jumlah daun

Pada penelitian ini, tunas pada eksplan kotiledon muncul dari bekas letak embrio axis menempel. Hal tersebut disebabkan karena diantara kedua kotiledon terdapat meristem apikal dari embrio axis yang menghasilkan sumbu tunas dan akar (Campbell *et al.* 2003) sehingga tunas hanya terinduksi di bagian bekas embrio axis. Eksplan kotiledon yang di tanam pada media tanpa pemberian BAP lebih cepat menginduksi tunas (10 HST) daripada dengan pemberian BAP (Gambar 4a).

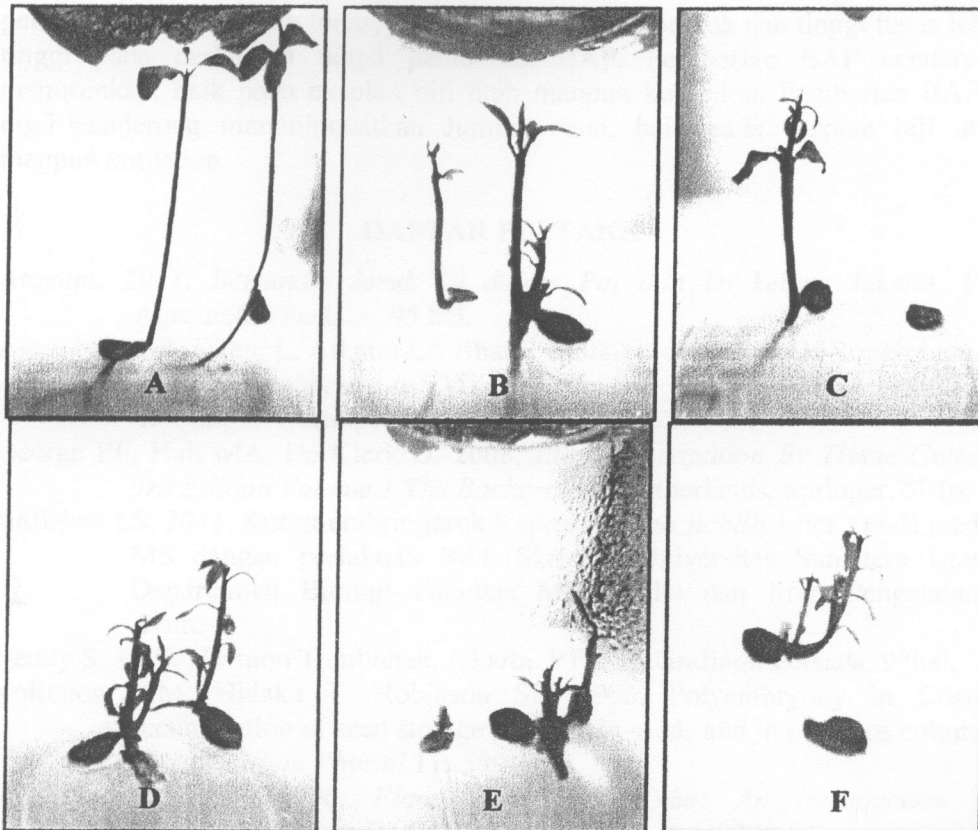
Rerata jumlah tunas pada eksplan kotiledon yang ditanam pada media tanpa dan dengan pemberian 1 mg/l BAP sama tetapi konsentrasi BAP yang lebih tinggi cenderung menurunkan jumlah tunas. Diduga konsentrasi BAP yang diberikan pada eksplan kotiledon tergolong tinggi sehingga pemberian BAP tersebut tidak mempengaruhi banyaknya tunas yang terbentuk. Seprianti (2011) melaporkan bahwa pemberian BAP juga tidak mempengaruhi jumlah tunas yang terbentuk dari eksplan kotiledon jeruk Keprok (*Citrus nobilis* Lour.) yang dikultur selama 4 minggu bahkan rerata jumlah tunas (1,50) yang terinduksi dari eksplan kotiledon tanpa BAP sama dengan rerata jumlah tunas pada penelitian ini. Ritonga (2011) juga melaporkan bahwa sitokinin jenis Kinetin juga tidak mempengaruhi jumlah tunas yang terinduksi dari eksplan kotiledon bahkan jumlah tunas tertinggi (1,167) tanpa Kinetin tidak jauh berbeda dibandingkan dengan jumlah tunas pada penelitian ini.

Kotiledon merupakan sumber embrio nuselar pada biji jeruk. Embrio nuselar pada biji jeruk berjumlah lebih dari 4 buah. Namun, pada penelitian ini rerata tunas yang terinduksi dari kotiledon ± 1 buah dan bahkan pemberian BAP menurunkan persentase pembentukan tunas. Perkembangan jaringan nuselar akan berhenti jika buah telah memasuki fase masak (Merigo 2011) dan embrio nuselar dari biji muda lebih muda diinduksi daripada biji matang karena pada fase tersebut, jaringan memiliki sel-sel yang aktif membelah (Obukosia & Waithaka 2000). Banyaknya jumlah embrio nusellar yang tumbuh pada jeruk dapat timbul bervariasi tergantung pada genotipe dan kondisi lingkungan (Aleza *et al.* 2010) dan juga tergantung kultivar (Altaf *et al.* 2001, Jakson *et al.* 2010).

Pengaruh pemberian BAP terhadap tinggi tunas yang terbentuk dari eksplan kotiledon sama dengan pada eksplan biji utuh. Rerata tunas tertinggi (3,10 cm) diperoleh pada eksplan biji kotiledon yang di tanam pada media tanpa BAP. Pemberian BAP menurunkan rerata tinggi tunas yang terbentuk dan peningkatan konsentrasi BAP semakin menurunkan rerata tinggi tunas. Ritonga (2011) melaporkan eksplan kotiledon jeruk Keprok (*Citrus nobilis* Lour.) yang ditanam pada media MS tanpa penambahan sitokinin jenis Kinetin selama 4 minggu menginduksi tunas tertinggi yaitu 4,033 cm. Respon bagian biji lainnya seperti embrio axis pada kultivar jeruk Keprok (*Citrus nobilis* Lour.) juga menunjukkan hal yang sama terhadap pemberian BAP. Tunas tertinggi yaitu 3.533 cm diinduksi dari eksplan yang ditanam pada media MS tanpa BAP (Hafizhah 2011) sedangkan berdasarkan hasil penelitian Seprianti (2011), tunas tertinggi 3.66 cm diperoleh dari eksplan yang ditanam pada media MS dengan penambahan 4 mg/l BAP selama 4 minggu.

Rerata jumlah daun tertinggi diperoleh dari eksplan kotiledon juga sama dengan jumlah tunas pada biji utuh yaitu dengan pemberian 3 mg/l BAP. Namun, peningkatan konsentrasi BAP yang lebih tinggi (4 dan 5 mg/l BAP) menurunkan jumlah daun yang terbentuk (Gambar 4d). Menurut Hans (1975) bahwa sitokinin mempunyai kemampuan mendorong pembelahan sel dan diferensiasi jaringan terutama dalam pembentukan pucuk. Senyawa nitrogen yang terkandung dalam sitokinin berperan dalam proses sintesis asam amino dan protein secara optimal yang selanjutnya digunakan untuk proses pembentukan dan pertumbuhan daun (Gardner *et al.* 1991).

Daun yang berasal dari tunas dengan perlakuan BAP sebagian besar terlihat lebih kecil dan panjang kecuali daun pada eksplan biji dengan perlakuan 3 mg/l BAP (Gambar 4). Daun yang berukuran kecil tersebut terlihat lebih transparan. Diduga pertumbuhan tunas yang tidak normal pada eksplan mengalami gejala vitrifikasi atau hiperhidrisiti. Vitrifikasi atau hiperhidrisiti adalah keadaan ketidaknormalan morfologi serta fungsi fisiologi dari organ dan jaringan tertentu (George *et al.* 2008). Ciri dari vitrifikasi atau hiperhidrisiti adalah batang mengeras dan memendek, daun berbentuk roset, translusen dan mengerut atau menggulung serta ruas batang pendek (Haris *et al.* 2011). Beberapa faktor penyebab vitrifikasi atau hiperhidrisiti adalah tingkat konsentrasi sitokinin yang terlalu tinggi, rendahnya potensi matriks, dan meningkatnya konsentrasi etilen didalam wadah (Zulkarnain 2009).



Gambar 4. Kenampakan tunas yang berasal dari eksplan kotiledon setelah dikulturkan selama 42 hari (HST) pada perlakuan A: 0 mg/l BAP, B: 1mg/l BAP, C: 2 mg/l BAP, D: 3mg/l BAP, E: 4mg/l, F: 5 mg/l BAP

Eksplan biji utuh menunjukkan kemampuan induksi tunas yang lebih baik dari eksplan kotiledon (100 % eksplan membentuk tunas, jumlah tunas lebih banyak). Maka eksplan biji utuh dapat dijadikan sebagai alternative sumber eksplan. Namun untuk tujuan perbanyakan tanaman dengan sifat yang sama dengan induknya, sebaiknya digunakan eksplan kotiledon.). Pada tanaman jeruk, kotiledon merupakan bagian biji yang mengandung embrio nuselar (Koltunow *et al.* 1996; Jajoo 2009) dan hasil perbanyakan jeruk secara *in vitro* menggunakan eksplan kotiledon yang diuji dengan penanda *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) menunjukkan sifat yang sama dengan induknya (Ramkrishna *et al* 2005). Dari haseil penelitian ini, walaupun persentase eksplan kotiledon yang membentuk tunas sedikit lebih rendah dari eksplan biji, namun hamper mendekati 100%, yaitu mencapai 91,67 %. Untuk induksi tunas baik menggunakan eksplan biji utuh maupun kotiledon lebih baik dilakukan dengan tanpa pemberian BAP medium MS.

KESIMPULAN

Persentase pembentukan tunas, jumlah tunas yang terbentuk, dan tinggi tunas lebih tinggi pada eksplan biji utuh dibandingkan kotiledon, namun pembentukan

tunas lebih cepat pada eksplan kotiledon. Pemberian BAP cenderung menurunkan persentase pembentukan tunas, jumlah tunas yang terbentuk dan tinggi tunas lebih tinggi pada perlakuan tanpa pemberian BAP. Pemberian BAP cenderung menurunkan, baik pada eksplan biji utuh maupun kotiledon. Pemberian BAP 3 mg/l cenderung menuningkatkan Jumlah daun, baik pada eksplan biji utuh maupun kotiledon.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2011. *Bertanam Jeruk Di dalam Pot dan Di kebun*. Jakarta. PT. Agromedia Pustaka. 95 hal.
- Altaf, N., A.R. Khan, L. Ali and I.A Bhatti, 2008. Propagation Of Rough Lemon (*Citrus Jambheri* Lush.)Through *Invitro* Culture And Adventitious Rooting In Cuttings. *EJEAFChe*, 7 (11):3326-3333
- George EF, Hall MA, De Klerk G. 2008. *Plant Propagation By Tissue Culture 3rd Edition Volume 1 The Backgraund*. Netherlands. Springer. 501p.
- Hafizhah LS. 2011. Kultur embrio jeruk Keprok (*Citrus nobilis* Lour.) pada media MS dengan perlakuan BAP.[Skripsi]. Universitas Sumatera Utara. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
- Heddy S. 1996. Hormon Tumbuhan. Jakarta. PT. RajaGrafindo Persada. 97hal.
- Koltunow AM, Hidaka T, Robinson SP. 1996. Polyembryony in *Citrus*, accumulation of seed storage proteins in seeds and in embryos cultured *in vitro*. *Plant Physiol* 11: 599-609.
- Kyte L, Kley J. 1996. *Plant From Test Tube; An Introduction to Micropropagation*. Portland. Timber Press, Inc. 239p.
- Jajoo, A. 2010. *In vitro* Propagation of *Citrus limonia* Osbeck Through Nucellar Embryo Culture. *Journal of Biological Sciences* 2(1): 6-8.
- Koltunow A.M, T. Hidaka', and S.P. Robinson, 1996. Polyembryony in *Citrus*. Accumulation of Seed Storage Proteins in Seeds and in Embryos Cultured in Vitro. *Plant Physiol*. 11: 599-609
- Rahman I.H., B.S. Purwoko, dan I.S. Dewi, 2007. Perbanyakkan Jeruk Besar *Citrus Maxima* (Burm.) Merr. Kultivar Cikoneng Dengan Eksplan Kotiledon Dan Epikotil. Makalah Seminar Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian-Institut Pertanian Bogor
- Samanhudi, Tetrani Sakya Amalia and Rahayu Muji, 2010. *In vitro* Axillary Bud Multiplication of *Citrus Nobilis* Lour. in Indonesia. *Journal of Life Sciences* 4(4): 40-51.
- Setiono dan A.Supriyanto, 2005. Poliembrional dan Seleksi semaian vegetatif pada pembibitan jeruk, Sirkular Teknogi Inovasi Jeruk, 3
- Salisbury F dan Ross C. 1985. *Plant Physiology 3rd ed*. London. Wadsworth Publisher.
- Sarma C, Borthakur A, Singh S, Modi KM, Sen P. 2011. Efficient *in vitro* plant regeneration from cotyledonary explants of *Citrus reticulata* L. Blanco. *Scholars Research* 2(6) : 341-348.
- Seprianti R. 2010. Pertumbuhan eksplan kotiledon jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour.) dengan kultur *in vitro* pada media MS (*Murahige dan Skoog*) dengan BAP (*Benzil Amino Purin*). [Skripsi]. Universitas Sumatera

- Utara. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
- Singh PI. 2002. Micropropagation in *Citrus* – a review. *Agric.Rev* 23(1): 1-13.
- Smith RH. 2000. *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments Second edition*. USA. Academic Press. 231p.
- Zulkarnain H. 2009. *Solusi Perbanyak Tanaman Budidaya Kultur Jaringan Tanaman*. Jambi. Bumi Aksara. 247hal.
- Wahibah, N., S. Fatonah dan Irayuni, 2011. Keanekaragaman Plasma Nutfah Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) di Kabupaten Kampar Propinsi Riau Berdasarkan Karakter Morfologi. Makalah Proseeding, pada SEMIRATA BKS-MIPA wilayah.