

# ORGANOGENESIS TUNAS SECARA LANGSUNG PADA PAMELO (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.)

## Pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) Direct Shoot Organogenesis

Kartika Ning Tyas<sup>1\*</sup>, Slamet Susanto<sup>2</sup>, Iswari Saraswati Dewi<sup>3</sup> dan Nurul Khumaida<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya–LIPI, Jln. Ir. H. Juanda 13 Bogor 16122

<sup>2</sup> Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian IPB  
Jln. Meranti, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

<sup>3</sup> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber daya Genetik Pertanian  
Jln. Tentara Pelajar No 3A, Cimanggu, Bogor 16111

\* Email: kningtyas@gmail.com

Diterima/Received: 19 Februari 2015; Disetujui/Accepted: 31 Agustus 2015

### Abstract

In vitro conservation of pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) would need shoot as explant, because it makes easier in recovery and uses after conservation. Two experiments were conducted to find out an effective method to induce pummelo shoot directly. Leaf, root and epicotyls from in vitro germination of “Adas Duku” pummelo seeds were used as explants in separate experiments. First experiment was conducted in a completely randomized design, using medium combination of MS + BAP (0; 1; 2 ppm) + NAA (0; 0.5; 1 ppm) as treatments. Second experiment was conducted to study the effect of epicotyl explant position in culture to the shoot emergence. The result showed that leaf, root and epicotyl could produce direct shoot organogenesis. Leaf explant (5.5%) produced 1 shoot/explant in MS + BAP 1 ppm in the dark room. Root explant (60%) produced 1 shoot/explant in MS0 in the light room. Epicotyl explant cultured horizontally (30%) produced 1–2 shoot/explants in MS0 in the light room, while in the dark room it produced etiolated shoot in MS0 and MS + BAP 1 ppm. Epicotyl explant cultured vertically in light condition produced 1–3 shoot/explants (100%).

**Keywords:** epicotyl explant, in vitro conservation, leaf explant, root explant, Rutaceae

### Abstrak

Konservasi *in vitro* pamelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) memerlukan tunas *in vitro* sebagai eksplan. Tunas *in vitro* diperlukan dalam konservasi untuk mempermudah pemulihan dan penggunaannya setelah konservasi. Dua percobaan dilakukan untuk mendapatkan eksplan dan media yang efektif untuk memperoleh tunas *in vitro* pamelo secara langsung. Eksplan daun, akar dan epikotil diperoleh dari kecambah *in vitro* pamelo ‘Adas Duku’. Percobaan pertama dilakukan untuk mendapatkan media mengandung sitokinin dan auksin yang efektif dalam menginduksi tunas adventif. Percobaan disusun dengan rancangan acak lengkap. Media MS mengandung kombinasi BAP (0; 1; 2 ppm) dan NAA (0; 0,5; 1 ppm) digunakan sebagai perlakuan. Percobaan kedua dilakukan pada eksplan epikotil pamelo untuk mengetahui pengaruh posisi kultur pada pembentukan tunas. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tunas dapat terbentuk secara langsung pada eksplan daun, akar dan epikotil. Eksplan daun hanya berespon di ruang gelap, yaitu sebanyak 5,55% dapat membentuk 1 tunas/eksplan di

media MS + BAP 1 ppm. Eksplan akar hanya berespon di ruang terang, yaitu sebanyak 60% dapat membentuk 1 tunas/eksplan di media MS0. Eksplan epikotil yang dikultur horisontal dapat membentuk tunas secara langsung di ruang terang pada media MS0, yaitu sebanyak 30% dapat membentuk 1–2 tunas/eksplan, sedangkan di ruang gelap tunas terbentuk secara langsung di media MS0 dan MS + BAP 1 ppm, namun dengan penampilan tunas yang lemah karena etiologi. Epikotil yang dikultur secara vertikal di ruang terang sebanyak 100% dapat menghasilkan 1–3 tunas/eksplan.

**Keywords:** eksplan akar, eksplan daun, eksplan epikotil, konservasi *in vitro*, Rutaceae

## PENDAHULUAN

Indonesia memiliki beragam pamelu atau jeruk besar (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) yang potensial untuk dikembangkan karena mengandung vitamin C dan antioksidan yang tinggi, dan beberapa diantaranya tidak berbiji. Namun, beberapa kultivar belum ditangani dengan baik (Susanto *et al.*, 2013). Plasma nutfah pamelu yang beragam tersebut perlu dijaga kelestariannya, antara lain melalui konservasi eks-situ secara *in vitro*.

Konservasi *in vitro* pamelu memerlukan ketersediaan tunas *in vitro* sebagai sumber eksplan yang harus diperoleh melalui organogenesis secara langsung. Pembentukan tunas secara langsung tanpa melalui pembentukan kalus menghasilkan perubahan genetik yang relatif kecil (Trigiano & Gray, 2005). Tunas digunakan sebagai sumber eksplan karena mudah dipulihkan dan digunakan setelah perlakuan konservasi (Botau *et al.*, 2005).

Organogenesis dapat dilakukan pada sel-sel yang bersifat meristematis dan kompeten, yaitu sel-sel yang mampu memberikan tanggapan terhadap sinyal lingkungan atau hormonal sehingga berakhir dengan terbentuknya organ. Respon tersebut bergantung pada fase dari siklus sel tersebut yaitu fase G1 (Trigiano & Gray, 2005). Gahan (2007) menyebutkan bahwa terdapat dua faktor yang mempengaruhi kemampuan sel untuk melakukan organogenesis yaitu (1) tingkat diferensiasi dan spesialisasi dan (2) pengaruh jaringan di dekatnya terhadap ekspresi gen pada sel tersebut. Pengaturan inisiasi dan perkembangan tunas dan akar serta stimulasi pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan di media juga dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh (Beyl, 2005).

Auksin dan sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang sering ditambahkan dalam media untuk induksi organogenesis. Auksin dalam pertumbuhan tanaman berperan antara lain dalam inisiasi akar, pertumbuhan batang, diferensiasi jaringan vaskuler dan menghambat proses senesen pada daun (Srivastava, 2002). Sitokinin berperan antara lain dalam pembentukan tunas adventif, multiplikasi tunas aksiler dan penghilang pengaruh dominasi apikal (Davies, 2004). Nisbah auksin sitokinin yang tinggi akan merangsang pembentukan akar adventif, pada nisbah sedang akan menginduksi pembentukan akar adventif dari kalus dan inisiasi kalus pada tumbuhan dikotil, sedangkan nisbah yang rendah akan menginduksi pembentukan tunas adventif dan produksi tunas aksiler pada kultur tunas (Gaba, 2005).

Penelitian organogenesis pada beberapa spesies jeruk untuk mendapatkan jenis eksplan dan media yang terbaik antara lain telah dilakukan melalui hipokotil *C. halimii* dengan media BA 2,2–11,1  $\mu$ M dan NAA 2,7  $\mu$ M (Normah *et al.*, 1997); ruas *C. sinensis* (L.) Osbeck dengan media BAP (1; 2; 3 ppm) dan NAA 0,5 ppm (Silva *et al.*, 2006), namun belum dilakukan pada pamelu. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan eksplan dan media yang efektif dalam menginduksi tunas melalui organogenesis langsung pada pamelu (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.).

## BAHAN DAN METODE

Percobaan dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan I Departemen Agronomi dan Hortikultura (AGH) Fakultas Pertanian IPB bulan Juni 2010 sampai dengan Juni 2011. Peralatan yang digunakan

merupakan peralatan standar untuk penelitian kultur jaringan. Pengamatan histologi dengan mengamati irisan segar pembentukan tunas pada eksplan daun dan epikotil dilakukan di laboratorium mikroteknik AGH IPB menggunakan mikroskop Olympus DX51 yang dihubungkan ke kamera Olympus DP25.

Media dasar yang digunakan dalam kultur adalah media MS (Murashige & Skoog, 1962) yang ditambah sukrosa 3%. Bahan tanaman yang digunakan sebagai sumber penghasil eksplan adalah kecambah *in vitro* pamelu 'Adas Duku' (Tyas *et al.*, 2011). Pamelu ini berasal dari Magetan, Jawa Timur. 'Adas Duku' jarang ditanam oleh petani karena buahnya tidak dapat dibiarkan di pohon setelah masak fisiologis untuk menunggu harga yang menguntungkan petani seperti halnya pamelu 'Nambangan' yang ditanam secara luas oleh petani. Adas duku memiliki bentuk buah seperti buah duku, daging buah berwarna merah dan kandungan flavonoid naringinnya lebih rendah dibandingkan dengan 'Nambangan' (Rahayu *et al.*, 2012), sehingga rasa buahnya tidak begitu getir.

#### **Organogenesis pada eksplan daun, akar dan epikotil pamelu**

Percobaan dilakukan di ruang gelap dan ruang terang dengan lama penyinaran 24 jam menggunakan lampu neon 18 watt. Intensitas cahaya yang diterima kultur 237–620 lux, yang diukur menggunakan Luxtron 4 in 1. Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap satu faktor, yaitu media MS yang mengandung kombinasi sitokinin (BAP: 6-Benzylaminopurine) dan auksin (NAA: 1-Naphthaleneacetic acid). Media yang digunakan terdiri atas sembilan kombinasi, yaitu MS0, MS + BAP 1 ppm, MS + BAP 2 ppm, MS + BAP 1 ppm + NAA 0,5 ppm, MS + BAP 1 ppm + NAA 1 ppm, MS + BAP 2 ppm + NAA 0,5 ppm, MS + BAP 2 ppm + NAA 1 ppm, MS + NAA 0,5 ppm dan MS + NAA 1 ppm.

Eksplan daun yang digunakan merupakan tiga daun pertama dari atas yang dipotong menjadi dua secara melintang, kemudian ditanam dengan posisi permukaan atas daun menyentuh media (*adaxial*). Setiap botol berisi enam eksplan daun. Masing-

masing perlakuan diulang tiga kali. Botol kultur diinkubasi pada suhu 20°C. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama dua bulan. Parameter yang diamati adalah waktu munculnya organ, macam organ yang terbentuk, panjang organ yang terbentuk serta total eksplan yang membentuk organ pada akhir pengamatan dan analisis histologi.

Eksplan akar berasal dari akar kecambah *in vitro* biji pamelu 'Adas Duku' berumur tiga minggu. Akar dipotong sepanjang 0,5 cm kemudian ditanam horisontal dalam media. Setiap botol berisi sepuluh eksplan akar. Masing-masing perlakuan diulang lima kali. Botol kultur diinkubasikan di ruang kultur pada suhu 20°C. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama empat bulan. Parameter yang diamati adalah waktu tumbuh tunas, jumlah tunas, dan total eksplan yang membentuk tunas.

Eksplan epikotil berasal dari kecambah pamelu yang telah disubkultur pada media MS0. Epikotil dipotong sepanjang 0,5 cm dan ditanam horisontal pada media. Setiap botol berisi sepuluh eksplan epikotil. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Botol kultur diinkubasikan pada suhu 29°C. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama dua bulan. Parameter yang diamati adalah waktu munculnya organ, macam organ yang terbentuk, dan total eksplan yang membentuk organ pada akhir pengamatan.

#### **Pengaruh posisi tanam pada kultur eksplan epikotil pamelu**

Sumber eksplan pada percobaan ini adalah epikotil yang berasal dari kecambah pamelu yang telah disubkultur pada media MS0 selama empat bulan. Epikotil dipotong sepanjang 0,5 cm, kemudian dikultur secara horisontal dan vertikal di media yang terpilih dari percobaan sebelumnya (MS0). Epikotil yang dikultur horisontal ditanam 10 eksplan per botol, sedangkan epikotil yang dikultur secara vertikal berisi lima eksplan, sehingga dua botol kultur dihitung sebagai satu ulangan. Masing-masing perlakuan diulang lima kali. Inkubasi kultur dilakukan sesuai dengan cara inkubasi terbaik dari percobaan sebelumnya. Pengamatan dilakukan setiap minggu

selama dua bulan. Peubah yang diamati adalah waktu munculnya tunas dan persentase eksplan yang membentuk tunas pada akhir pengamatan.

### Analisis Data

Analisis data hanya dilakukan pada perlakuan yang memberikan respon menggunakan uji F pada taraf 5%. Bila hasilnya menunjukkan pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Organogenesis pada eksplan daun

Eksplan daun pamelor hanya berespon di ruang gelap dengan membentuk akar, kalus dan tunas, namun tidak semua media perlakuan berespon (Tabel 1). Hal ini karena pembentukan akar, tunas dan kalus berhubungan dengan nisbah auksin dan sitokinin. Tunas terbentuk pada nisbah auksin dan sitokinin yang rendah dan sebaliknya dapat menginduksi pembentukan akar, sedangkan nisbah auksin dan sitokinin yang sedang menyebabkan pembentukan kalus (Gaba, 2005).

Akar adventif pada eksplan daun pamelor dapat terbentuk secara langsung dan tidak langsung

(Tabel 1). Proses pembentukan akar terjadi melalui empat tahap, yaitu pembentukan lokus meristematis dari dediferensiasi satu atau beberapa sel, multiplikasi sel menjadi sekumpulan sel, pembelahan sekumpulan sel yang terletak sebidang secara bersamaan membentuk meristem akar dan pemanjangan sel pada bagian pangkal meristem akar sehingga akar yang terbentuk mulai muncul (Schwarz *et al.*, 2005). Akar adventif yang terbentuk secara langsung mulai muncul pada 7–45 hari setelah kultur (HSK) (Tabel 1, Gambar 1a), sedangkan akar adventif yang terbentuk secara tidak langsung muncul pada 23 HSK (Tabel 1, Gambar 1b).

Akar terbentuk secara langsung pada sel mesofil daun (Gambar 2), yang diduga berasal dari sel-sel prokambial yang terinduksi oleh pengaruh nisbah auksin dan sitokinin pada jaringan pembuluh (Rose *et al.*, 2006). Daun pamelor dapat membentuk akar adventif secara langsung pada media MS0. Hal ini kemungkinan karena kandungan auksin endogen pada eksplan daun tersebut cukup tinggi untuk inisiasi dan pembentukan akar. Sebagaimana diketahui, daun merupakan salah satu tempat pembentukan auksin (Davies, 2004) yang berperan dalam inisiasi akar (Srivastava, 2002).

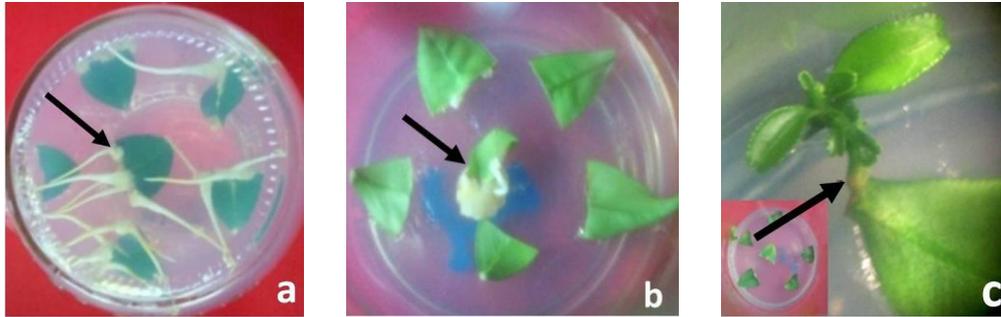
**Tabel 1.** Organogenesis pada eksplan daun pamelor 'Adas Duku' 60 hari setelah kultur (HSK)

Media berespon		Organ yang terbentuk	Waktu munculnya organ (HSK)	Total eksplan berespon	Panjang organ 60 HSK (cm)
BAP (ppm)	NAA (ppm)				
0	0	Akar	45	2 b	0,50 <sup>b</sup>
0	0,5	Akar	8	13a	1,35 <sup>a</sup>
0	1	Akar	7	13a	0,95 <sup>a</sup>
1	0	Tunas	40	1	0,20
1	1	Akar*	23	1b	0,20 <sup>b</sup>

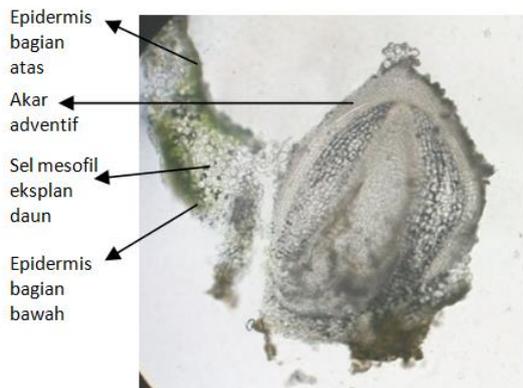
Keterangan : Percobaan ini menggunakan tiga ulangan dengan enam eksplan/botol.

\* = pembentukan akar melalui kalus.

Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% DMRT. DMRT hanya dilakukan pada perlakuan yang memberikan respon membentuk akar adventif.



**Gambar 1.** Organogenesis pada daun pamelu yang diinkubasi di ruang gelap, a. Tampak bawah dari eksplan daun dengan akar yang tumbuh pada media MS + NAA 0,5 ppm dan MS + NAA 1 ppm, b. Kalus dan akar tumbuh pada media MS + BAP 1 ppm + NAA 1 ppm, c. Tunas tumbuh pada media MS + 1 ppm BAP. Tanda panah menunjukkan organ yang terbentuk.



**Gambar 2.** Irisan melintang eksplan daun pamelu ‘Adas Duku’ yang membentuk akar adventif. Akar adventif terbentuk dari sel mesofil (pembesaran 4x).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pemberian auksin eksogen (NAA) dapat mempercepat induksi akar pada eksplan daun di media MS + NAA 1 ppm dan MS + NAA 0,5 ppm (Tabel 1). Rataan waktu yang diperlukan untuk pembentukan akar pada media yang diperkaya dengan auksin tersebut adalah 7–8 HSK. Hal ini sesuai dengan pendapat yang menyatakan bahwa proses determinasi pembentukan akar dari eksplan daun pada media yang kaya auksin memerlukan waktu sekitar tujuh hari (Yamaguchi *et al.*, 2004, Imin *et al.*, 2007). Hasil penelitian serupa dijumpai pada tanaman *Nicotiana tabacum* cv Petite Havana SR1 (Yamaguchi *et al.*, 2004), *Medicago trunculata* (Imin *et al.*, 2007) dan *Rauwolfia serpentina* L. (Pandey *et al.*, 2010).

Pembentukan akar pada media MS + BAP 1 ppm + NAA 1 ppm terjadi secara tidak langsung, yaitu didahului dengan pembentukan kalus pada 10 HSK sedangkan akar mulai muncul pada 23 HSK (Gambar 1b). Pemberian auksin dan sitokinin dalam jumlah yang sama pada media tidak tepat untuk pembentukan akar secara langsung pada eksplan daun.

Eksplan daun pamelu yang membentuk tunas secara langsung hanya terjadi pada media MS + BAP 1 ppm (Tabel 1). Pemberian sitokinin eksogen (BAP 1 ppm) pada media MS mengubah nisbah auksin dan sitokinin menjadi rendah, sehingga diduga sesuai untuk pembentukan tunas, karena sitokinin berperan dalam inisiasi tunas (Davies, 2004). Tunas mulai tumbuh pada tulang daun utama pada bagian pangkal daun pada 40 HSK. Setelah 4 BSK, tinggi tunas 0,2 cm (Gambar 1c). Namun demikian, pemberian sitokinin eksogen juga dapat meningkatkan enzim sitokinin oksidase yang berperan memelihara keseimbangan sitokinin dalam sel tanaman dengan mengoksidasi kelebihan sitokinin bila tidak diperlukan (Staden *et al.*, 2008). Kemungkinan hal ini yang menyebabkan eksplan daun tidak menunjukkan respon pada penambahan sitokinin eksogen yang lebih tinggi (BAP 2 ppm) pada media MS.

#### Organogenesis pada eksplan akar pamelu

Eksplan akar pamelu hanya berespon di ruang terang, dengan membentuk tunas adventif secara

langsung di media MS0 dan MS + BAP 1 ppm (Tabel 2). Kombinasi media lainnya tidak berespon diduga karena perubahan nisbah auksin dan sitokinin pada eksplan setelah dikultur pada media tersebut tidak sesuai untuk pembentukan organ atau kalus.

Eksplan akar dapat membentuk tunas adventif karena akar merupakan salah satu tempat pembentukan sitokinin yang berperan dalam inisiasi tunas (Srivastava, 2002). Pembentukan tunas adventif pada eksplan akar di media MS0 diduga karena sitokinin endogen pada akar cukup tinggi untuk inisiasi dan pertumbuhan tunas. Eksplan akar berespon sebanyak 60%, membentuk 1 tunas per eksplan pada 20 HSK. Tunas adventif memiliki tinggi 0,8 cm pada 4 BSK, dengan bentuk daun dan batang yang normal (Tabel 2, Gambar 3a).

Eksplan akar yang berespon membentuk tunas pada media MS + BAP 1 ppm sebanyak 15%. Tunas

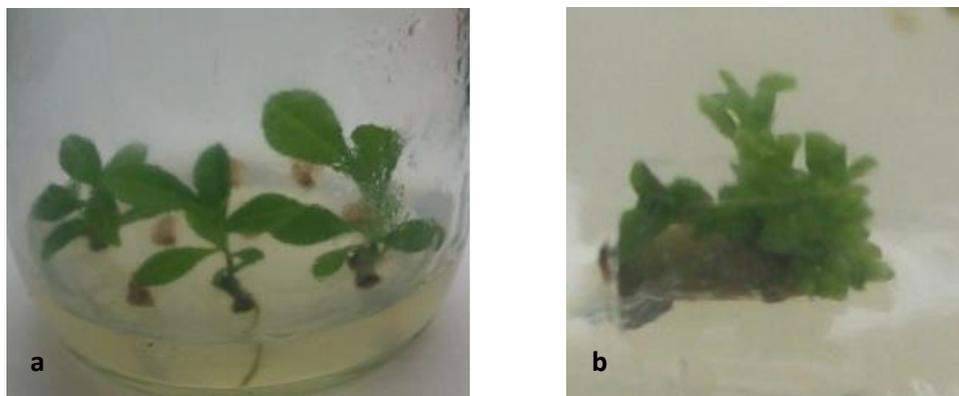
mulai tumbuh pada 35 HSK, dengan rata-rata 3,5 tunas per eksplan. Tunas yang terbentuk bersifat sukulen, banyak mengandung air, lemah dan berukuran kecil (tinggi 0,1 cm pada 4 BSK), dengan ruas sangat pendek sehingga membentuk roset (Gambar 3b). Ukuran tunas yang kecil kemungkinan disebabkan efek kompetisi antar tunas dengan cara tunas yang terbentuk paling awal memberi sinyal ke lingkungan yang berpengaruh menghambat pertumbuhan tunas-tunas yang terbentuk berikutnya, efek penghambatan akan semakin meningkat dengan membesarnya tunas (Gahan & George, 2008).

Eksplan akar tidak efisien bila digunakan sebagai sumber tunas yang akan digunakan untuk percobaan konservasi. Hal ini disebabkan karena inisiasi tunas pada eksplan akar memerlukan waktu 20 hari dan hanya menghasilkan 1 tunas per eksplan dengan tingkat keberhasilan 60%.

**Tabel 2.** Respon eksplan akar pamelo ‘Adas Duku’ pada empat bulan setelah kultur

Parameter	Media yang memberikan respon	
	MS0	MS+BAP 1 ppm
Organ yang terbentuk	Tunas	Tunas
Inisiasi tunas (HSK)	20 ± 1,4	35 ± 2,0
Rerata eksplan berespon/ulangan	6 ± 0,7	1,5 ± 0,7
Rerata jumlah tunas/eksplan	1 ± 0,0	3,5 ± 0,7
Tinggi tunas (cm)	0,8 ± 0,1	0,1 ± 0,0
Jumlah daun per eksplan	2,8 ± 0,8	6,5 ± 0,7

Keterangan: Percobaan ini menggunakan lima ulangan dengan sepuluh eksplan/botol di ruang terang



**Gambar 3.** Tunas adventif yang tumbuh pada eksplan akar pamelo yang diinkubasi di ruang terang 4 BSK, a. Media MS0, b. Media MS + BAP 1 ppm (Ukuran eksplan 0,5 cm).

### Organogenesis pada eksplan epikotil pamelo

Eksplan epikotil pamelo di ruang terang hanya berespon pada media MS0 (sebanyak 30%) dengan membentuk 1–2 tunas per eksplan secara langsung. Tunas memiliki bentuk dan pertumbuhan yang normal dan berwarna hijau. Sitokinin endogen pada epikotil pamelo diduga cukup tinggi untuk inisiasi dan pertumbuhan tunas. Penambahan auksin dan sitokinin secara eksogen tidak berpengaruh karena nisbah auksin dan sitokinin yang terjadi tidak sesuai untuk pembentukan tunas atau kalus.

Eksplan epikotil di ruang gelap dapat membentuk tunas secara langsung dan tidak langsung. Eksplan epikotil yang dapat membentuk tunas secara langsung diperoleh pada media MS0 dan media MS + BAP 1 ppm (Tabel 3, Gambar 4). Eksplan epikotil membentuk tunas secara tidak langsung melalui kalus pada semua media MS yang mengandung BAP, kecuali MS + BAP 1 ppm (Gambar 4). Eksplan epikotil tidak menunjukkan respon pada media MS + NAA 0,5 ppm dan MS + NAA 1 ppm.

Eksplan epikotil yang menghasilkan tunas secara tidak langsung pada kombinasi media MS +

BAP + NAA lebih banyak dibandingkan MS + BAP tanpa NAA. Tunas terbanyak dijumpai pada media MS + BAP 2 ppm + NAA 0,5 ppm, peningkatan konsentrasi NAA menjadi 1 ppm menurunkan jumlah tunas pada eksplan (Tabel 3).

Tunas yang terbentuk secara langsung di ruang gelap mengalami etiolasi dan berwarna putih, sedangkan tunas yang terbentuk secara tidak langsung pada media yang mengandung sitokinin (BAP) selain etiolasi juga mengalami malformasi. Tunas berwarna putih disebabkan enzim *NADPH:Prothochlorophyllide (photo) oxidoreductase* tidak aktif dalam keadaan tanpa cahaya sehingga tahap awal pembentukan klorofil yaitu perubahan *prothochlorophyllide* menjadi *chlorophyllide* tidak dapat berlangsung (Sandmann & Scherr, 1998). Tunas yang terbentuk dari eksplan epikotil di tempat terang memiliki pertumbuhan dan bentuk normal, berwarna hijau tua, dan lebih vigor dibandingkan dengan tunas yang terbentuk di ruang gelap. Dengan demikian untuk percobaan yang mempelajari posisi eksplan terhadap pertumbuhan tunas adventif digunakan eksplan epikotil yang dikultur di ruang terang.

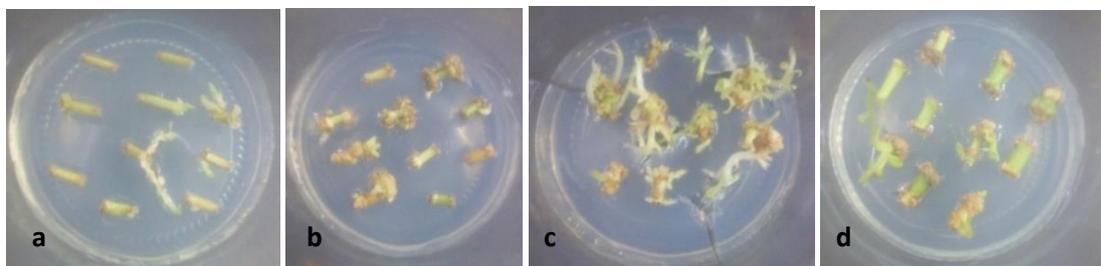
**Tabel 3.** Pembentukan tunas pada eksplan epikotil pamelo 'Adas Duku' dua bulan setelah kultur di ruang gelap.

Media MS		Waktu munculnya organ (HSK)	Rerata eksplan berespon	Rerata Jumlah tunas
BAP (ppm)	NAA (ppm)			
0	0	30	0,7d	0,7d
1	0	25	2,0c	2,0cd
1	0,5	17*	2,0c	2,6bc
1	1	16*	7,0b	3,6 b
2	0	15*	10,0a	3,3bc
2	0,5	15*	10,0a	13,3a
2	1	16*	9,0a	2,3bc

Keterangan: Percobaan ini menggunakan tiga ulangan dengan 10 eksplan/botol di ruang gelap.

\* = pembentukan tunas melalui kalus.

Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yg sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% DMRT.



**Gambar 4.** Tunas adventif pada eksplan epikotil pamelo yang diinkubasi di ruang gelap. a. Tunas pada media MS + BAP 1 ppm, b. Kalus dan tunas pada media MS + BAP 1ppm + NAA 0,5 ppm, c. Kalus dan tunas pada media MS + BAP 2 ppm + NAA 0,5 ppm, d. Tunas pada media MS + BAP 2 ppm + NAA 1 ppm.

**Pengaruh posisi tanam pada kultur eksplan epikotil pamelo**

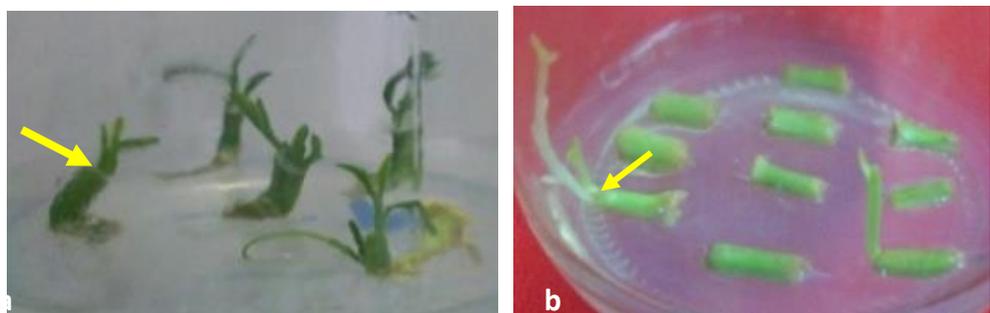
Posisi eksplan mempengaruhi waktu munculnya tunas adventif. Pada penelitian ini, tampak eksplan epikotil pamelo yang dikultur secara vertikal pada media MS0 mulai bertunas pada 14 HSK, dengan menghasilkan 1–3 tunas/eksplan. Pada 2 BSK 100% eksplan yang dikultur secara vertikal telah menghasilkan tunas (Tabel 4). Sekitar 30%

eksplan yang dikultur secara horisontal menghasilkan 1–2 tunas/eksplan (Tabel 4, Gambar 5). Dengan demikian, posisi eksplan yang ditanam secara vertikal lebih cepat menghasilkan tunas adventif dibandingkan eksplan yang ditanam secara horisontal. Kemungkinan hal ini berhubungan dengan transport auksin, penyerapan hara dan air pada planlet yang lebih efisien, yang akan berpengaruh terhadap pembentukan tunas pada eksplan (Peer et al., 2011).

**Tabel 4.** Pengaruh posisi eksplan terhadap pembentukan tunas pada eksplan epikotil pamelo ‘Adas Duku’ di media MS0 dua bulan setelah kultur

Peubah	Posisi eksplan	
	Vertikal	Horisontal
Organ yang terbentuk	Tunas	Tunas
Inisiasi tunas (HSK)	14,0 ± 0,7	32,0 ± 1,2
Rerata eksplan berespon	10,0 ± 0,0	3,0 ± 0,7
Jumlah tunas per ulangan	13,0 ± 1,2	3,0 ± 0,7
Tinggi tunas (cm)	0,7 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Jumlah daun per tunas	2,0 ± 0,7	1,6 ± 0,5

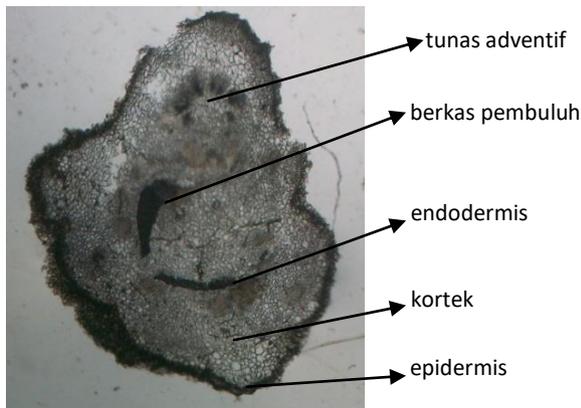
Keterangan: Percobaan menggunakan lima ulangan, masing-masing terdiri dari sepuluh eksplan.



**Gambar 5.** Tunas adventif pada eksplan epikotil pamelo yang diinkubasi di ruang terang, (a.) posisi eksplan vertikal pada 1 BSK, (b.) posisi eksplan horisontal pada 2 BSK. Tanda panah menunjukkan tempat terbentuknya tunas adventif.

Tunas adventif yang ditanam secara vertikal tumbuh dari bagian ujung potongan epikotil, demikian juga dengan epikotil yang ditanam horisontal (Gambar 5). Hal ini berhubungan dengan polaritas yang disebabkan pergerakan zat pengatur tumbuh dalam jaringan tanaman terutama transpor polar auksin. Secara alami auksin ditranspor secara basipetal pada batang dan akropetal pada akar (Wattimena *et al.*, 1992) yang berpengaruh pada nisbah auksin sitokinin pada bagian ujung.

Tunas adventif pada eksplan epikotil terbentuk secara langsung tanpa melalui pembentukan kalus. Tunas diduga berasal dari sel-sel kambium bukan dari sel berkas pembuluh (Gambar 6). Sel-sel kambium merupakan sel-sel yang bersifat meristematik (Trigiano & Gray, 2005), sedangkan sel berkas pembuluh, inti selnya menghilang pada saat terjadi diferensiasi, sehingga sel berkas pembuluh tidak dapat ber-rediferensiasi kembali (Gahan, 2007) untuk membentuk tunas.



**Gambar 6.** Irisan melintang pada eksplan epikotil menunjukkan tunas adventif tumbuh secara langsung dari kambium di antara berkas pembuluh.

## KESIMPULAN

Tunas adventif pada pamelu dapat diperoleh melalui organogenesis langsung dari eksplan daun, akar dan epikotil. Media terbaik untuk menginduksi tunas secara langsung pada eksplan epikotil dan akar pamelu adalah media MS0, sedangkan pada eksplan

daun pamelu adalah media MS + BAP 1 ppm. Berdasarkan waktu munculnya tunas, eksplan epikotil lebih efisien dibandingkan eksplan akar. Penggunaan eksplan epikotil yang dikultur secara vertikal pada media MS0 di ruang terang merupakan cara yang paling efisien dan efektif untuk mendapatkan tunas secara langsung.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas dana yang telah diberikan untuk penelitian ini oleh Kementerian Pertanian melalui Tim Penelitian KKP3T 2009: Karakterisasi dan Konservasi *Ex-situ* Sumberdaya Genetik Pamelu (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) Asli Indonesia dan Kementerian Negara Riset dan Teknologi melalui Tim Penelitian Program Insentif Riset Terapan 2010: Perbaikan Potensi Pembentukan Buah Jeruk Pamelu Tanpa Biji untuk Meningkatkan Daya Saing Buah Nasional.

## DAFTAR PUSTAKA

- Beyl, C.A. 2005. Getting started with tissue culture: media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In Trigiano, R.N. dan D.J. Gray (eds.) *Plant development and biotechnology*. CRC Press. New York. P. 11–37.
- Botau, D., M. Danci & O. Danci. 2005. In vitro medium term preservation of different romanian landraces. *Acta Biologica Szegediensis* 499: 41–42.
- Davies, P.J. 2004. The plant hormones : Their nature, occurrence, and functions. In Davies P.J. (ed.). *Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action!* Kluwer Academic Publisher. London. P. 1–35.
- Gaba, V.P. 2005. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. In Trigiano, R.N dan D.J. Gray (eds.). *Plant development and biotechnology*. CRC Press. New York. P. 87–99.

- Gahan, P.B. 2007. Totipotency and the cell cycle. In Jain, S.M. & H. Häggman (eds.). *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Springer. The Netherlands. P. 3–14.
- Gahan, P.B. & E.F. George. 2008. Adventitious regeneration. In George E.F., M.A. Hall, & G.J. De Klerk (eds.). *Plant propagation by tissue culture* Vol. I. *The background*. Springer. Dordrecht. P. 355–402.
- Imin, N., M. Nizamidin, T. Wu, & B.G. Rolfe. 2007. Factors involved in root formation in *Medicago trunculata*. *Journal of Experimental Botany* 58: 439–451.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Normah, M.N., S. Hamidah, & F.D. Ghani. 1997. Micropropagation of *Citrus halimii* – an endangered species of South East Asia. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50: 225–227.
- Pandey V.P., E. Cherian, & G. Patani. 2010. Effect of growth regulators and culture conditions on direct root induction of *Rauvolfia serpentina* L. (Apocynaceae) Benth. by leaf explants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 9: 27–34.
- Peer, W.A., J.J. Blakeslee, H. Yang, & A.S. Murphy. 2011. Seven things we think we know about auxin transport. *Molecular Plant* 4: 487–504.
- Rahayu, A., S. Susanto, B.S. Purwoko, & I.S. Dewi. 2012. Karakter morfologi dan kimia kultivar pamelo berbiji dan tanpa biji. *Jurnal Agronomi Indonesia* 40:48–55.
- Rose, R.J., X.D. Wang, K.E. Nolan, & B.G. Rolfe. 2006. Root meristem in *Medicago trunculata* tissue culture arise from vascular-derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene. *Journal of Experimental Botany* 57: 2227–2235.
- Sandmann, G., & H. Scherr. 1998. Chloroplast pigment: chlorophylls and carotenoids. In: Raghavendra (ed). *Photosynthesis a comprehensive treatise*. Cambridge University Press. New York. P. 44–57.
- Schwartz, O.J., A.R. Sharma, & R.M. Beaty. 2005. Propagation from non meristematic tissues: Organogenesis. In: Trigiano, R.N. & D.J. Gray (eds). *Plant development and biotechnology*. CRC Press. New York. P. 159–172.
- Silva, R.P. da, W.A.B. de Almeida, E.S. Souza, & F.A.A.M. Filho. 2006. In vitro organogenesis from adult tissue of ‘Bahia’ Sweet Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Fruit* 61: 367–371.
- Srivastava, L.M. 2002. *Plant growth and development, hormon and environment*. Academic Press. London. 772 p.
- Staden, J. van, E. Zazimalova, & E.F. George. 2008. Plant growth regulator II: Cytokinin, their analogues and antagonists. In: George, E.F., M.A. Hall, & G.J. de Klerk (eds.) *Plant propagation by tissue culture* Vol. I *The background*. Springer. Dordrecht. P. 205–226.
- Susanto, S., A. Rahayu & K.N. Tyas. 2013. *Ragam Pamelo Indonesia*. Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Trigiano, R.N. & D.J. Gray. 2005. A brief introduction to plant anatomy. In: Trigiano, R.N. & D.J. Gray (eds.) *Plant development and biotechnology*. CRC Press. New York. P. 87–99.
- Tyas, K.N., S. Susanto, I.S. Dewi, & N. Khumaida. 2011. *Peningkatan perkecambahan in vitro pamelo (Citrus maxima (Burm.) Merr.)*. Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Hortikultura Indonesia. P. 900–907
- Wattimena, G.A., L.W. Gunawan, N.A. Matjik, E. Syamsudin, N.M.A. Wiendi, & A. Ernawati. 1992. *Bioteknologi tanaman*. PAU IPB, Bogor. 306 p.
- Yamaguchi, M, H. Kato, S. Yoshida, S. Yamamura, H. Uchimiya, & M. Umeda. 2004. Control of in vitro organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences (PNAS)* 100: 8019–8023.