

Induksi Embriogenesis Somatik dari Jaringan Endosperma Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) cv Simadu

*Somatic Embryogenesis Induced from Endosperm Tissues of Tangerine (*Citrus nobilis* Lour.) cv Simadu*

Mia Kosmiatin^{1*}, Agus Purwito², Gustaff Adolf Wattimena², dan Ika Mariska¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar No 3A, Bogor 16111, Indonesia

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
(Bogor Agricultural University), Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 12 April 2013/Disetujui 4 September 2013

ABSTRACT

Triploid plants can be obtained from endosperm tissues through somatic embryogenesis regeneration. This research aimed to obtain somatic embryogenesis regeneration technique of tangerine endosperm. There were 3 experiments conducted in this research: 1) Embryogenic callus induction of tangerine endosperm. Endosperms isolated from fruits that were harvested from mother plants 11-13 weeks after anthesis and cultured on Murashige and Skoog (MS) medium by modified vitamin Morel and Wetmore (MW) which treated by 0.1 mg L⁻¹ biotin, 500 mg L⁻¹ malt extract (ME), 500 mg L⁻¹ Casein hydrolysate (CH), 500 mg L⁻¹ ME + 0.1 mg L⁻¹ biotin, and 500 mg L⁻¹ CH + 0.1 mg L⁻¹ biotin, 2) Maturation and germination of somatic embryos conducted by embryogenic callus cultured on MS medium by vitamin MW modified with addition of ABA, glutamine, and biotin, and 3) Plantlet elongation conducted on MS medium modified by MW vitamin with addition of GA₃ and Kinetin. The best induction medium for embryogenic callus was modified MS enriched with 3 mg L⁻¹ BA and 500 L⁻¹ CH or ME, in succession 84.0 and 80.0%. The best medium for somatic embryos maturation with normal morphological plantlets (54.8%) was modified MS medium without plant growth regulator with higher rate of solidified agent (from 2.5 to 3 g L⁻¹ Phytigel). Plantlets elongation was highly (0.9 cm) occurred on modified MS with enriched of 2.5 mg L⁻¹ GA₃.

Keywords: *Citrus nobilis* (Lour.), endosperm culture, in vitro, Simadu tangerine

ABSTRAK

Tanaman triploid untuk produksi buah tanpa biji dapat dihasilkan dari jaringan endosperma yang diregenerasi secara embriogenesis somatik. Penelitian bertujuan untuk memperoleh teknik regenerasi melalui embriogenesis somatik dari jaringan endosperma jeruk Siam Simadu. Penelitian dilakukan dalam 3 tahap yaitu 1) Induksi pembentukan kalus embriogenik dari jaringan endosperma yang diisolasi dari buah berumur 11-13 minggu setelah antesis pada media Murashige dan Skoog (MS) modifikasi vitamin Morel dan Wetmore (MW) dengan perlakuan penambahan biotin, ekstrak malt (ME), kasein hidrolisat (CH), ME + biotin, dan CH + biotin, 2) Pendewasaan dan perkecambah struktur embrio somatik dengan mengkulturkan kalus embriogenik pada media MS modifikasi vitamin MW dengan perlakuan penambahan ABA, Glutamin, dan biotin, dan 3) Pemanjangan planlet dilakukan pada media MS modifikasi vitamin MW dengan penambahan GA₃ dan Kinetin. Induksi kalus embriogenik terbaik diperoleh dari media MS modifikasi dengan penambahan 3 mg L⁻¹ BA dan 500 mg L⁻¹ CH atau ME berturut-turut 84.0 dan 80.0%. Persentase pendewasaan embrio somatik (ES) dengan morfologi embrio normal terbanyak yaitu 54.8% diperoleh dari media MS modifikasi tanpa zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi pematik ditingkatkan dari 2.5 menjadi 3 g L⁻¹ Phytigel. Pada media yang sama, ES dapat berkecambah secara langsung. Pemanjangan planlet terbaik yaitu 0.9 cm, dilakukan pada media MS modifikasi dengan penambahan 2.5 mg L⁻¹ GA₃.

Kata kunci: *Citrus nobilis* (Lour.), in vitro, jeruk Siam Simadu, kultur endosperma

PENDAHULUAN

Embriogenesis somatik adalah proses regenerasi tanaman melalui pembentukan struktur seperti embrio yang

diinduksi dari sel-sel somatik atau gamet (Dodeman *et al.*, 1997). Embrio somatik secara fisiologi dan morfologi memiliki tahapan perkembangan embrio yang sama dengan embrio zigotik (Deo *et al.*, 2010). Dalam pemuliaan modern, embriogenesis somatik sangat penting karena dapat meregenerasikan satu sel tanaman yang sudah dimanipulasi baik dengan transformasi maupun mutasi menjadi tanaman lengkap, sehingga sel tanaman tersebut dapat diregenerasikan

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: miakosmiatin@yahoo.com

menjadi tanaman lengkap (Manrique-Trujillo *et al.*, 2013; Gray, 2005), dan mengekspresikan perubahannya. Hampir seluruh sel kompeten tanaman dapat diinduksi menjadi sel embriogenik karena sel tanaman memiliki kemampuan totipotensi sel (Mujib *et al.*, 2005). Totipotensi sel adalah kemampuan satu sel atau protoplas tanaman sebagai satu individu untuk membentuk tanaman atau individu yang lengkap (Toonen *et al.*, 1994).

Endosperma merupakan jaringan tanaman yang bersifat triploid, karena berasal dari fertilisasi dua inti polar (♀) dan satu sperma (♂) (Berger, 2003). Endosperma jeruk siam bertipe inti bebas (*nuclear endosperm*), dimana endosperma primer hasil fertilisasi ganda melakukan pembelahan inti tetapi tidak langsung membentuk dinding sel. Selulerisasi sel endosperma berlangsung bertahap sehingga perkembangan sel-sel endosperma tidak seragam. Keberagaman ini juga terjadi karena endosperma berfungsi sebagai *nourishing cell* dan pelindung kehidupan embrio. Pada jeruk Siam Simadu, setelah fertilisasi ganda, sel-sel haploid antipodal tidak terdegradasi dan perkembangan embrio nuselar yang tidak bersamaan dengan embrio zigotik dapat mengkontaminasi jaringan triploid endosperma (Kosmiatin, 2013). Metode untuk meregenerasikan satu sel triploid menjadi tanaman triploid diperlukan untuk menghindari terbentuknya regeneran yang miksploid. Tanaman triploid akan menghasilkan buah tanpa biji karena ketidakseimbangan perpasangan kromosom saat meiosis (Hoshino *et al.*, 2011).

Keberhasilan embriogenesis somatik yang diinduksi dari jaringan endosperma ditentukan oleh berbagai faktor (Hoshino *et al.*, 2011). Faktor penentu keberhasilannya antara lain tahap perkembangan jaringan endosperma dan formulasi media. Pada jeruk manis (*C. sinensis*) dan mandarin (*C. reticulata*), kultur endosperma yang diisolasi dari buah umur 12 minggu setelah antesis berhasil menginduksi pembentukan kalus, tetapi regenerasi tunas triploidnya belum dilaporkan (Usman *et al.*, 2008). Embriogenesis somatik pada jaringan diploid jeruk Siam Simadu sudah dikuasai dengan eksplan embrio nuselar pada media dengan penambahan BA dan bahan organik (Husni *et al.*, 2010), tetapi embriogenesis dari jaringan endosperma triploid jeruk Siam Simadu sampai saat ini belum dilaporkan. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan formulasi media untuk induksi kalus embriogenik, pendewasaan dan perkecambahan serta pemanjangan planlet dari jaringan endosperma jeruk Siam Simadu.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Sel dan Jaringan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian dan Laboratorium Kultur Jaringan, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Oktober 2012.

Bahan tanaman yang digunakan adalah jaringan endosperma dari buah jeruk Siam Simadu yang berumur

11-13 minggu setelah antesis. Jaringan endosperma diisolasi dari buah yang sudah disterilasi permukaannya dengan cara direndam dalam alkohol 96% kemudian dilalukan pada api Bunsen, proses ini dilakukan 3 kali. Penyediaan media kultur dilakukan dengan menambahkan 30 g L⁻¹ gula pasir, mengatur kemasaman media menjadi 5.8 dan memadatkannya dengan 2.5 g L⁻¹ phytigel (Sigma). Media disterilasi dengan otoklaf pada temperatur 121 °C selama 15 menit.

Induksi Pembentukan Kalus Embriogenik dari Jaringan Endosperma Jeruk Siam Simadu

Jaringan endosperma (berupa *jelly*) diisolasi dari biji di bawah mikroskop untuk memisahkannya dari embrio zigotik dan nuselar. Endosperma dikulturkan pada media induksi pembentukan kalus (Husni *et al.*, 2010), yaitu media dasar MS modifikasi formulasi vitamin media MW (Morel dan Wetmore 1951). Media dasar ditambah dengan 3 mg L⁻¹ BA, 30 g L⁻¹ gula pasir. Sebagai perlakuan, ditambahkan (1) 0.1 mg L⁻¹ biotin, (2) 500 mg L⁻¹ ekstrak malt (ME), (3) 500 mg L⁻¹ kasein hidrolisat (CH), (4) 0.1 mg L⁻¹ biotin + 500 mg L⁻¹ ME, dan (5) 0.1 mg L⁻¹ biotin + 500 mg L⁻¹ CH. Penelitian disusun menggunakan rancangan acak lengkap dengan 5 ulangan. Setiap ulangan terdiri atas 5 eksplan endosperma.

Kultur endosperma diinkubasi dengan pencahayaan rendah dari lampu TL 40 W 220 V (\pm 600 lux) selama 16 jam hari⁻¹, suhu 21-25 °C. Pengamatan dilakukan 12 minggu setelah penanaman *in vitro* terhadap persentase pembentukan kalus embriogenik yang diamati secara kasat mata terhadap struktur kalusnya.

Pendewasaan dan Perkecambahan Embriosomatik

Bahan tanaman yang digunakan adalah \pm 0.1 g kalus embriogenik dari penelitian 1 yang disubkultur pada media tanpa zat pengatur tumbuh (ZPT). Formulasi media pendewasaan adalah media MS modifikasi vitamin MW dengan penambahan 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 mg L⁻¹ ABA, 250 mg L⁻¹ glutamin, 7 mg L⁻¹ biotin, dan 0.5 g L⁻¹ phytigel. Biakan diinkubasi pada ruang kultur dengan penyinaran lampu TL 60 W 220 V (\pm 1,000 lux), penyinaran 16 jam hari⁻¹, suhu 21-25 °C.

Penelitian dirancang dengan rancangan acak lengkap dengan 4 ulangan, setiap ulangan terdiri satu populasi sel (\pm 0.1 g). Pengamatan dilakukan terhadap jumlah Embrio Somatik (ES) total, globular, pendewasaan ES (bentuk hati, torpedo, kotiledon) dan ES berkecambah, serta persentase pendewasaan. Persentase pendewasaan dihitung sebagai jumlah pendewasaan ES per total ES yang terbentuk dikalikan 100% pada populasi sel (biakan) yang sama.

Pemanjangan Planlet

Bahan tanaman yang digunakan dalam tahapan penelitian ini adalah kecambah somatik (planlet). Planlet dipotong bagian akar atau bakal akarnya dan dikulturkan pada media pemanjangan planlet, yaitu media dasar MS

modifikasi vitamin MW yang diperkaya dengan 2.5 g L⁻¹ GA₃ dan dikombinasikan dengan kinetin pada konsentrasi 0; 1; 3 mg L⁻¹. Planlet tanpa akar dikulturkan pada media pemanjangan dan diinkubasi pada ruang kultur dengan penyinaran ± 1,000 lux, penyinaran 16 jam hari⁻¹, suhu 21-25 °C.

Penelitian dirancang dengan rancangan acak lengkap dengan 9 ulangan. Pengamatan dilakukan setelah 6 minggu penanaman dalam kultur terhadap jumlah dan tinggi tunas, jumlah buku dan daun serta persentase pembentukan ES sekunder dan kalus embriogenik.

Analisa Statistik

Data hasil pengamatan dirata-rata kemudian dihitung standar deviasinya. Rerata dianalisis variannya, apabila terdapat beda nyata maka dilakukan uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kepercayaan 95%. Analisa statistik dilakukan dengan menggunakan *soft ware SAS 9.1*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Pembentukan Kalus Embriogenik dari Jaringan Endosperma Jeruk Siam Simadu

Jaringan endosperma yang diisolasi dari buah 11-13 minggu setelah antesis, sel-selnya sudah mulai membentuk dinding sel dan membentuk jaringan endosperma yang kompak (Kosmiatin, 2013). Respon endosperma pertama kali terlihat melalui perubahan warna eksplan dari bening menjadi putih susu pada umur 8 minggu setelah dikulturkan. Sel-sel endosperma kemudian membelah yang ditandai dengan bertambah besarnya volume eksplan, kemudian membentuk kalus. Respon pembentukan kalus embriogenik pada umur 12 minggu setelah kultur ditampilkan pada Tabel 1.

Berdasarkan analisis statistik, terdapat perbedaan yang nyata dari persentase pembentukan kalus embriogenik terhadap formulasi media yang digunakan (Tabel 1). Koefisien keragaman pada rerata persentase pembentukan kalus embriogenik yang diinduksi dari jaringan endosperma cukup tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa keragaman

dalam eksplan tinggi, karena endosperma merupakan jaringan yang mempunyai tahapan perkembangan sel dan fungsi sel yang berbeda sehingga setiap sel memberikan respon yang berbeda terhadap formulasi media. Perbedaan respon juga terjadi karena keberadaan proembrio nuselar (diploid) dengan ukuran kurang dari 16 sel dan sel-sel haploid antipodal yang ikut terkulturkan dengan jaringan endosperma yang diisolasi dari buah yang berumur 11-13 minggu setelah antesis. Keberadaan proembrio dan antipodal ini dapat diamati pada preparat kering endosperma dengan bantuan mikroskop *inverted* perbesaran 200x, tetapi tidak teramati dengan mikroskop binokular perbesaran 40x (Kosmiatin, 2013).

Seluruh formulasi media perlakuan berhasil menginisiasi kalus embriogenik (Tabel 1) dengan persentase pembentukan kalus embriogenik tertinggi diperoleh dari media dengan penambahan 500 mg L⁻¹ CH (84.0%) tetapi tidak berbeda nyata dengan penambahan 500 mg L⁻¹ ME (80%). Hal ini menunjukkan meskipun ME diekstraksi dari tanaman barley sementara CH dari susu, respon yang diperlihatkan sama untuk pembentukan kalus embriogenik. Ketersediaan bahan organik yang tinggi dalam medium dapat meningkatkan akumulasi asam amino sebagai penyusun protein, sehingga akumulasi protein juga turut meningkat. Pembentukan protein terutama protein simpanan dalam sel dibutuhkan untuk membentuk ES (Deo *et al.*, 2010). Penambahan bahan organik (CH dan ME) pada tanaman *Dianthus* dapat meningkatkan 1.5 kali pembentukan embrio somatik (Pareek dan Kothari, 2003).

Perlakuan pada jambu biji, penambahan bahan organik yang dikombinasikan dengan vitamin dapat meningkatkan induksi embriogenesis somatik (Rai *et al.*, 2008), tetapi pada endosperma jeruk kombinasi perlakuan bahan organik (CH atau ME) dan vitamin biotin memberikan hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan penambahan secara tunggal. Hal ini diduga terjadi karena biotin yang berperan sebagai kofaktor dalam sintesa protein meningkatkan akumulasi protein. Kombinasi biotin dengan bahan organik yang ditambahkan secara eksogen akan mengakibatkan akumulasi protein yang berlebihan dalam sel sehingga justru menghambat proses embriogenesis (Dodeman *et al.*, 1997). Hal ini diduga dapat menyebabkan penghambatan ekspresi gen lain yang berkenaan dengan embriogenesis somatik.

Tabel 1. Persentase pembentukan kalus embriogenik yang diinduksi dari jaringan endosperma jeruk siam pada media dasar MS modifikasi dengan penambahan 3 mg L⁻¹ BA, 12 minggu setelah kultur

Formulasi media	Persentase pembentukan kalus embriogenik
Biotin 0.1 mg L ⁻¹	76.0ab
Ekstrak Malt 500 mg L ⁻¹	80.0a
Casein Hidrolisat 500 mg L ⁻¹	84.0a
Ekstrak Malt 500 + Biotin 0.1 mg L ⁻¹	4.0c
Casein Hidrolisat 500 + Biotin 0.1 mg L ⁻¹	56.0b

Keterangan: Data disajikan dalam rerata persentase pembentukan kalus; Data ditransformasi = arc sin; Angka rerata yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT pada α = 0.05

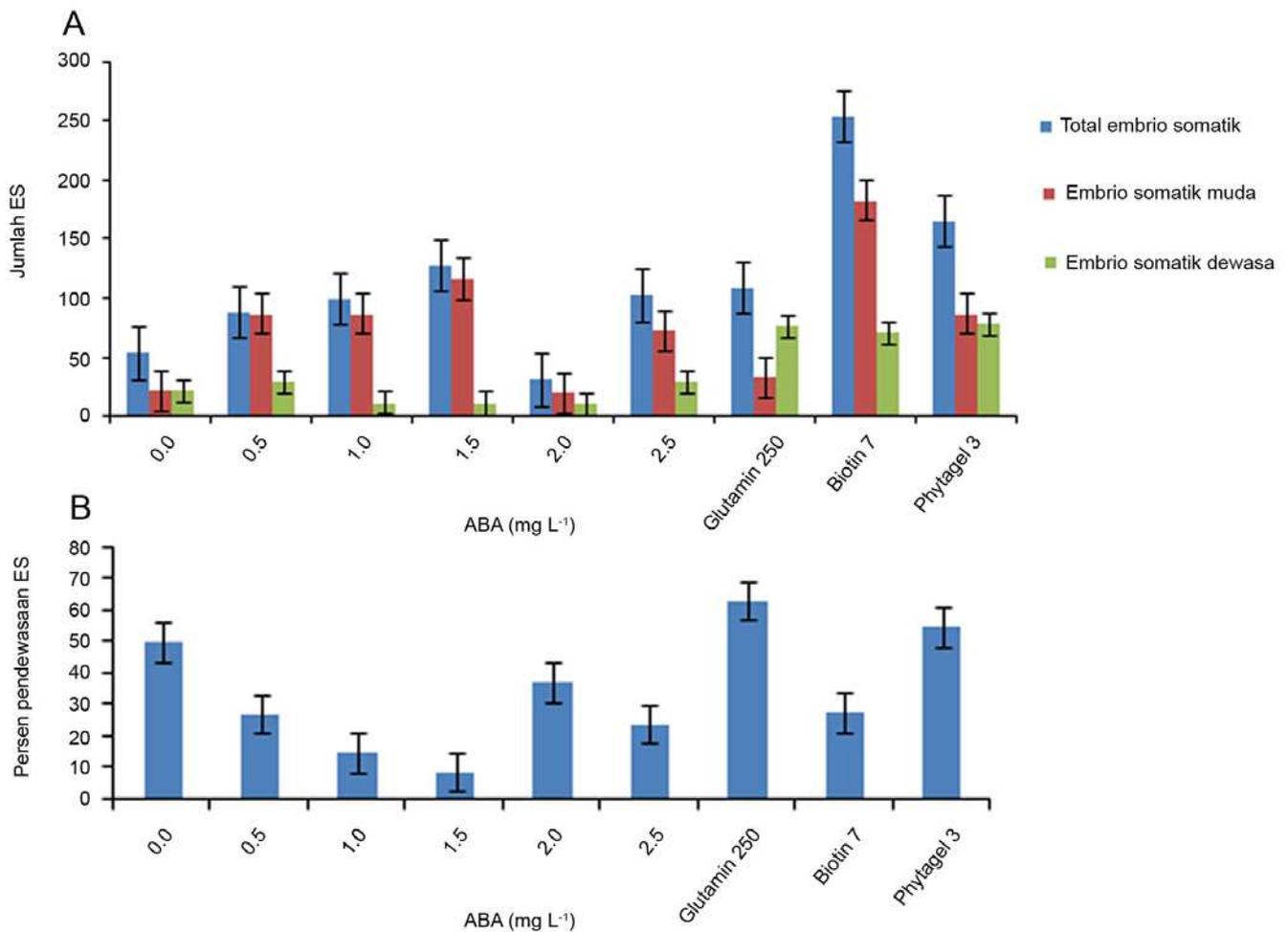
Pendewasaan dan Perkecambahan Struktur Embrio Somatik

Pendewasaan ES merupakan tahapan penting dalam keberhasilan embriogenesis somatik. Formulasi media sangat menentukan karena apabila tidak sesuai maka sel-sel yang sudah terdiferensiasi untuk membentuk ES akan kembali membentuk sel-sel yang tidak terdiferensiasi atau membentuk ES sekunder (Gray, 2005). Pendewasaan ES melibatkan perubahan akumulasi ABA (Preeti *et al.*, 2004) dan fase desikasi (penurunan kadar air) yang dialami embrio untuk dapat mengakumulasi ABA (Marquez-Martin *et al.*, 2011). Penambahan ABA eksogen dalam medium diperlukan dalam pendewasaan ES yang diinduksi dari jaringan diploid jeruk Siam Simadu (Husni *et al.*, 2010).

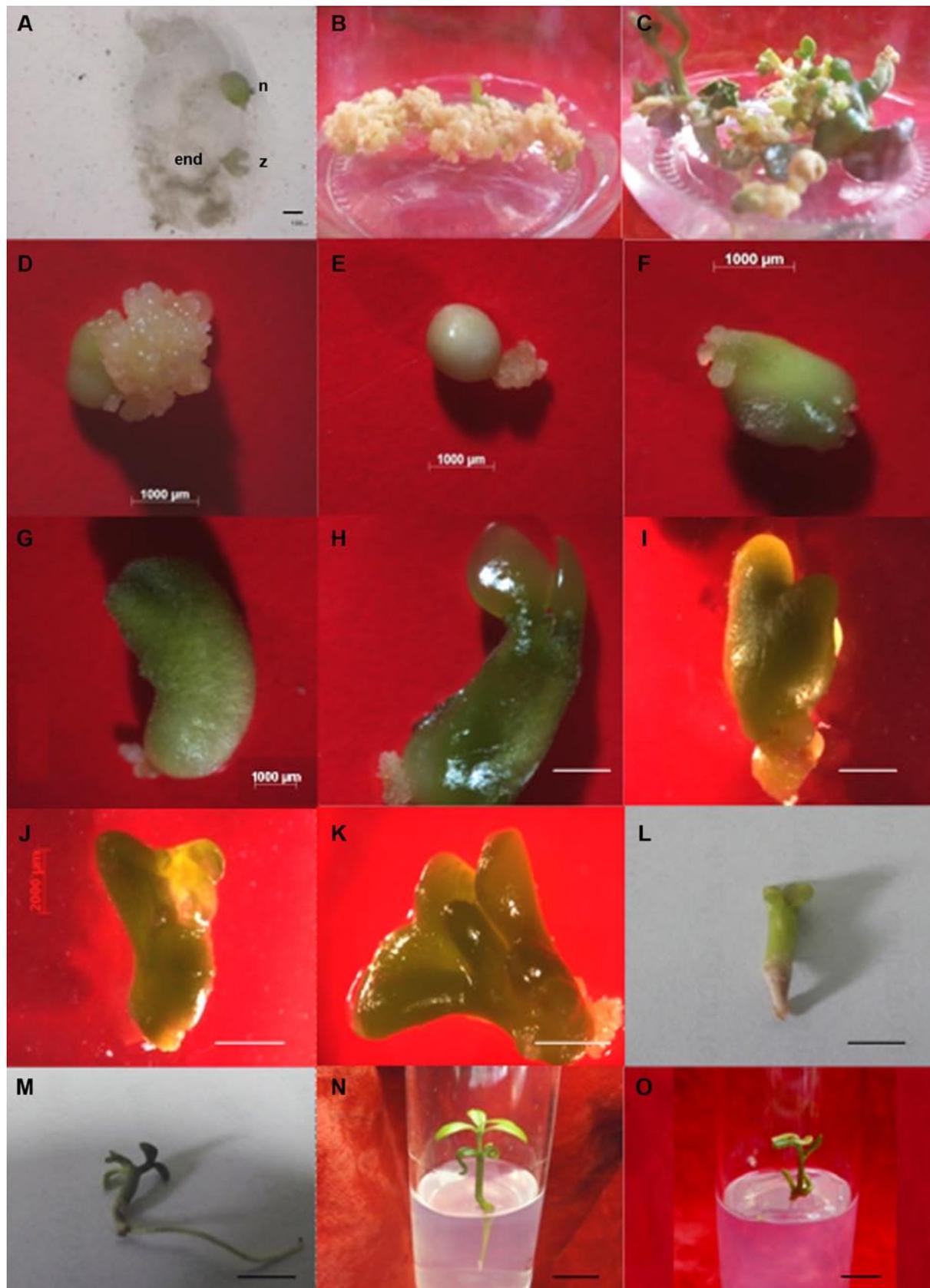
Perkembangan ES globular pada kalus mulai terlihat setelah kultur berumur 4 minggu setelah disubkultur. Pada minggu ke-8, seluruh kalus embriogenik menunjukkan kemampuan untuk membentuk ES globular (Gambar 1A) dan menunjukkan pendewasaan ES (terbentuk tahap hati, torpedo, kotiledon) pada seluruh formulasi media yang diuji dengan jumlah yang beragam (Gambar 1B). Hasil

analisis statistik, memperlihatkan standar deviasi yang tinggi menunjukkan adanya keragaman eksplan, meskipun sebelumnya kalus sudah diseragamkan dengan cara disubkultur pada media tanpa ZPT.

Rerata jumlah total ES tertinggi diperoleh eksplan yang dikulturkan pada media dengan penambahan 500 mg L⁻¹ glutamin dan 7 mg L⁻¹ biotin yang mencapai rerata 255.5 (Gambar 1A) dan berbeda nyata terhadap seluruh formulasi media yang lain. Meskipun ES yang dihasilkan banyak, tetapi morfologinya abnormal dengan ukuran jauh lebih besar dari ES normal (Gambar 2I, J, K). Menurut Dodeman *et al.* (1997) abnormalitas yang terjadi saat pendewasaan adalah *radial defect* yang ditunjukkan dengan terbentuknya *raspberry* (Gambar 2I, J) dan *Knolle* (Gambar 2K). Abnormalitas ES muncul diduga disebabkan oleh akumulasi protein simpanan yang berlebih akibat aktivitas biotin sebagai kofaktor sintesa protein simpanan dan ketersediaan nitrogen (N) organik yang mudah diserap tanaman (Dodeman *et al.*, 1997). Akumulasi protein simpanan yang berlebih akan menghambat akumulasi protein LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) yang berperan dalam pendewasaan ES sehingga ES menjadi abnormal.



Gambar 1. (A) Pendewasaan embrio somatik yang berhasil diinduksi dari jaringan endosperma. (B) Persentase pendewasaan embrio somatik yang berhasil diinduksi dari jaringan endosperma. Data adalah pada 8 minggu setelah dikulturkan pada media MS modifikasi dengan penambahan 0; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5 mg L⁻¹ ABA; 250 mg L⁻¹ Glutamin, 7 mg L⁻¹ biotin, 3 g L⁻¹ phytigel, data disajikan dalam rerata pembentukan embrio somatik



Gambar 2. Embriogenesis somatik yang diinduksi dari jaringan endosperma jeruk siam simadu. (A) Eksplan jaringan endosperma (end) dengan embrio zigotik (z) dan nuselar (n), bar = 100 μ m. (B) Kalus embriogenik yang diinduksi dari jaringan endosperma. (C) Pendewasaan dan perkecambahan embrio somatik pada media MS modifikasi dengan peningkatan konsentrasi bahan pemat. (D) Massa proembriogenik. (E) Globular. (F) Hati. (G) Torpedo. (H) Kotiledon, bar D-H = 1000 μ m. (I) Hati abnormal. (J) Torpedo abnormal. (K) Kotiledon abnormal, bar I-K = 2000 μ m. (L-N) Kecambah somatik (plantlet) normal. (O) Plantlet abnormal, bar L-O = 1 cm

Media MS modifikasi tanpa penambahan ZPT dengan konsentrasi phytagel yang ditingkatkan menjadi 3 g L⁻¹ menyebabkan pembentukan ES yang cukup banyak (166.3) dan berbeda nyata dengan formulasi media dengan penambahan ABA. Media tersebut menyebabkan ES yang dihasilkan normal bahkan 14.1% di antaranya dapat langsung berkecambah pada media yang sama (Gambar 1 dan 2D-I). Persentase pendewasaan ES pada media yang lebih padat cukup tinggi yaitu 54.8%. Salah satu ciri fase pendewasaan pada embrio adalah menurunnya kandungan air pada embrio, sehingga media dengan ketersediaan air yang rendah dapat meningkatkan pendewasaan ES. Media dengan peningkatan konsentrasi gel pemat akan menurunkan potensial matriks media sehingga ketersediaan air untuk diserap berkurang dan menyebabkan kandungan air dalam ES menjadi rendah. Menurut Marquez-Martin *et al.* (2011) dan Peran-Quesada *et al.* (2004), pengaturan air berpengaruh positif terhadap pendewasaan ES alpukat dan sangat efektif dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi pemat medium bukan dengan PEG ataupun osmotikum. Hal ini juga terjadi pada pendewasaan ES yang diinduksi dari jaringan endosperma jeruk Siam Simadu, dimana penambahan PEG tidak menginduksi pendewasaan ES tetapi kalus embriogenik berkembang menjadi kalus yang tidak terdiferensiasi (data tidak ditampilkan).

Persentase pendewasaan ES tertinggi berasal dari eksplan yang dikulturkan dalam media MS modifikasi dengan penambahan glutamin, tetapi morfologi ES yang dihasilkan abnormal (kotiledon menebal dan lebih dari dua). Munculnya abnormalitas morfologi ES yang dihasilkan diduga disebabkan oleh akumulasi N organik dalam medium akibat penambahan glutamin sehingga terjadi peningkatan akumulasi protein terutama protein simpanan yang dapat menghambat proses pendewasaan. Hal yang sama juga terjadi pada embriogenesis somatik *Chesnut* ketika pendewasaan dilakukan pada media yang ditambah dengan N organik (Robichaud *et al.*, 2004). Berbeda dengan embriogenesis pada kedelai yang membutuhkan N organik dari CH dan asam amino (glutamin dan asparagin) untuk meningkatkan pendewasaan ES (Khumaida dan Handayani, 2010).

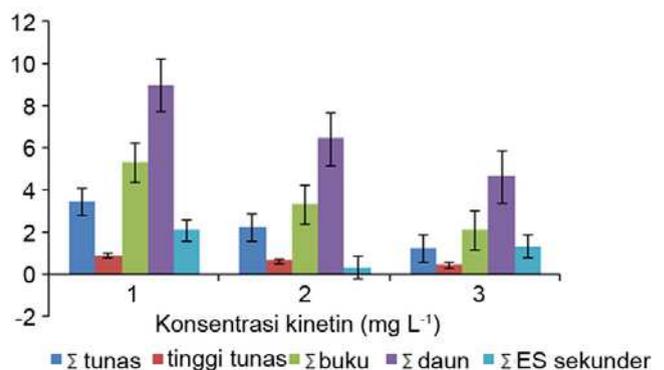
Pendewasaan ES umumnya dilakukan dengan menambahkan ABA (Corredoira *et al.*, 2003) karena ABA berperan sebagai komponen untuk menahan perkecambahan dini, meningkatkan toleransi desikasi sehingga konversi untuk perkecambahan tinggi (Robichaud *et al.*, 2004). Hal yang berbeda diperoleh dari penelitian ini dimana penambahan ABA tidak memberikan hasil pendewasaan ES yang lebih baik bahkan menghambat perkecambahannya. Saat akhir pendewasaan ES, diduga keberadaan ABA menghambat aktivitas enzim LEA untuk mengakumulasi proteinnya sehingga protein simpanan lebih tinggi dan menyebabkan terbentuknya ES sekunder. Proses desikasi embrio pada ES yang diinduksi dari jaringan endosperma tidak memerlukan ABA eksogen tetapi lebih sesuai dilakukan dengan cara meningkatkan konsentrasi pemat medium. Teknik ini juga

lebih menguntungkan karena pada penelitian ini, ES dewasa dapat langsung berkecambah pada media yang sama. Hal ini menguntungkan karena pendewasaan dan perkecambahan embrio dapat berlangsung dalam satu tahap pengkulturan.

Pemanjangan Plantlet

Pemanjangan plantlet pada embriogenesis jeruk siam sering menjadi penghambat dalam perkembangannya membentuk plantlet normal dengan daun, buku dan akar yang sempurna. Keberhasilan pemanjangan plantlet terbaik berasal dari media MS modifikasi dengan 2.5 mg GA₃ L⁻¹ tanpa penambahan kinetin dan berbeda nyata dengan media yang ditambah kinetin untuk semua peubah yang diamati (Gambar 3). Hal ini terjadi karena penambahan GA₃ yang aktif dalam menginduksi pemanjangan sel, terutama pada sel-sel ruas batang, sehingga terjadi pemanjangan tunas. Hasil yang sama terjadi pada embriogenesis somatik jaringan diploid embrio nuselar jeruk, perkecambahan dan pemanjangan tunas dilakukan pada media dengan penambahan GA₃ (Husni *et al.*, 2010; Kayim dan Koc, 2006). Penambahan kinetin dalam media secara nyata menurunkan semua peubah yang diamati (Gambar 3), dan morfologi tunas yang tumbuh tidak normal (Gambar 2O). Kinetin merupakan sitokinin yang berperan dalam pembelahan sel untuk menginisiasi pembentukan tunas sehingga ketika dikombinasikan dengan GA tidak diperoleh hasil yang baik.

Embrio Somatik (ES) sekunder mulai muncul di bagian pangkal plantlet setelah kultur berumur 4 minggu. Pada seluruh media pemanjangan yang diuji pembentukan ES sekunder tertinggi diperoleh pada media tanpa penambahan kinetin yaitu 44.4% (Tabel 2), dan persentase pembentukan kalus embriogenik pada pangkal plantlet cukup tinggi (88.9%), tetapi persentasenya menurun dengan meningkatnya konsentrasi kinetin yang ditambahkan. Penurunan persentase pembentukan kalus embriogenik disebabkan oleh berubahnya kesetimbangan ZPT endogen akibat penambahan kinetin eksogen dalam media kultur.



Gambar 3. Jumlah dan tinggi tunas, jumlah buku dan daun plantlet pada media MS modifikasi dengan penambahan 2.5 mg L⁻¹ GA₃ dan Kinetin (0; 1; 3 mg L⁻¹), 6 minggu setelah kultur

Tabel 2. Pengaruh GA₃ dan kinetin terhadap pembentukan embrio somatik sekunder dari embrio somatik yang diinduksi secara tidak langsung dari jaringan endosperma jeruk siam, 4 minggu setelah tanam

Media (mg L ⁻¹)	Pembentukan ES sekunder (%)	Pembentukan kalus embriogenik (%)	Keterangan
GA ₃ 2.5I+K0	44.4±3.2	88.9±0.3	Tunas normal
GA ₃ 2.5 +K1	22.2±0.7	66.7±0.5	Tunas normal
GA ₃ 2.5 +K3	33.3±2.4	22.2±0.4	Tunas tidak normal

Keterangan: GA₃ = *Giberrellic acid*; K= Kinetin; ES = embrio somatik; data disajikan dalam rerata persentase pembentukan ES sekunder dan kalus embriogenik

KESIMPULAN

Media terbaik untuk induksi kalus embriogenik dari jaringan endosperma jeruk Siam Simadu adalah media MS modifikasi dengan penambahan 3 mg L⁻¹ BA dan 500 mg L⁻¹ CH atau ME. Pendewasaan dan perkecambahan Embrio Somatik terbaik dengan morfologi normal diperoleh dari media MS modifikasi tanpa ZPT dengan peningkatan konsentrasi pematid medium (phytagel) dari 2.5 menjadi 3 g L⁻¹. Keberhasilan pemanjangan plantlet terbaik dilakukan pada media MS modifikasi dengan penambahan 2.5 mg GA₃ L⁻¹. Terbentuk ES sekunder dan kalus embriogenik yang terbentuk pada pangkal plantlet pada media pemanjangan.

DAFTAR PUSTAKA

Berger, F. 2003. Endosperm: the crossroad of seed development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:45-50.

Corredoira, E., A. Ballester, A.M. Vieitez. 2003. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. *Ann. Bot.* 92:129-136.

Deo, P.C., A.P. Tyagi, M. Taylor, R. Harding, D. Becker. 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant Breeding. *The South Pacific J. Nat. Appl. Sci.* 28:27-40.

Dodeman, V.L., G. Ducreux, M. Kreis. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48:1493-1509.

Gray, D.J. 2005. Propagation from non meristematic tissues: Nonzygotic embryogenesis. p. 187-200. *In* R.N. Trigiano, D.J. Gray (*Eds.*) *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Hoshino, Y., T. Miyashita, T.D. Thomas. 2011. *In vitro* culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding. *Sci. Hort.* 130:1-8.

Husni, A., A. Purwito, I. Mariska, Sudarsono. 2010. Regenerasi tanaman jeruk siam melalui embriogenesis somatik. *J. Agrobiogen* 6:79-83.

Kayim, M., N.K. Koc. 2006. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. *Sci. Hort.* 109:29-34.

Khumaida, N., T. Handayani. 2010. Induksi dan proliferasi kalus embriogenik pada beberapa genotipe kedelai. *J. Agron. Indonesia* 38:19-24.

Kosmiatin, M. 2013. Pembentukan tanaman triploid jeruk siam simadu (*Citrus nobilis* Lour) melalui kultur endosperma. Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Manrique-Trujillo, S., D. Díaz, R. Reano, M. Ghislain, J. Kreuz. 2013. Sweetpotato plant regeneration via an improved somatic embryogenesis protocol. *Sci. Hort.* 161:95-100.

Marquez-Martin, B., R. Sesmeroa, M.A. Quesadab, F. Pliego-Alfaroc, C. Sánchez-Romero. 2011. Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 168:2028-2034.

Morel, G., R.M. Wetmore. 1951. Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.* 38:141-143.

Mujib, A., S. Banerjee, P.D. Ghosh. 2005. Origin, development and structure of somatic embryos in selected bulbous ornamentals: BAP as inducer. p. 15-24. *In* A. Mujib, J. Samac (*Eds.*) *Somatic Embryogenesis, Plant Cell Monogr* (2). Springer, Verlag-Berlin Heidenbergh.

Pareek, A., S.L. Kothari. 2003. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. *Sci. Hort.* 98:449-459.

Preeti, S., S. Pandey, A. Bhattacharya, P.K. Nagar, P.S. Ahuja. 2004. ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L.) Kuntze O. *Plant Physiol.* 161:1269-1276.

- Perán-Quesada, R., C. Sánchez-Romero, A. Barceló-Muñoz, F. Pliego-Alfaro. 2004. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Sci. Hort.* 102:61-73.
- Rai, M.K., V.S. Jaiswal, U. Jaiswal. 2008. Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Sci. Hort.* 117:302-305.
- Robichaud, R.L., V.C. Lessard, S.A. Merkle. 2004. Treatments affecting maturation and germination of American chestnut somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 161:957-969.
- Toonen, M.A.J., T. Hendriks, E.D.L. Schmidt, H.A. Verhoeven, A. van Kammen, S.C. de Vries. 1994. Description of somatic embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194:565-72.
- Usman, M., B. Fatima, K.A. Gillani, M.S. Khan, M.H. Khan. 2008. Exploitation of potential target tissues to develop polyploids in citrus. *Pak. J. Bot.* 40:1755-1766.