

Daya Tumbuh Tanaman Jeruk Kalamondin Hasil Perbanyakan Via Somatik Embriogenesis In Vitro pada Batang Bawah JC

Devy, N.F., A. Sugiyatno, dan F. Yulianti

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung 1 Junrejo, Batu 65301

Naskah diterima tanggal 28 April 2011 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 8 September 2011

ABSTRAK. Perbanyakan tanaman buah dengan metoda sambung pada produk in vitro telah banyak dilakukan. Pada tanaman jeruk, batang bawah merupakan hal penting karena sistem perakaran yang lebih baik dan ketahanan terhadap penyakit akar dibandingkan batang atas komersial. Penelitian penyambungan in vitro dan ex vitro jeruk Kalamondin hasil perbanyakan somatik embriogenesis (SE) pada batang bawah JC dilakukan di Laboratorium Somatik Embriogenesis dan Rumah Pembibitan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro), pada Januari – Desember 2010. Penyambungan dilakukan pada dua kondisi, yaitu (1) kondisi in vitro, yaitu embrio dan planlet Kalamondin disambungkan pada planlet JC dan (2) ex vitro atau kondisi lapangan, yaitu batang atas jenis embrio dan planlet disambungkan pada batang bawah JC dengan perlakuan tiga macam, yaitu planlet JC hasil perbanyakan SE berumur 4 dan 8 bulan setelah aklimatisasi, serta semaihan biji umur 8 bulan. Masing-masing kegiatan disusun secara rancangan acak kelompok dan rancangan acak lengkap faktorial dengan tiga ulangan dengan unit percobaan masing-masing empat tanaman. Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa daya tumbuh tanaman jeruk hasil sambungan antara Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco) hasil perbanyakan SE pada batang bawah JC secara ex vitro lebih baik dibanding in vitro. Pada kegiatan in vitro, sampai dengan umur 10 bulan setelah penyambungan, persentase sambungan yang tidak jadi (mati) dipengaruhi oleh jenis batang atas yang digunakan, di mana penggunaan planlet sebagai batang atas menyebabkan persentase kematian lebih tinggi dibandingkan penggunaan embrio. Pada penyambungan ex vitro, tidak ada interaksi antara perlakuan batang bawah dengan batang atas pada semua parameter pengamatan, dengan tinggi tanaman hasil sambung pada umur 10 bulan rata-rata mencapai 53,7 cm. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa hasil perbanyakan jeruk melalui SE, baik berupa embrio kotiledonari maupun planlet dapat difungsikan sebagai batang atas dan tumbuh dengan memuaskan bila disambungkan dengan batang bawah jeruk secara ex vitro.

Katakunci: Kalamondin; Planlet; Sambungan; *Citrus mitis* Blanco; Embrio somatik

ABSTRACT. Devy, N.F., A. Sugiyatno, and F. Yulianti. 2011. The Growth of Citrus cv. Calamondin Derived from Somatic Embryogenesis Propagation on JC Rootstock. The fruit plant propagation by grafting method of product in vitro has been documented already. The using of a rootstock is a very important thing in citrus propagation industry. Besides of its better root system, it has an important role on preventing root diseases attack where scion part relatively more susceptible. The research of the Calamondin derived from somatic embryogenesis (SE) propagation that grafted in vitro and ex vitro on JC rootstock grafting was conducted in Somatic Embryogenesis Laboratory and Nursery House of Indonesian Citrus and Subtropical Fruit Research Institute (ICISFRI) from January to December 2010. This research using both embryos and plantlets of citrus cv. Calamondin derived from SE propagation in vitro as stocks and JC as rootstock, respectively. The grafting was done on the two conditions, (1) in vitro i.e. the stock was grafted on the JC plantlet and (2) field condition i.e. the stock plant was grafted on to three treatments rootstock (4 and 8 months acclimated SE plant and 8 months age-seedling of JC). The activities were arranged as randomized block design and factorial randomized complete design respectively, with three replications with four plants for each experimental unit. The results showed that the growth of citrus cv. Calamondin (*Citrus mitis* Blanco) derived from SE propagation on JC rootstock at ex vitro activity better than in vitro activity. At in vitro activity, up to 10 months after grafting, percentage of death grafting influenced by type of stock, where the used of plantlets as stock causing more death grafting than embryo. At another activity, there was no interaction between treatment effect with the combination rootstock and stock treatment for all parameters, with plants height average reached 53.7 cm. From this research, we could make a conclusion that the product of propagation via somatic embryogenesis technique, both cotyledonary embryos and plantlets, could be used as a stock that would growth satisfactory if they grafted on the citrus rootstock ex vitro.

Keywords: Calamondin; Plantlet; Sambungan; *Citrus mitis* Blanco; Embryo somatic

Teknologi perbanyakan masal melalui somatik embriogenesis (*somatic embryogenesis*) merupakan teknologi terbaik untuk menghasilkan tanaman masal yang seragam dan sama dengan induknya. Namun demikian, produk akhir yaitu

tanaman bisa dimanfaatkan dengan optimal sangat bergantung pada kesuksesan di beberapa tahapan, antara lain fase induksi perakaran, *hardening*, dan aklimatisasi yang menentukan jumlah tanaman yang hidup, tumbuh, dan berkembang optimal

secara ex vitro. Menurut Kadlecuk *et al.* (2001), walaupun ada perbedaan kandungan karbohidrat, pati, serta kandungan klorofil pada planlet-planlet yang dihasilkan karena adanya *pretreatment* yang berbeda pada fase in vitro, perbedaan tersebut dapat hilang secara perlahan pada fase ex vitro atau aklimatisasi.

Pada perbanyakan masal tanaman buah-buahan, kesuksesan multiplikasi yang tinggi, mudahnya eksplan berakar, serta daya survival kuat pada tahap aklimatisasi sendiri tidak cukup kuat untuk dasar perbanyakan secara komersial. Ada beberapa hal yang perlu dipertimbangkan, antara lain, ada tanaman buah yang menghindari penggunaan sistem perakarannya sendiri pada saat ditanam di lapangan, sehingga tanaman tersebut harus disambungkan dengan suatu batang bawah yang kompatibel. Pada kasus demikian, perbanyakan masal dianggap menguntungkan atau tidak secara ekonomi, bergantung pada tingkat kesuksesan penyambungan pada hasil perbanyakan in vitro tersebut (Nas dan Read 2003).

Pada tanaman jeruk, penggunaan batang bawah tetap merupakan hal penting. Selain sistem perakaran yang lebih baik, batang bawah juga berperan penting dalam mencegah serangan penyakit akar, di mana batang atas komersial umumnya sangat peka terhadap penyakit tersebut. Menurut Ollitrault (1990), penyambungan ex vitro dilakukan pada tanaman jeruk disebabkan karena pada perbanyakan secara in vitro pada fase aklimatisasinya membutuhkan waktu yang lama dan kadang-kadang merupakan tahap yang membutuhkan banyak perhatian. Lebih lanjut lagi, adanya karakter juvenil merupakan hambatan yang besar dalam perbanyakan jeruk melalui teknologi somatik embryogenesis (SE). Untuk memecahkan permasalahan tersebut, teknik *grafting* embrio kemudian dikembangkan. Teknik tersebut dianggap lebih mudah dan cepat dibanding teknik tradisional karena adanya pengurangan waktu pada tahapan in vitro dan aklimatisasi, tidak ada permasalahan serangan patogen, dan pertumbuhan tunas lebih cepat. Pada tanaman kakao, teknik ini memungkinkan diperolehnya bunga atau pembungaan pertama 1 atau 2 tahun lebih awal dibanding teknik pembibitan tradisional (Couturon 1982 *dalam* Ollitrault 1990).

Tujuan penelitian ialah mendapatkan daya tumbuh tanaman jeruk Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco) hasil perbanyakan SE yang disambungkan pada batang bawah JC baik secara in vitro maupun ex vitro.

Hasil sambungan antara tanaman jeruk Kalamondin hasil perbanyakan SE dengan batang bawah JC diharapkan dapat tumbuh dengan baik, dengan cara in vitro maupun ex vitro. Hasil penelitian ini diharapkan dapat diadopsi untuk varietas jeruk yang lain, sehingga produksi benih jeruk dapat diproduksi secara masal, seragam, dan murah. Hipotesis penelitian ini ialah produk hasil perbanyakan melalui SE, baik berupa embrio kotiledonari maupun planlet, dapat digunakan sebagai batang atas pada penyambungan in vitro dan ex vitro menggunakan JC sebagai batang bawah jeruk dan dapat tumbuh lebih baik bila disambungkan secara ex vitro.

BAHAN DAN METODE

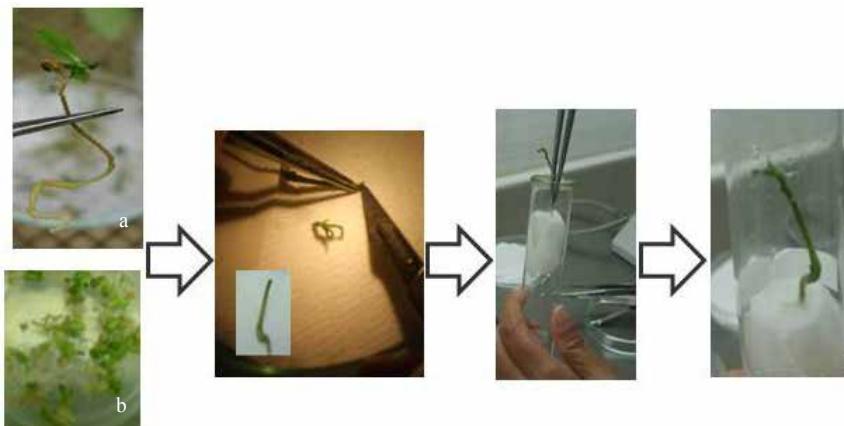
Kegiatan dilakukan di Laboratorium Somatik Embriogenesis dan Rumah Pembibitan Balitjestro mulai bulan Januari sampai dengan Desember 2010. Batang atas jeruk varietas Kalamondin dan batang bawah varietas *Japansche citroen* (JC) hasil perbanyakan secara SE serta semaihan biji JC umur 8 bulan digunakan dalam penelitian ini. Kegiatan dibagi menjadi dua subkegiatan, yaitu:

Penyambungan Mikro In Vitro antara Batang Atas dengan Batang Bawah Hasil SE

Embrio dan planlet Kalamondin disambungkan pada planlet JC di mana kedua jenis jeruk tersebut merupakan hasil perbanyakan SE secara in vitro pada media MS. Rancangan penelitian yang digunakan ialah acak lengkap, dengan dua perlakuan, yaitu sambung embrio (E_K) dan sambung planlet (P_K), Masing-masing perlakuan terdiri dari tiga ulangan dan setiap unit ulangan ada empat tabung reaksi.

Persiapan Batang Bawah

Planlet JC berumur 2 bulan hasil SE dipotong ± 1,5 cm dari pangkal batang, selanjutnya batang bagian pucuk dipotong dengan ukuran panjang antara 1-3 mm.



Gambar 1. Penyambungan (*The grafting of*) (a) planlet (*plantlet*) dan (b) embrio Kalamondin pada planlet batang bawah JC in vitro (*embryo of Calamondin on JC plantlet in vitro*)

Persiapan Batang Atas

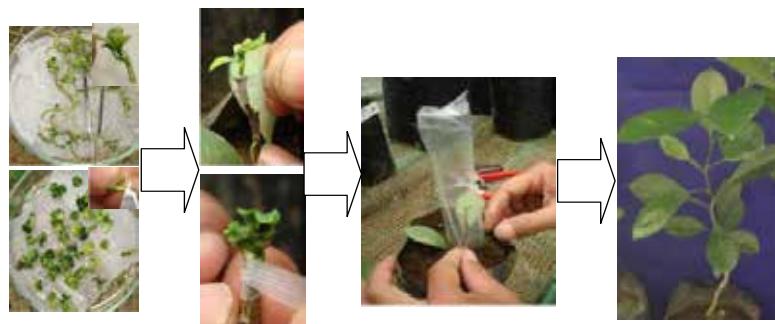
Embrio (E_K) dan planlet (P_K) Kalamondin masing-masing dengan ukuran 1-2 dan 3-5 mm disambungkan dengan cara sambung pucuk pada planlet JC pada *laminar air flow cabinet*. Batang atas yang akan disambungkan dikeluarkan dari botol dan dibersihkan dari sisa media agar. Pada bagian batang disayat tipis miring menggunakan skalpel yang disterilkan dengan alkohol. Lebar sayatan planlet disesuaikan dengan lebar sayatan batang bawahnya.

Proses Penyambungan

Materi batang atas yang siap disisipkan pada bagian batang bawah yang telah terbelah, selanjutnya sambungan diikat menggunakan parafilm.

Hasil sambungan dikulturkan pada media MS cair yang diberi penyangga kertas saring, dan diinkubasikan pada lingkungan standar, yaitu suhu $\pm 25^\circ\text{C}$ dan pencahayaan 18 jam/hari dengan intensitas ± 1.000 lux. Pengamatan secara visual dilakukan setiap bulan sampai umur sambungan 10 bulan.

Parameter pengamatan terdiri atas persentase sambungan jadi, jumlah daun, dan tinggi tanaman. Sambungan dikategorikan jadi apabila embrio atau planlet yang disambungkan masih berwarna hijau, tidak mencoklat atau mengering. Untuk mengetahui perbedaan hasil antara perlakuan embrio dan planlet sebagai batang atas yang disambungkan dengan JC sebagai batang bawah secara *in vitro*, maka dianalisis menggunakan uji *t*, dengan $t = 5\%$. Pada



Gambar 2. Penyambungan planlet (*The grafting of*) (a) dan embrio (b) Kalamondin pada batang bawah JC ex vitro (*embryo of Calamondin on JC rootstock ex vitro*)

Tabel 1. Kombinasi perlakuan penyambungan antara embrio dan planlet pada batang bawah JC (The grafting treatments combination between embryo and plantlet on JC rootstock)

Perlakuan (Treatments)	Embrio (Embryo) (E _K)	Planlet (Plantlet) (P _K)
Planlet 4 bulan aklimatisasi (P ₄) (Four months acclimated plantlet)	P ₄ E _K	P ₄ P _K
Planlet 8 bulan aklimatisasi (P ₈) (Eight months acclimated plantlet)	P ₈ E _K	P ₈ P _K
Semai 8 bulan setelah sebar (S ₈) (Eight months seedling plant)	S ₈ E _K	S ₈ P _K

persentase sambungan jadi, data yang diperoleh sebelum diuji ditransformasikan terlebih dahulu pada Arc Sin $\sqrt{\%}$.

Penyambungan Ex Vitro di Rumah Pembibitan antara Embrio dan Planlet Kalamondin Hasil Perbanyakan SE pada Batang Bawah JC

Embrio dan planlet Kalamondin disambungkan pada semai batang bawah JC yang berasal dari planlet JC hasil perbanyakan SE yang telah diaklimatisasi selama 4 dan 8 bulan serta semai biji JC berumur 8 bulan.

Persiapan Batang Bawah

Batang bawah semai JC berumur 8 bulan dipotong dengan ketinggian \pm 15 cm dari pangkal batang planlet hasil SE umur 8 bulan setelah aklimatisasi (BSA) dipotong dengan ketinggian \pm 8 cm dari pangkal batang, batang bawah hasil SE berumur 4 BSA dipotong dengan ketinggian \pm 5 cm dari pangkal batang, selanjutnya kulit batang dikelupas/dipotong dengan ukuran panjang antara 0,1-1,0 cm dan lebar 0,1-0,3 cm pada bagian yang dipotong.

Persiapan Batang Atas

Batang atas yang akan disambungkan dikeluarkan dari botol dan dibersihkan dari sisa media agar. Pada batang atas berupa planlet, bagian batang disayat tipis miring menggunakan skalpel yang disterilkan dengan alkohol 96%. Lebar sayatan planlet disesuaikan dengan lebar sayatan batang bawahnya.

Proses Penyambungan

Materi batang atas yang telah siap dimasukkan pada bagian kupasan kulit batang bawah, selanjutnya sambungan diikat menggunakan parafilm dan hasil sambungan disungkup dengan kantung plastik. Tanaman hasil penyambungan

diletakkan pada tempat naungan yang agak lembab untuk menghindari proses respirasi yang berlebih. Setelah 3 minggu, sungkup plastik dibuka. Tunas-tunas baru yang muncul pada batang bawah diiwil karena dapat menghambat pertumbuhan batang atasnya.

Hasil sambungan dipelihara di rumah pembibitan pada kondisi standar. Pengamatan dilakukan secara visual meliputi persentase sambungan jadi, jumlah daun, tinggi tanaman, dan diameter tanaman. Pengamatan dilakukan setiap bulan sampai umur sambungan 10 bulan. Sambungan dikategorikan jadi apabila embrio atau planlet yang disambungkan masih berwarna hijau, tidak mencoklat atau mengering. Untuk mengetahui pengaruh interaksi antarfaktor perlakuan maupun pengaruh perlakuan secara mandiri terhadap semua parameter yang diamati, maka data yang terkumpul dianalisis dengan sidik ragam pada rancangan acak kelompok pola faktorial, dengan tiga ulangan dan empat tanaman setiap unitnya. Bagi parameter yang dipengaruhi secara nyata baik oleh interaksi antara faktor perlakuan maupun oleh faktor perlakuan secara mandiri dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5%. Pada persentase sambung jadi, nilai yang diperoleh sebelum diuji ditransformasikan terlebih dahulu pada Arc Sin $\sqrt{\%}$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kegiatan Penyambungan In Vitro

Dari hasil uji t (t 5%), sampai tanaman berumur 10 bulan setelah penyambungan (BSP), persentase sambungan jadi dipengaruhi nyata oleh asal batang atas. Hasil sambungan yang menggunakan batang atas dari embrio

Tabel 2. Rerata persentase sambungan jadi pada tanaman umur 1-10 BSP (The average of percentage successful grafted plants at 1-10 MAG)

Perlakuan (Treatments)	Rerata persentase tanaman hidup pada umur 1-10 bulan **) (The average of percentage successful grafted plants at 1-10 months), %									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
E _K	87,5a ^{*)}	79,2a	75,0 a	67,7 a	67,7a	67,7a	67,7a	67,7a	67,7a	67,7a
P _K	55,8 b	51,7 b	51,7b	51,7b	51,7b	37,5b	37,5b	37,5b	37,5b	37,5b

**) data ditransformasi pada Arc Sin $\sqrt{\%}$ (transformatted data on Arc Sin $\sqrt{\%}$)

*) Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak beda nyata pada uji T dengan t 5% (Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different at T test with t 5% level)

EK : Embrio Kalamondin yang disambungkan dengan planlet JC in vitro (*Calamondin embryo was grafted on plantlet of JC in vitro*)PK : Planlet Kalamondin yang disambungkan dengan planlet JC in vitro (*Calamondin plantlet was grafted on plantlet of JC in vitro*)BSP (MAG) = Bulan setelah penyambungan (*Months after grafting*)

menghasilkan lebih banyak sambungan jadi (hidup) (Tabel 2).

Penyambungan *micrografting in vitro* antara batang atas dan batang bawah telah banyak didokumentasi, antara lain pada tanaman almond (Channuntapipat *et al.* 2003 dan Yildirim *et al.* 2010), pear kaktus (Estrada-Luna *et al.* 2002), jambu mente (Thimmappaiah *et al.* 2002), dan pada anggur (Pathirana dan Kenzie 2005). Pada umumnya, batang atas yang digunakan dalam *micrografting in vitro* berasal dari perbanyakan in vitro (proliferasi pucuk tanaman), sedangkan batang bawahnya ada yang berasal dari perbanyakan pucuk yang diakarkan maupun kultur biji in vitro.

Tingkat kematian yang tinggi pada tanaman jeruk Kalamondin hasil *micrografting in vitro*, diduga disebabkan karena ukuran batang atas (planlet) relatif lebih besar dibandingkan dengan planlet JC sehingga kurang kompatibel. Menurut Estrada-Luna *et al.* (2002), kegagalan pada penyambungan in vitro umumnya disebabkan

karena tidak menempelnya jaringan kambium antara batang bawah dan batang atas serta terjadinya proses oksidasi pada jaringan di tempat pertautannya yang mendorong terjadinya proses pengeringan jaringan tersebut. Pada *micrografting in vitro* almond, selain disebabkan hal tersebut di atas, tingginya persentase sambungan yang mati utamanya juga disebabkan karena tidak tersambungnya jaringan vaskular batang atas dengan batang bawah, serta terjadinya dislokasi bahan batang atas yang mendorong matinya jaringan tanaman tersebut (Yildirim *et al.* 2010). Penelitian Thimmappaiah *et al.* (2002) pada *micrografting* jambu mente, tersambungnya vaskular dengan baik antara batang atas dan bawah dapat ditandai dengan adanya pertumbuhan kalus pada luka sambungan pada minggu ke-3 serta terbukanya daun dengan sempurna pada minggu ke-5-6.

Berdasarkan penelitian ini, diperoleh informasi bahwa jumlah daun lebih banyak pada perlakuan batang atas yang berasal dari planlet dan berbeda

Tabel 3. Rerata jumlah daun/tanaman umur 1-10 BSP (The average of leaves at plant 1-10 MAG)

Perlakuan (Treatments)	Rerata jumlah daun pada tanaman umur 1-10 bulan (The average number of leaves at plant 1-10 months old)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
E _K	2,6 tn(ns)	3,2 tn(ns)	3,3 tn(ns)	3,8 tn(ns)	4,1 tn(ns)	4,2 tn(ns)	4,0 tn(ns)	4,6 b	4,8 b	5,1 b
P _K	3,5	4,1	4,6	4,9	5,3	5,9	5,9	6,55a ^{*)}	6,5 a	6,6 a

Tabel 4. Rerata tinggi tanaman umur 1-10 BSP (The average of plant height at 1-10 MAG)

Perlakuan (Treatments)	Rerata tinggi tanaman pada umur 1-10 bulan (The average of plant height at 1-10 months old), mm									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
E _K	5 tn(ns)	6 tn(ns)	6 tn(ns)	8 tn(ns)	8 tn(ns)	10 tn(ns)				
P _K	8,0	9,0	10,0	13,0	14,0	18,0	20,0	22,0	22,0	23,0

nyata sejak di atas umur 7 bulan, sedangkan pada parameter tinggi tanaman, perlakuan planlet dan embrio sebagai batang atas tidak berpengaruh nyata (Tabel 3 dan 4).

Hal ini diduga disebabkan bahan planlet yang disambungkan ukurannya pada awal penyambungan lebih besar dibandingkan embrio. Sesuai dengan hasil penelitian Yildirim *et al.* (2010) pada *micrografting in vitro* almond, di mana jumlah daun yang dihasilkan tanaman hasil sambungannya lebih banyak apabila ukuran batang atas pucuk tanaman yang disambungkan lebih panjang.

Kegiatan Penyambungan Ex Vitro

Persentase Sambungan Jadi/hidup

Berdasarkan hasil analisis statistik, diperoleh informasi bahwa tidak ada interaksi antara perlakuan batang bawah dengan batang atas, namun secara terpisah persentase sambungan jadi (hidup) pada tanaman umur 1-10 bulan juga tidak berbeda nyata pada perlakuan batang bawah maupun batang atas yang berbeda (Tabel 5). Walaupun pada setiap jenis perlakuan batang bawah maupun atas yang digunakan tidak berbeda nyata, namun tampak bahwa penggunaan batang bawah hasil semai biji berumur 8 bulan setelah sebar, menghasilkan persentase tumbuh yang relatif lebih tinggi. Demikian

pula penggunaan planlet sebagai batang atas, juga relatif menghasilkan persentase tumbuh yang lebih memuaskan dibandingkan dengan penggunaan batang atas fase embrio.

Rendahnya tingkat keberhasilan pada perlakuan embrio sebagai batang atas juga dihasilkan pada penelitian Altaf *et al.* (2008). Dari hasil penyambungan dengan batang atas yang berasal dari embrio dan pucuk jeruk Kinnow pada batang bawah RL masing-masing diperoleh 138 dan 61,4% tanaman hidup. Hal ini diduga disebabkan karena embrio berasal dari pertumbuhan *single* sel, sehingga tidak dapat bertahan hidup pada lingkungan yang relatif panas.

Tinggi Tanaman

Berdasarkan hasil analisis statistik diperoleh bahwa tidak ada interaksi antara perlakuan batang bawah dengan batang atas, namun secara terpisah tinggi tanaman sampai dengan umur 10 BSP dipengaruhi sangat nyata oleh penggunaan batang bawah, sedangkan pada umur 9 bulan, tinggi tanaman berbeda nyata pada penggunaan batang bawah asal semai dengan batang bawah yang berasal dari aklimatisasi planlet umur 4 bulan (Gambar 3 dan 4). Penggunaan batang bawah JC asal semai biji (8+) mendorong terjadinya pertumbuhan tinggi tanaman yang lebih baik dan berbeda nyata dibandingkan dua jenis lainnya

Tabel 5. Rerata persentase sambungan jadi pada tanaman umur 1, 4, 7, dan 10 BSP (The average of percentage successful grafted at plant 1, 4, 7, and 10 MAG)

Perlakuan (Treatments)	Rerata persentase sambungan jadi (The average of percentage successful grafted), bulan (months) ^a				
	1	4	7	10	
Batang bawah (Rootstock)		%.			
P ₄	100,0 ^{tn(ns)}	70,8 ^{tn(ns)}	66,7 ^{tn(ns)}	62,5 ^{tn(ns)}	
P ₈	95,8	75,0	70,8	70,8	
S ₈	100,0	100,0	100,0	95,8	
KK (CV), %	9,12	23,12	20,57	26,06	
Batang atas (Scion)					
E _K	97,2 ^{tn(ns)}	77,8 ^{tn(ns)}	72,2 ^{tn(ns)}	69,4 ^{tn(ns)}	
P _K	100,0	86,1	86,1	83,3	
KK (CV), %	4,71	17,38	13,20	17,95	

KK (CV) = Koefisien Keragaman (Coefficient of Variation)

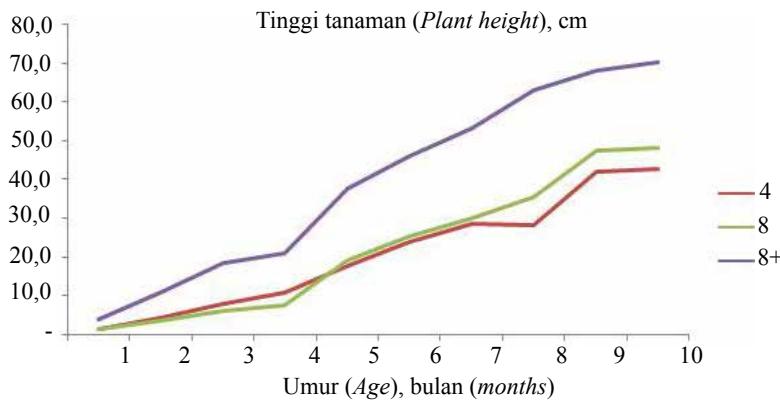
P₄ = Planlet 4 bulan aklimatisasi (Four months acclimated plantlet)

P₈ = Planlet 8 bulan aklimatisasi (Eight months acclimated plantlet)

S₈ = Semai 8 bulan setelah sebar (Eight months seedling plant)

E_K = Embrio Kalamondin (Calamondin embryo)

P_K = Planlet Kalamondin (Calamondin plantlet)



Gambar 3. Rerata tinggi tanaman pada umur 1-10 BSP pada perlakuan batang bawah (The average of plant height at 1-10 MAG on rootstocks treatment)



Gambar 4. Tanaman hasil sambung antara planlet JC aklimatisasi 4 bulan + embrio, semai JC + embryo, dan semai JC + planlet Kalamondin umur 10 BSP (Ten months grafted plants derived from 4 months acclimated JC plantlet + embryo, seedling JC+embryo and seedling JC + plantlet of Calamondin)



Gambar 5. Perakaran batang bawah tanaman hasil sambung antara (Rooting of plant rootstock grafted between): (a) planlet JC aklimatisasi 4 bulan + planlet Kalamondin dan (plants derived from 4 months acclimated JC plantlet + Calamondin plantlet and) (b) semai JC + embryo Kalamondin umur 10 BSP (seedling JC + Calamondin embryo)

sampai 10 BSP, sedangkan penggunaan JC asal planlet 4 dan 8 BSA sebagai batang bawah, menghasilkan pertumbuhan tinggi tanaman Kalamondin yang relatif sama.

Hal ini diduga disebabkan karena perakaran yang terbentuk pada batang bawah asal semai

relatif lebih baik dibandingkan dengan yang berasal dari aklimatisasi planlet asal perbanyakan SE (Gambar 5). Penggunaan batang atas yang berasal dari embrio dan planlet tidak memengaruhi pertumbuhan tinggi tanaman mulai umur 1-10 BSP (Tabel 6).

**Tabel 6. Rerata tinggi tanaman pada tanaman umur 1-10 BSP pada perlakuan batang atas
(The average of plant height at 1-10 MAG at scions treatments)**

Perlakuan batang atas (Scion treatments)	Rerata jumlah daun/tanaman pada 1-10 BSP (The average of leaves number/plant at 1 to 10 MAG)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Embrio (Embryo)	1,6 tn (ns)	4,3b	8,7b	11,6b	22,2 tn (ns)	29,6 tn (ns)	35,2 tn (ns)	42,6 tn (ns)	53,2 tn (ns)	54,3 tn (ns)
Planlet (Plantlet)	3,0	8,3a	13,2a	14,8a	27,5	34,0	39,4	41,9	51,6	53,1
KK (CV), %	29,63	24,31	19,23	10,10	13,82	12,87	10,95	11,87	11,69	12,16

Jumlah Daun/tanaman

Berdasarkan hasil analisis statistik diperoleh bahwa tidak ada interaksi antara perlakuan batang bawah dengan batang atas, namun secara terpisah jumlah daun dipengaruhi secara nyata dengan penggunaan batang bawah yang berbeda sampai dengan tanaman umur 10 bulan. Hasil terbaik berasal dari tanaman yang menggunakan batang bawah JC semaian biji umur 8 bulan (S₈). Penggunaan batang atas yang berasal dari embrio dan planlet tidak memengaruhi jumlah daun yang tumbuh sampai dengan umur 10 bulan (Tabel 7).

Pada penggunaan batang bawah yang berbeda, jumlah daun berbeda nyata sampai dengan umur 10 bulan, sama dengan parameter tinggi tanaman. Pada tanaman yang tumbuh normal, jumlah daun seiring dengan tinggi tanamannya.

Diameter Batang Tanaman

Berdasarkan hasil analisis statistik diketahui bahwa tidak ada interaksi antara perlakuan batang bawah dengan batang atas namun secara terpisah diameter tanaman sampai dengan umur 10 BSP tidak dipengaruhi oleh penggunaan batang bawah dan batang atas. Pada awal pertumbuhan sampai dengan umur 4 BSP, diameter tanaman

dipengaruhi secara nyata oleh penggunaan batang bawah, namun setelah itu perlakuan tersebut tidak berpengaruh sama sekali (Tabel 8).

Penggunaan batang atas yang berasal dari embrio dan planlet, pada awalnya berpengaruh terhadap semua parameter pertumbuhan. Apabila eksplan yang disambung pada batang bawah sudah pada fase planlet, maka pertumbuhan tanaman lebih cepat dibandingkan dengan menggunakan eksplan dalam fase embrio, sedangkan pada pertumbuhan selanjutnya, perbedaan batang atas tidak berpengaruh. Menurut Aloni *et al.* (2010) tanaman hasil sambungan dapat tumbuh baik bila kedua jaringan vaskular tersambung sempurna. Pada proses pertautan, regenerasi jaringan vaskular merupakan proses yang sangat kompleks meliputi tahapan diferensiasi jaringan parenkim pada pertautan irisan batang atas dan batang bawah menjadi xilem dan floem. Proses tersebut diawali dengan terjadinya pertumbuhan kalus (jembatan kalus) pada kedua penampang irisan tersebut (Hartman dan Kester 1983). Menurut Gokbayrak *et al.* (2007) tingkat pertautan atau kompatibilitas antara batang bawah-kultivar anggur diduga sangat ditentukan oleh profil protein total dan *acid phosphatase* (AcPH). Penggunaan planlet sebagai batang atas lebih

Tabel 7. Rerata jumlah daun/tanaman pada 1-10 BSP (The average of leaves number/plant at 1 to 10 MAG)

Perlakuan (Treatments)	Rerata jumlah daun/tanaman pada 1-10 BSP (The average of leaves number/plant at 1 to 10 MAG)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Batang bawah (Rootstock)										
P ₄	4,13 ab*	6,92 b	9,43 b	9,86 b	10,15 b	13,99 b	19,08 b	20,33 b	22,68a	20,33 b
P ₈	3,25 b	4,46 c	6,76 b	8,75 b	8,83 b	12,47 b	17,78 b	19,81 b	25,07a	25,47 ab
S ₈	4,97 a	9,29 a	14,43 a	16,78 a	16,90 a	20,08 a	27,42 a	30,32 a	34,43 a	34,61 a
KK (CV), %	15,01	13,31	12,74	13,70	13,85	10,63	13,41	11,69	21,43	15,60
Batang atas (Scion)										
E _K	3,09 a	5,69 a	8,97 a	10,15 a	10,20 b	13,86 b	21,19 a	22,75 a	27,84 a	29,08 a
P _K	5,14 a	8,08 a	11,44 a	13,44 a	13,70 a	17,17 a	21,67 a	24,22 a	26,94 a	27,11 a
KK (CV), %	17,34	16,68	16,30	7,99	7,64	7,64	10,09	4,27	12,91	17,61

Tabel 8. Rerata diameter tanaman sambungan pada 4, 7, dan 10 BSP (The average of diameter grafted plant at 4, 7, and 10 MAG)

Perlakuan (Treatments)	Rerata diameter tanaman pada 4, 7, dan 10 BSP (The average of diameter plant at 4, 7, and 10 MAG), cm		
	4	7	10
Batang bawah (Rootstock)			
P ₄	0,25 b*)	0,37 ^{tn (ns)}	0,50 ^{tn (ns)}
P ₈	0,23 b	0,38	0,57
S ₈	0,40 a	0,50	0,73
KK (CV), %	17,77	13,95	21,80
Jenis batang atas (Scion)			
E _K	0,27 ^{tn (ns)}	0,43 ^{tn (ns)}	0,63 ^{tn (ns)}
P _K	0,32	0,40	0,57
KK (CV), %	4,90	12,13	10,59

baik karena eksplan mempunyai jaringan yang lebih sempurna dibandingkan embrio, sehingga pada awal pertumbuhan, proses pertautan antara batang atas dan bawah dapat lebih cepat.

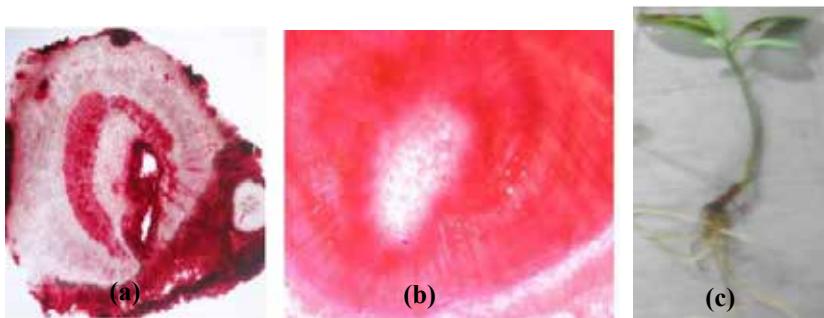
Penggunaan batang bawah yang berasal dari semaian dapat mendorong pertumbuhan secara keseluruhan, baik tinggi tanaman maupun diameter batang tanaman hasil sambungan. Menurut Singh *et al.* (2003), dengan umur yang sama pada awal pertumbuhan, perkembangan planlet dan semaian jeruk berbeda secara nyata, planlet jeruk yang diaklimatisasi berkembang lebih lambat dibandingkan semaian. Hal ini disebabkan terbatasnya nutrisi pada planlet bila dibandingkan dengan tanaman yang berasal dari semaian biji karena semaian tersebut mempunyai cadangan makanan yang berasal dari kotiledon.

Namun dengan selang waktu yang lebih lama, pertumbuhan pada batang atas maupun bawah relatif sama, hingga pada akhir pengamatan (umur 9-10 BSP) pertumbuhan tanaman, baik tinggi, jumlah daun maupun diameter tanaman tidak dipengaruhi lagi oleh perlakuan keduanya yang berbeda.

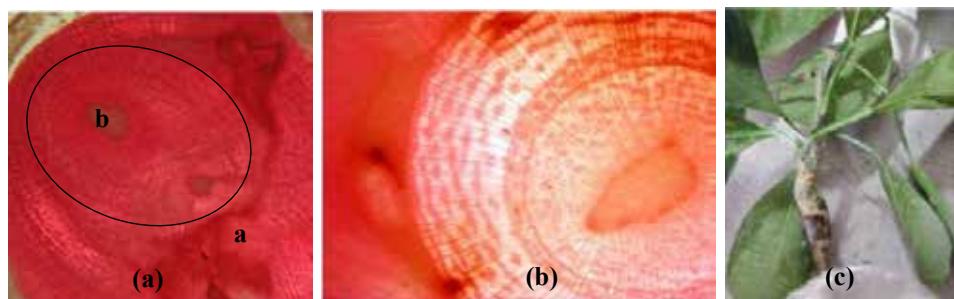
Histologi Sambungan antara Batang Atas Kalamondin dan Batang Bawah JC

Hasil Sambungan In Vitro

Dari hasil pengamatan histologi, diperoleh bahwa pertautan antara planlet JC dengan Kalamondin hasil *grafting* belum sempurna. Hal ini ditunjukkan oleh belum menyatunya kulit batang dari jaringan floem dan xilem



Gambar 6. Histologi sambungan in vitro antara (a) planlet Kalamondin + planlet JC, (b) embrio Kalamondin + planlet JC, dan (c) tanaman hasil sambungan in vitro (in vitro grafted plant)



Gambar 7. Histologi pada bagian (Histology of) (a) sambungan batang bawah hasil aklimatisasi 4 bulan planlet JC + planlet Kalamondin (grafted plant between JC rootstock derived from 4 months-acclimated plantlet + Calamondin plantlet), (b) Semaian JC + planlet Kalamondin (JC seedling + Calamondin plantlet), dan (c) bagian tanaman yang dianalisis (part of grafted plant that had been analyzing)

dari dua batang yang tergabung. Pada Gambar 6a menunjukkan bahwa pada xilem induk batang bawah (a) terdapat rongga-rongga udara yang kemungkinan terbentuk pada saat proses penggabungan antarbatang. Pada batang atas (b) tidak nampak jelas pembentukan berkas pembuluh yang sempurna. Hal inilah yang diduga menyebabkan persentase kematian lebih tinggi pada hasil sambungannya dibandingkan tanaman hasil sambungan antara embrio Kalamondin dengan planlet JC yang relatif lebih sempurna pertautannya (Gambar 6b). Hal ini ditunjukkan dengan menyatunya dua cambium dari dua batang yang tergabung, begitu juga pada bagian pembuluh xilem.

Hasil Sambungan Ex Vitro

Pada penyambungan ex vitro antara planlet/embrio pada batang bawah JC hasil perbanyakan SE yang diaklimatisasi maupun pada semaian, pertautan yang dihasilkan sempurna. Hal ini ditunjukkan dengan menyatunya bagian epidermis dan jaringan pembuluh floem serta xilem kedua batang tanaman yang tergabung (Gambar 7a dan 7b). Hal ini mendorong terjadinya pertumbuhan yang normal pada semua perlakuan.

KESIMPULAN

Hasil perbanyakan jeruk melalui SE, baik berupa embrio kotiledonari maupun planlet dapat difungsikan sebagai batang atas. Daya tumbuh tanaman jeruk hasil sambungan antara Kalamondin

(*C. mitis* Blanco) hasil perbanyakan SE pada batang bawah JC secara ex vitro lebih baik dibanding in vitro. Pada penyambungan in vitro, sampai dengan umur 10 BSP, persentase sambungan yang jadi (hidup) dipengaruhi oleh jenis batang atas yang digunakan, yaitu penggunaan planlet sebagai batang atas menyebabkan persentase yang hidup lebih rendah dibandingkan penggunaan embrio. Pada penyambungan ex vitro, tidak ada interaksi pengaruh antara perlakuan batang bawah dengan batang atas pada semua parameter pengamatan. Pembentukan pertautan jaringan pada semua perlakuan adalah sempurna, yaitu ditandai dengan menyatunya bagian epidermis dan jaringan pembuluh floem serta xilem kedua batang tanaman, kecuali pada sambungan in vitro yang batang atasnya berupa planlet.

PUSTAKA

1. Aloni, B., R. Cohen, L. Karni, H. Aktas, and M. Edelstein. 2010. Hormonal Signaling in Rootstock-scion Interactions. *Scientia Horticulturae*. 127: 119-126 2.
2. Altaf, N., A. R. Khan, L. Ali, and I. A. Bhatti. 2008. Studies Grafting Methods of Low Seeded Kinnow Lemon (*Citrus jambheri* Lush.). *American-Eurasian J. Agric & Environ. Sci.* 3(3): 339-342
3. Channuntapipat, C., M. Sedgley, and G. Collins. 2003. Micropropagation of Almond Cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the Hybrid Rootstock Titan X Nemaguard. *Scientia Horticulturae*. 98: 473-483
4. Estrada-Luna, A.A., C. Lopez-Peralta, and E. Cardenas-Soriano. 2002. In Vitro Micrografting and Histology of Graft Union Formation of Selected Species of Prickly Pear Cactus (*Opuntia* spp). *Scientia Horticulturae*. 92: 317-327

5. Gokbayrak, Z., G. Soylemezoglu, M. Akkurt, and H. Celik. 2007. Determination of Grafting Compatibility of Grapevine with Electrophoretic Methods. *Scientia Horticulturae*. 113 : 343-352.
6. Hartman, H.T and D.E. Kester. 1983. *Plant Propagation. Principles and Practices*. Prentice-Hall, Ink., New Jersey.727 pp.
7. Kadlecik, P., I. Ticha, D. Haisel, V. Capkova, and C. Schater. 2001. Importance of In Vitro Pretreatment for Ex Vitro Acclimatization and Growth. *Plant Sci.*161:695-701
8. Nas, M.N. and P.E. Read. 2003. Simultaneous Micrografting, Rooting, and Acclimatization of Micropropagated American Chestnut, Grapevine, and Hybrid Hazelnut. *Europ. J. Hort. Sci.* 68(5): 234-237
9. Ollitrault, P. 1990. Somatic Embryo Grafting, A Promising Technique for Citrus Breeding and Propagation. *ICSN 3rd Congres, Australia*. July 1990. 10 pp
10. Pathirana, R. and M. J. McKenzie. 2005. A Modified Green-grafting Technique for Large-scale Indexing of Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*. 107 : 97-102
11. Singh, I.P., V.A. Parthasarathy, and P.J. Handique. 2003. Comparative Growth of Micropropagated Plantlets and Seedlings of Citrus Varieties. *Agrotropica* 15(1):9-16
12. Thimmappaiah, G.T. Puthra, and S.R. Anil. 2002. In Vitro Grafting of Cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Scientia Horticulturae*. 92:177-182.
13. Yildirim, H., A. Onay, V. Suzerer, E. Tilkat, Y. Ozden-Tokatli, and H. Akdemir. 2010. Micrografting of Almond (*Prunus dulcis* Mill.) Cultivars Ferragnes and Ferraduel. *Scientia Horticulturae*. 125: 361-367