

Pengaruh Densitas Awal Kalus dalam Perbanyakan Melalui Embriogenesis Somatik terhadap Daya Multiplikasi dan Stabilitas Genetik Planlet Siam Kintamani

Devy, NF, Yulianti, F, dan Hardiyanto

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No 1, Junrejo, Batu 65301
Naskah diterima tanggal 18 Juli 2012 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 15 Oktober 2012

ABSTRAK. Optimasi metode pada setiap tahapan perbanyakan melalui embriogenesis somatik perlu dilakukan, mencakup aspek eksplan, media, dan lingkungan tumbuh. Tujuan penelitian ialah mengetahui pengaruh kepadatan awal (*initial density*) kalus dalam kultur embriogenesis somatik terhadap laju multiplikasi dan stabilitas genetik planlet yang dihasilkan dari perbanyakan dengan metode SE pada tanaman siam Kintamani. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium SE, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) mulai Bulan Maret 2009 sampai dengan Februari 2011. Penelitian terdiri atas dua tahap, yaitu (1) perlakuan densitas awal dan (2) analisis stabilitas genetik planlet yang dihasilkan dari perbanyakan SE siam Kintamani. Kegiatan I terdiri atas lima perlakuan densitas kalus (ID_{100} – ID_{300}), yaitu 100, 150, 200, 250, dan 300 mg yang dikulturkan pada 25 ml media cair MS + 500 mg/l malt ekstrak (ME) + 1,5 mg/l BA, yang disusun dalam rancangan acak kelompok dengan tiga ulangan, tiap ulangan terdiri atas lima erlenmeyer, sedangkan pada penelitian analisis stabilitas genetik, sampel yang digunakan ialah tanaman hasil perbanyakan SE pada stadia planlet hasil subkultur 1–6. Planlet tersebut diuji keragamannya dengan teknik PCR menggunakan penanda *inter-simple sequence repeat* (ISSR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa, jaringan nuselus yang digunakan sebagai eksplan dapat tumbuh dengan memuaskan pada 12–45 hari setelah kultur pada media inisiasi kalus. Pertambahan berat basah kalus pada setiap subkultur sangat beragam. Pertambahan berat basah tertinggi terjadi pada ID_{100} subkultur ke-5, sedangkan pertambahan berat secara total tertinggi ditemukan pada perlakuan ID_{200} . Tanaman hasil perbanyakan SE pada stadia planlet secara genetik seragam dengan induknya. Namun pengujian stabilitas genetik pada tanaman hasil SE masih harus terus dilakukan seiring dengan semakin lama tanaman dipelihara di dalam kultur, mengingat frekuensi mutasi dapat meningkat seiring dengan semakin lamanya periode kultur. Implikasi hasil penelitian ini ialah proses multiplikasi kalus dan induksi embriogenesis somatik berlangsung optimal dan tidak mengakibatkan *off-type* pada tanaman yang dihasilkan.

Katakunci: Siam Kintamani (*Citrus suhuiensis* cv. Kintamani); Densitas kalus; ISSR; PCR; Planlet; Embriogenesis somatik

ABSTRACT. Devy, NF, Yulianti, and Hardiyanto 2012. **Effect of Callus Initial Density on Multiplication via Somatic Embryogenesis and Genetic Stability of Kintamani Tangerine Plantlets.** The optimization of the whole stage on *in vitro* multiplication via somatic embryogenesis must be done in the explants, media, and growth environment factors. The aim of this experiment to determine the effect of callus initial density in somatic embryogenesis culture on multiplication rate and plantlet genetic stability resulted from somatic embryogenesis method on Kintamani tangerin. The research was conducted at SE Laboratory of Indonesian Citrus and Subtropical Fruit Research Institute (ICISFRI) from March 2009 up to February 2011. The research consisted of two activities, namely: (1) initial density treatments and (2) analysis of genetic stability of Kintamani tangerin plantlets resulting from SE. The 1st activity consisted of five treatments callus density (ID_{100} - ID_{300}), namely 100, 150, 200, 250, and 300 mg of callus that cultured in 25 ml of liquid MS medium + 500 mg/l malt extract (ME) + 1.5 mg/l BA, using a randomized block design, three replicates with five erlenmeyers units, while at the analysis of genetic stability research, the samples used were plantlet-stadia derived from 1st up to 6th subculture. The variability of those plantlets was tested by PCR using inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. The results showed that nucellus tissue that used as explants can be grown satisfactorily in 12–45 days after culture at the callus initiation media. The fresh weight of callus increment on each subculture was very diverse. The highest fresh weight value was found in ID_{100} treatment in the fifth subculture. However, the highest of total weight increment was in ID_{200} treatment. The SE-derived plant was genetically uniform with its parent. However, genetic stability testing on the SE-derived plants should be still continued because it would give enhancement of the frequency of mutations with longer periods of culture. The implication of the research was optimum process of callus multiplication and somatic embryogenesis induction and did not result in off-type plants.

Keywords: Kintamani tangerin (*Citrus suhuiensis* cv. Kintamani); Callus density; ISSR; PCR; Plantlets; Somatic embryogenesis

Jeruk siam Kintamani (*Citrus suhuiensis* cv. siam Kintamani) merupakan jeruk yang sangat populer dan umumnya ditanam di dataran tinggi Kintamani, Bali. Seperti umumnya jeruk yang ditanam di dataran tinggi, jeruk ini mempunyai kulit kuning cerah dan rasa yang segar. Siam Kintamani umumnya diperbanyak dengan cara menyambung/menempel mata tempel pada batang bawah JC. Dengan meningkatnya permintaan benih serta untukantisipasi kebutuhan, diperlukan benih yang mencukupi. Untuk itu perlu didukung oleh metode penyediaan benih secara cepat dan masal, bebas dari penyakit virus, dan stabil secara genetik.

Perbanyakan masal dapat dilakukan melalui teknologi embriogenesis somatik menggunakan eksplan kalus yang berasal dari berbagai sumber eksplan. Hasil penelitian tentang teknologi ini telah banyak didokumentasikan dengan berbagai aspek yang memengaruhi tingkat keberhasilannya. Secara umum hal-hal yang berpengaruh tersebut antara lain ialah media kultur (Cunha & Fernandes-Ferreira 2010, Kayim & Kemal Koc 2006, Niedz & Evens 2008, Niedz *et al.* 2002, Sing *et al.* 1992, Tomas *et al.* 2001), varietas atau spesies, kondisi kalus (De Pasquale *et al.* 1994, Han *et al.* 2002, Mendes-da-Gloria *et al.* 1999,



Ricci *et al.* 2002), serta densitas kalus maupun suspensi sel yang dikulturkan (Kobayashi *et al.* 1999).

Densitas awal sel merupakan salah satu faktor penting dalam kultur pada media cair. Secara umum, sel berproliferasi secara aktif pada densitas sel yang tinggi. Penambahan media dapat meningkatkan aktivitas mitogenik dalam sel. Densitas sel juga berpengaruh terhadap induksi embriogenesis somatik, namun densitas sel yang tinggi dapat menghambat proses embriogenesis somatik (Umehara *et al.* 2004). Oleh karena itu diperlukan densitas awal kalus yang tepat agar diperoleh proliferasi dan induksi embriogenesis somatik yang optimal.

Dari kegiatan perbanyakan menggunakan metode SE, tanaman yang dihasilkan sama dengan induknya karena berasal dari jaringan somatik. Untuk menentukan variabilitas yang terjadi, deteksi keseragaman maupun deteksi *off-type* pada tanaman tersebut dapat dilakukan melalui observasi morfologi dan analisis kromosom. Namun teknologi ini mengalami beberapa keterbatasan seperti waktu evaluasi yang cukup lama apabila dilakukan sampai tanaman dewasa. Sebagai penggantinya, teknologi *fingerprinting* menggunakan penanda DNA dapat digunakan untuk mendeteksi keseragaman tanaman produk perbanyakan tanaman, baik melalui teknologi *in vitro* maupun secara konvensional (Fang *et al.* 1997, Scarano *et al.* 2002, Tusa *et al.* 2002). Dari berbagai penelitian dengan metode tersebut diperoleh bahwa tanaman hasil perbanyakan dengan metode embriogenesis somatik menghasilkan tanaman yang bersifat *true-to-type* dengan induknya (Chandrika & Rai 2009, Chakravarty & Goswami 1999, Devarumath *et al.* 2007, Hashmi *et al.* 1997, Leroy *et al.* 2000, Munthali *et al.* 1996, Rahman & Rajora 2001, Rani *et al.* 1995).

Tujuan penelitian ialah mengetahui pengaruh kepadatan awal (*initial density*) kalus dalam kultur embriogenesis somatik terhadap laju multiplikasi dan stabilitas genetik planlet yang dihasilkan dari perbanyakan dengan metode SE pada tanaman siam Kintamani. Hipotesis yang diajukan ialah bahwa densitas awal kalus dapat sangat berpengaruh terhadap laju multiplikasi kalus, sedangkan tanaman yang dihasilkan dari perbanyakan SE secara genetik sama dengan induknya.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Maret 2009 sampai dengan Februari 2011 di Laboratorium SE Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika. Bahan

tanaman yang digunakan ialah jaringan nuselus yang berasal dari biji buah jeruk siam Kintamani berumur 10–14 minggu setelah bunga mekar. Jaringan nuselus dikulturkan secara *in vitro* pada media inisiasi, yaitu media MS padat yang terdiri atas garam MS makro dan mikro, sukrose 50 g/l, tiamin-HCl 0,2 mg/l, piridoksin-HCl 1 mg/l, asam nikotinic 1 mg/l, myoinositol 100 mg/l, dan glisin 4 mg/l, dan bacto agar 7 g/l, dengan pH medium 5,7. Kalus yang tumbuh dipelihara dan disubkulturkan setiap 2 minggu pada media MS + 0,7% agar + 5% sukrose + 1,5 mg/l BA + 500 mg/l ME.

Daya Multiplikasi Kalus Siam Kintamani

Kalus diperbanyak dengan dikulturkan pada media cair MS standar + 0,7% bacto agar + 5% sukrose + 1,5 mg/l BA + 500 mg/l ME. Untuk mengamati laju multiplikasi yang optimal, maka kalus dikultur dengan tingkat kepadatan awal yang berbeda pada erlenmeyer 100 ml dan di-*shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam pada suhu ruang.

Adapun perlakuan ialah tingkat densitas awal sebagai berikut: (1) 100 mg dalam 25 cc media (ID_{100}), (2) 150 mg dalam 25 cc media (ID_{150}), (3) 200 mg dalam 25 cc media (ID_{200}), (4) 250 mg dalam 25 cc media (ID_{250}), dan (5) 300 mg dalam 25 cc media (ID_{300}). Pengamatan dilakukan terhadap pertambahan berat kalus embriogenik setiap subkultur (setiap 2 minggu) dengan cara menimbang berat kalus serta histologi dari kalus embriogenik pada akhir pengamatan. Analisis histologi dilakukan di Laboratorium Mikroteknik, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.

Data yang dianalisis:

1. Pertambahan berat basah kalus pada setiap subkultur: dihitung dengan cara mengurangi berat total kalus pada subkultur saat itu dengan berat total kalus pada subkultur sebelumnya (misalnya pertambahan berat basah kalus pada subkultur II = berat total kalus subkultur II - berat total kalus pada subkultur I dst.).
2. Pertambahan total berat kalus pada setiap subkultur: dihitung dengan cara mengurangi berat total kalus pada subkultur saat itu dengan berat total kalus pada awal kultur.

Pada:

V_{100} = Berat kalus pada setiap saat subkultur - 100 mg (berat kalus awal)

V_{150} = Berat kalus pada setiap saat subkultur - 150 mg (berat kalus awal)

V_{200} = Berat kalus pada setiap saat subkultur - 200 mg (berat kalus awal)



V_{250} = Berat kalus pada setiap saat subkultur - 250 mg (berat kalus awal)

V_{300} = Berat kalus pada setiap saat subkultur - 300 mg (berat kalus awal).

3. Pertambahan total berat kalus pada setiap subkultur per 100 mg: dihitung dengan cara mengurangi berat total kalus pada subkultur saat itu dengan berat total kalus pada awal kultur (misalnya : berat total kalus subkultur II-berat total kalus pada awal kultur dst.). Dari nilai yang didapat, dikonversikan pada berat setiap 100 mg.

Pada:

V_{100} = mg tambahan berat kalus x 100 mg/100 mg

V_{150} = mg tambahan berat kalus x 100 mg/150 mg

V_{200} = mg tambahan berat kalus x 100 mg/200 mg

V_{250} = mg tambahan berat kalus x 100 mg/250 mg

V_{300} = mg tambahan berat kalus x 100 mg/300 mg

Untuk mengetahui pengaruh antarperlakuan terhadap semua parameter yang diamati, data yang terkumpul dianalisis dengan sidik ragam mengikuti rancangan acak kelompok, dengan tiga ulangan dan lima erlenmeyer setiap unitnya. Uji signifikansi perbedaan pengaruh perlakuan dilakukan menggunakan uji jarak berganda duncan pada taraf 5%.

Pengujian Keragaman Planlet Jeruk Hasil Embriogenesis Somatik (SE)

Kalus yang dihasilkan disubkultur pada media yang sama sampai subkultur ke-6. Embrio yang tumbuh dikulturkan sampai berkembang menjadi planlet pada media MS standar tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Planlet-planlet ini diuji keragamannya dengan teknik PCR menggunakan penanda *inter-simple sequence repeat* (ISSR). Tahapan pelaksanaan ialah sebagai berikut:

Ekstraksi, Isolasi, dan Kuantifikasi DNA

Sampel daun digerus menggunakan mortar dengan penambahan 400 μ l *buffer* ekstraksi sampai halus dan ditambahkan lagi 500 μ l *buffer* ekstraksi. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro (ependorf) ukuran 2 ml campuran hasil gerusan dan *buffer* ekstraksi diinkubasi pada suhu 65°C selama 15–30 menit dan setiap 5–10 menit tabung mikro dibolak-balik untuk membantu proses lisis. Setelah itu, campuran diambil dari *waterbath* dan didiamkan 2 menit pada suhu ruang kemudian ditambah Na-asetat 1/10 volume campuran dan 1 ml CHISAM (kloroform : isoamil alkohol 24 : 1). Penambahan dilakukan dalam *fume hood*. Campuran diaduk dengan baik dengan cara divortex selama 2–5 menit kemudian disentrifus selama 5 atau 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil secara hati-hati

menggunakan pipet dan dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru. Supernatan yang ditambah Na-asetat 1/10 x volume dan dicampur dengan baik, selanjutnya ditambah dengan isopropanol sebanyak 1/10 x volume atau etanol absolut 2,5 x volume untuk presipitasi DNA dan campur dengan membolak-balik tabung secara perlahan. Campuran disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 atau 10 menit untuk mengendapkan DNA. Cairan yang terbentuk dibuang dan endapan DNA dicuci dengan etanol 70% kemudian disentrifus lagi selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm. cairan dibuang dan endapan DNA dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 10 menit (bergantung besar kecilnya pelet). Setelah kering, endapan DNA dilarutkan kembali dengan 50-100 μ l *buffer* TE yang mengandung RNase (1 μ l). DNA diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan siap digunakan untuk proses selanjutnya (Doyle & Doyle 1990 dengan modifikasi).

Amplifikasi dan Separasi DNA

Program mesin PCR ialah 1 siklus denaturasi suhu 94°C selama 3 menit, diikuti dengan 28 siklus denaturasi suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* suhu 53°C selama 1 menit, dengan ekstensi suhu 72°C selama 2 menit. Siklus PCR untuk penanda ISSR diakhiri dengan 1 siklus ekstensi akhir dengan suhu 72°C selama 10 menit (Scarano et al. 2002).

Setiap sampel DNA dicampur dengan 20 μ l campuran yang mengandung 10 ng DNA genomik sebagai cetakan, 0,25 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), 0,5 pmol primer ISSR (Tabel 1), 1 unit Taq DNA polimerase dalam larutan *buffer* 1x dan 3 mM MgCl₂. Pemisahan pita DNA hasil amplifikasi dilakukan dengan metode elektroforesis pada gel agarose 2% yang mengandung etidium bromida (10 mg/l) di dalam larutan 0,5 x TBE selama 70 menit pada kekuatan arus 100 volt. Deteksi pita DNA dilakukan dengan sistem biodokumentasi.

Tabel 1. Penanda ISSR yang digunakan untuk amplifikasi DNA tanaman hasil SE (ISSR marker used for plant derived from DNA amplification from SE)

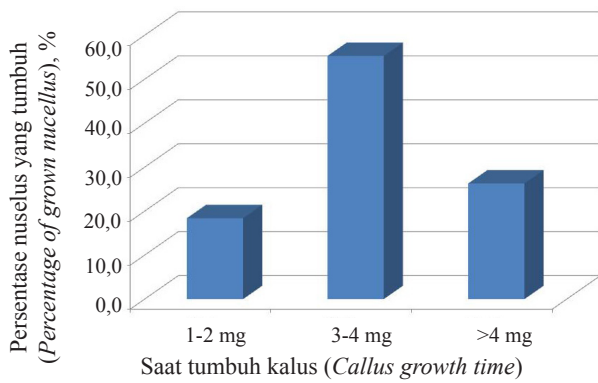
Nama primer (Primer name)	Sequence (Sequence)
ISSR 3	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AYG-3'
ISSR 4	5'- TCC TCC TCC TCC TCC RY-3'

HASIL DAN PEMBAHASAN

Saat Tumbuh Kalus

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jaringan nuselus siam Kintamani dapat tumbuh dan berkembang secara memuaskan, jaringan ini mulai tumbuh pada





Gambar 1. Persentase jumlah nuselus yang tumbuh (Percentage of grown nucellus)

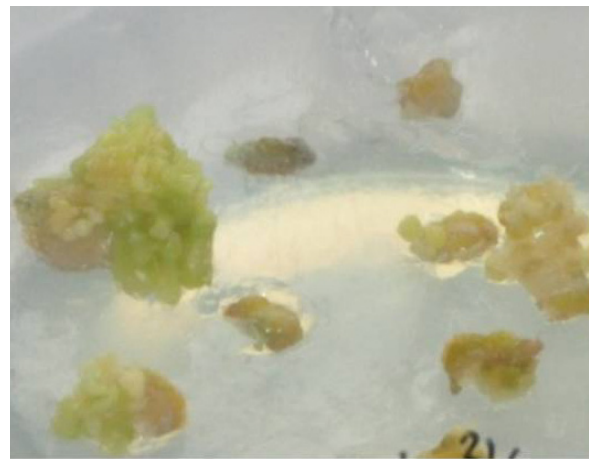
12–45 hari setelah kultur (atau rerata 24,5 hari) dengan persentase saat tumbuh nuselus paling tinggi pada 3–4 minggu (Gambar 1).

Pertumbuhan awal ditandai dengan munculnya kalus pada permukaan atas eksplan yang diikuti oleh tumbuhnya embrio (Gambar 2). Dari 131 jaringan nuselus yang dikulturkan, hanya 103 (78,6%) sampel yang tumbuh pada media inisiasi. Kalus yang tumbuh umumnya remah, putih kehijau-hijauan, serta beberapa embrio berkembang bersamaan dengan tumbuhnya kalus tersebut.

Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa persentase jaringan nuselus dari *C. macroptera* Mont yang tumbuh pada media inisiasi ialah 73,3%. Dari semua media yang diuji, media MS + 500 ppm ME merupakan media yang optimal (Miah *et al.* 2002), Di samping kalus yang tumbuh, beberapa embrio juga tumbuh dan berkembang pada media tersebut. Embrio tidak tumbuh pada media yang ditambah dengan zat pengatur tumbuh.

Pertambahan Berat Basah Kalus Setiap Subkultur

Pertambahan berat basah pada setiap subkultur dihitung dengan cara mengurangi berat total kalus pada subkultur saat itu dengan berat total kalus pada subkultur sebelumnya. Berdasarkan analisis statistika



Gambar 2. Kalus dan embrio yang tumbuh pada jaringan nuselus (Callus and embryo that grew from nucellus tissue)

diketahui bahwa pola pertambahan berat kalus per perlakuan sampai dengan lima kali subkultur sangat beragam. Namun apabila dilihat dari nilai pertambahan berat basah kalus diketahui bahwa pertambahan berat basah kalus tertinggi ditemukan pada perlakuan ID₂₀₀ (Tabel 2).

Kepadatan awal kultur sangat berpengaruh terhadap proliferasi maupun perkembangan eksplan yang dikulturkan. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Agisimanto *et al.* (2011), di mana laju multiplikasi dari kultur suspensi sel jeruk Limau Madu (*Citrus suhuiensis* Hort. Mantan Tanaka) sangat dipengaruhi oleh konsentrasi BAP, kerapatan awal sel serta sumber karbon yang digunakan pada media kultur. Kerapatan 2 mg/ml merupakan kerapatan optimal pada multiplikasi sel dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Dari hasil penelitian Umehara *et al.* (2005) pada kultur sel Larch Jepang (*Larix leptolepis* Gordon), embrio somatik sulit terbentuk ketika kepadatan sel awal lebih rendah dari 0,1 ml/l. Namun dengan ditambahkan Fitosulfokin, aktivitas pembelahan sel selama embriogenesis berlangsung normal kembali,

Tabel 2. Rerata pertambahan berat kalus pada setiap subkultur (The average of callus weight increment on each subculture)

Perlakuan (Treatments)	Pertambahan berat kalus pada setiap subkultur (The weight increment on each subculture), mg					Rerata (Average)
	I	II	III	IV	V	
ID ₁₀₀	21,96 c ^{*)}	17,60 c	39,60 c	14,40 ab	41,60 a	27,03
ID ₁₅₀	22,40 c	16,60 c	42,80 bc	15,36 a	26,96 b	24,82
ID ₂₀₀	92,92 a	24,40 b	50,80 b	12,16 ab	21,00 b	40,25
ID ₂₅₀	45,00 b	31,93 a	49,80 b	11,00 b	22,00 b	31,94
ID ₃₀₀	36,00 bc	15,24 c	62,20 a	6,08 c	24,20 b	28,74
KK (CV) , %	25,59	21,80	12,29	22,93	20,49	

^{*)} Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan's multiple range test 5% (Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different based on duncan's multiple range test 5%), KK (CV) = Koefisien keragaman (Coefficient variation)



Tabel 3. Rerata pertambahan berat kalus/100 mg pada setiap subkultur (The average of weight callus increment/100 mg at every subcultured)

Perlakuan (Treatments)	Pertambahan berat kalus per 100 mg pada setiap subkultur (The average of weight callus increment/100 mg at every subcultured), mg				
	I	II	III	IV	V
ID ₁₀₀	21,96 cd ^a	37,40 c	77,00 b	91,40 b	133,00 a
ID ₁₅₀	14,92 d	25,98 d	54,50 c	64,74 c	81,70 b
ID ₂₀₀	61,92 a	83,44 a	117,28 a	125,40 a	138,50 a
ID ₂₅₀	31,23 b	52,76 b	86,32 b	87,06 b	101,66 b
ID ₃₀₀	23,96 bc	34,13 cd	73,14 bc	77,22 bc	92,90 b
KK (CV), %	18,47	13,11	18,67	17,38	13,70

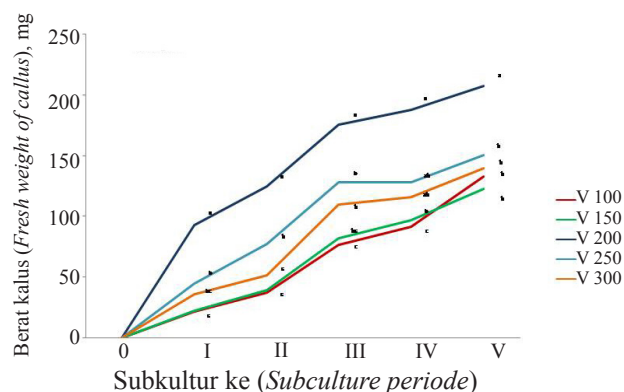
walaupun densitas awal kultur yang digunakan kurang dari optimal, sedangkan pada kultur dengan densitas yang terlalu tinggi, daya proliferasi eksplan menurun. Hasil yang sama didapat pula pada kultur wortel, embriogenesis somatik sangat terhambat bila densitas sel yang dikulturkan terlalu padat. Menurut Kobayashi *et al.* (1999), terhambatnya pertumbuhan sel disebabkan oleh adanya beberapa zat penghambat yang dilepaskan eksplan ke dalam media. Selain zat tersebut, kepadatan sel juga menekan terjadinya pembelahan sel pada awal proses embriogenesis somatik. Namun pada tahap proses perkembangan embrio tertentu, zat penghambat yang dilepaskan oleh sel ke dalam media tidak berpengaruh lagi terhadap pertumbuhan sel.

Pertambahan Berat Total dari Awal Tanam serta Pertambahan Berat Kalus Total Per 100 Mg Eksplan pada Setiap Subkultur

Dari analisis statistika, pertambahan berat total pada setiap subkultur (berat saat subkultur-berat awal kultur) berbeda nyata dan terbaik ada pada perlakuan ID₂₀₀ (Gambar 3).

Pertambahan berat basah tertinggi per 100 mg kalus yang dikulturkan secara konsisten ditemukan pada perlakuan ID₂₀₀ mulai dari subkultur ke-1 sampai ke-5 dibandingkan perlakuan lainnya (Tabel 3).

Penggunaan media cair pada perbanyakan kalus maupun embriogenesis somatik sangat dipengaruhi oleh komposisi maupun faktor lingkungan. Pada tanaman siam Kintamani, perlakuan sumber karbohidrat pada media cair berpengaruh nyata terhadap daya multiplikasi maupun perkembangan kalus menjadi embrio (Devy *et al.* 2011). Selain faktor media dan lingkungan lainnya, densitas awal tampaknya juga berpengaruh nyata terhadap kemampuan kalus jeruk siam Kintamani untuk berproliferasi. Hal ini ditunjukkan dengan penggunaan kepadatan awal sebesar 200 mg/25 cc media, kemampuan proliferasi per 100 mg lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini sesuai juga dengan penelitian produksi embrio somatik pada tanaman menggunakan



Gambar 3. Pertambahan berat kalus pada subkultur ke I s/d V pada lima perlakuan densitas awal (Callus weight increment on five treatments initial density at the 1st up to 5th subcultured)

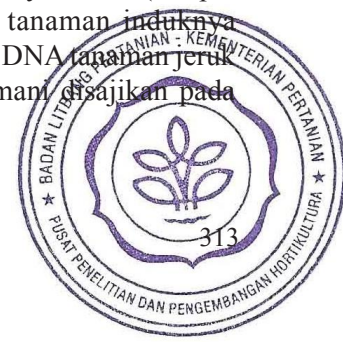
bioreaktor (Shigeta *et al.* 1996), di mana densitas awal kultur, pH, serta kadar oksigen yang dimasukkan pada sistem tersebut berpengaruh nyata terhadap produksi maupun kualitas embrio yang dihasilkan.

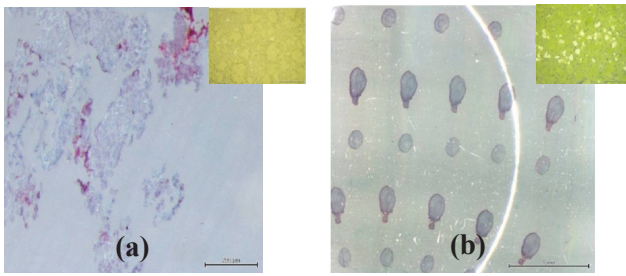
Analisis Histologi Kalus Embrionik

Hasil analisis histologi menunjukkan bahwa eksplan kalus dapat berproliferasi dan berkembang dengan baik pada perlakuan ID₂₀₀. Awal kultur kalus dengan kepadatan 200 mg menghasilkan struktur yang belum jelas, sedangkan pada perkembangan berikutnya, terbentuk struktur globular (Gambar 4). Menurut Tomaz *et al.* (2001), tingginya pertambahan kalus ini disebabkan karena daya multiplikasi yang tinggi pada media yang mengandung sukrose.

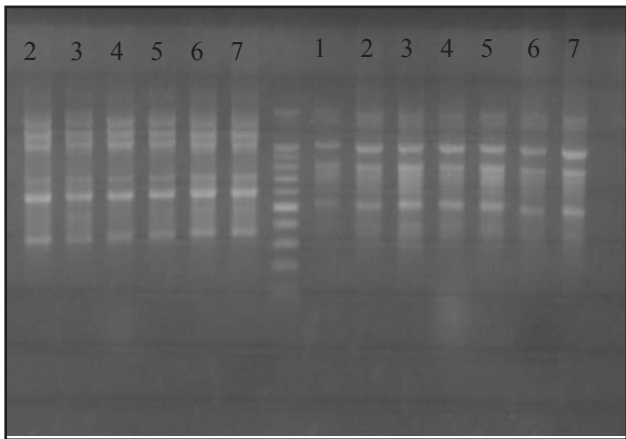
Pengujian Keragaman Planlet Jeruk Siam Kintamani Hasil SE

Pengujian dilakukan pada siam Kintamani stadia planlet (tanaman kecil) hasil perbanyakan SE (sampel no. 1–6) dibandingkan dengan tanaman induknya (sampel no. 7). Hasil amplifikasi DNA tanaman jeruk hasil SE dan induk siam Kintamani disajikan pada Gambar 5.





Gambar 4. Histologi kalus siam Kintamani saat dikulturkan (a) dan setelah subkultur ke-5 (b) (*Histology of Kintamani tangerin callus at first culture (a) and after fifth subculture (b)*)



Gambar 5. Pola pita DNA hasil amplifikasi dengan penanda ISSR 3 dan 4 (*Banding pattern of DNA amplification using ISSR 3 and 4 markers*)

Tanaman hasil SE seragam secara genetik dan tidak mengalami variasi dibandingkan dengan tanaman induknya. Hal ini ditunjukkan dengan adanya kesamaan pola pita DNA yang dihasilkan antara sampel yang diuji, yaitu planlet (no 1–6) dengan sampel induknya (no. 7). Hal ini dimungkinkan karena tanaman yang diuji merupakan tanaman hasil perbanyakan kalus yang relatif baru (belum banyak dilakukan subkultur). Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Chakravarty & Goswami (1999), yaitu kalus dari *C. acida* Roxb. sampai dengan umur 2 tahun masih mampu menumbuhkan embrio dan planlet, walaupun derajat regenerasi pucuk dan akar berkurang dengan bertambahnya umur kalus. Namun, hasil studi histologi menunjukkan bahwa jumlah kromosom tanaman yang dihasilkan dari perbanyakan ini tidak berubah/sama dengan induknya. Demikian pula pada kalus anggur Red Mars yang berumur 1 tahun. Analisis menggunakan 102 penanda RAPD menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan pola pita DNA yang dihasilkan antara induk dengan embrio hasil perbanyakannya asal kalus umur 1 tahun (Hao *et al.* 2004).

Pengujian stabilitas genetik pada tanaman hasil SE masih harus terus dilakukan seiring dengan semakin lama eksplan kalus atau embrio dipelihara di dalam kultur, mengingat frekuensi mutasi dapat meningkat seiring dengan semakin lama periode kultur (Muller *et al.* 1990, Nehra *et al.* 1992). Stabilitas genetik tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan, periode kultur, genotip tanaman, kondisi kultur, dan metode regenerasi tanaman (Route *et al.* 2006). Menurut Potter & Jones (1991), frekuensi variasi somaklonal pada tanaman yang dihasilkan melalui kalus lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman yang dihasilkan dari kultur meristem.

KESIMPULAN

1. Kepadatan awal (inisial densitas) kultur sangat berpengaruh terhadap kemampuan eksplan kalus untuk berproliferasi. Pertambahan berat total (subkultur 1–5) tertinggi ditemukan pada perlakuan ID₂₀₀ dibandingkan dengan empat perlakuan lainnya,
2. Tanaman hasil perbanyakan SE pada stadia planlet seragam secara genetik dan tidak mengalami variasi dibandingkan dengan tanaman induknya. Implikasi hasil penelitian ini ialah proses multiplikasi kalus dan induksi embriogenesis somatik berlangsung optimal dan tidak mengakibatkan *off-type* pada tanaman yang dihasilkan.

PUSTAKA

1. Agisimanto, D, Mohd Noor, N, Ibrahim, R & Mohamad, A 2011, 'Efficient somatic embryo production of Limau madu (*Citrus suhuiensis* Hort. ex Tanaka) in liquid culture', *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 12, pp. 2879-88.
2. Cabasson, C, Alvard, D, Dambier, PD, Ollitrault & Teisson, C 1997, 'Improvement of citrus somatic embryo development by temporary immersion', *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.*, no. 50, pp. 33-7.
3. Chakravarty, B & Goswami, BC 1999, 'Plantlets regeneration from long-term callus culture of *Citrus acida* Roxb. and the uniformity of regenerated plants', *Scientia Horticulturae*, no. 82, pp. 159-69.
4. Chandrika, M & Ravishankar Rai, V 2009, 'Genetic fidelity in micropropagated plantlets of *Ochreinauclea missionis* an endemic, threatened and medicinal tree using ISSR markers', *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 13, pp 2933-38.
5. Cunha, A & Fernandes-Ferreira, M 2010, Influence of medium parameter on somatic embryogenesis from hypocotyls explants of flax (*Linum usitatissimum* L.), E papper, 18 pp.
6. De Pasquale, F, Carimi, F & Crescimanno, FG 1991, 'Somatic embryogenesis from styles of different cultivars of *Citrus limon* (L.) Burm', *Aust. J. Bot.*, no. 42, pp. 587-94.



7. Devarumath, RM, Doule, RB, Kawar, PG, Naikebawane, SB & Nerkar, YS 2007, 'Field performance and RAPD analysis to evaluate genetic fidelity of tissue culture raised plants vis-a-vis conventional sets derived plants of Sugarcane', *Sugar Tech.*, vol. 9, no. 1, pp. 17-22.
8. Devy, NF, Yulianti, F & Hardiyanto 2011, 'Pengaruh sumber karbohidrat terhadap induksi embrio dan daya multiplikasi kalus pada somatik embriogenesis siam Kintamani (*Citrus reticulata*)', *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Hortikultura Indonesia 2011*, Buku 2: Tanaman Buah, Lembang, hlm. 647-56.
9. Doyle, JJ & Doyle, LL 1999, 'Isolation of plant DNA from fresh tissue', *Focus*, no. 12, pp. 11-5.
10. Fang, DQ, Roose, ML, Krueger, RR & Federici, CT 1997, 'Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers', *Theor. Appl. Genet.*, no. 95, pp. 211-19.
11. Han, SH, Kang, SK, An, HJ & Kim, HY 2002, 'Effect of embryonic callus conditions on plant regeneration in Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.)', *J. Plant Biotechnol.*, vol. 4, no. 1, pp. 29-32.
12. Hao, Yu-Jin, Xiao-Peng Wen & Xiu-Xin Deng 2004, 'Genetic and epigenetic evaluations of citrus calluses recovered from slow-growth culture', *J. Plant Physiol.*, no. 161, pp. 479-84.
13. Hashmi, G, Huettel, R, Meyor, R, Krusberg, L & Hammerschlag, F 1997, 'RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach', *Plant Cell Rep.*, no. 16, pp. 624-27.
14. Kayim, M & Kemal Koc, N 2006, 'The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture', *Scientia Horticulturae*, vol. 109, no. 1, pp. 29-34.
15. Kobayashi, T, Higashi, K, Saitou, T & Kamada, H 1999, 'Physiological properties of inhibitory conditioning factor(s), inhibitory to somatic embryogenesis, in high-density cell cultures of carrot', *Plant Sci.*, no. 144, pp. 69-75.
16. Leroy, XJ, Leon, K, Charles, G & Branchard, M 2000, 'Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs', *Plant Cell Rep.*, no. 19, pp. 1102 - 07.
17. Mendes-da Gloria, FJ, Filho, FAAM, Demetrio, CGB, & Mendes, BMJ 1999, 'Embryogenic calli induction from nucellar tissue of citrus cultivars', *Scientia Agricola.*, vol. 56, no. 4, pp. 1111-15.
18. Miah, MN, Islam, S & Hadiuzzaman, S 2002, 'Regeneration of plantlets through somatic embryogenesis from nucellus tissue of *Citrus macroptera* Mont. Var. anammensis (Sat Kara)', *Plant Tis. Cult.*, vol. 12, no. 2, pp. 167-72.
19. Muller, E, Brown, PTH, Hartke, S, & Lorz, H 1990, 'DNA variation in tissue culture derived rice plants', *Theor. Appl. Genet.*, no. 80, pp. 673-79.
20. Munthali, MT, Newbury, HJ, & Ford-Lloyd, BV 1996, 'The detection of somaclonal variants of beet using RAPD', *Plant Cell Rep.*, no. 15, 474-78.
21. Nehra, NS, Kartha, K, Stusnoff, C, & Giles, K 1992, 'The influence of plant growth regulator concentration and callus ages on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry', *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, no. 29, pp. 257-68.
22. Niedz, RP, Hyndman, SE, Wynn, ET, & Bausher, MG 2002, 'Normalizing sweet orange (*C. sinensis* (L.) Osbeck) somatic embryogenesis with semi-permeable membranes', *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, vol. 38, no. 6, pp. 552-57.
23. Niedz, RP & Evens, TJ 2008, 'The effect of nitrogen and potassium nutrition on the growth of nonembryogenic and embryogenic tissue of sweet oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)', *BMC Plant Biol.*, vol. 8, no. 126, pp. 11.
24. Potter, R & Jones, MGK 1991, 'An assessment of genetic stability of potato *in vitro* by molecular and phenotypics analysis', *Plant.Sci.*, no. 76, pp 239-48.
25. Rahman, MH & Rajora, OP 2001, 'Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*)', *Plant Cell Rep.*, no 20, pp. 531-36.
26. Rani, V, Parida, A & Raina, SN 1995, 'Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh', *Plant Cell Rep.*, no. 14, pp. 459-62.
27. Ricci, AP, F. de Assis AM, Filho, Mendes, BMJ & de Stefano Piedade, SM 2002, 'Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*', *Scientia Agricola*, vol. 59, no. 1, pp. 41-6.
28. Route, GR, Mohapatra, A, & Mohan, JS 2006, 'Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects', *Biotechnol. Adv.* no. 24, pp. 531-60.
29. Scarano, M-T, Abbate, L, Ferrante, S, Lucretti, S & Tusa, N 2002, 'ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin', *Plant Cell Rep.*, no. 20, pp. 1162-66.
30. Shigeta, J, Satoa, K & Mii, M 1996, 'Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos', *Plant Sci.*, no. 115, pp. 109-14.
31. Sing, AK, Nito, N & Twamassa, M 1992, 'Influence of lactose and glycerol on growth and somatic embryogenesis of citrus callus', *Acta Horticulturae*, vol. 321, pp. 606-9.
32. Tomaz, ML, Mendez, BMJ, De Assis, F, Filho, AM, Demetrio, CGB, Jansakul, N & Rodriguez, APM 2001, 'Somatic embryogenesis in *Citrus* spp. carbohydrate stimulation and histodifferentiation', *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, no. 37, pp. 446-52.
33. Tusa, N, Abbate, L, Ferrante, S, Lucretti, S & Scarano, MT 2002, 'Identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus interploid crosses by means of isozymes, flow cytometry and ISSR-PCR', *Cell. and Mol. Biol. Letters*, vol. 7, pp. 703-8.
34. Umehara, M, Ogita, S, Sasamoto, H & Kamada, H 2004, 'Inhibitory factor(s) of somatic embryogenesis regulated suspensor differentiation in suspension culture of japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon)', *Plant Biotechnol.*, vol 21, no. 2, pp. 87-94.
35. Umehara, M, Ogita, S, Sasamoto, H, Chang-Ho Eun, Matsubayashi, Y, Sakagami, Y & Kamada, H 2005, 'Two stimulatory effects of the peptidyl growth factor phytosulfokine during somatic embryogenesis in japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon)', *Plant Sci.*, no. 169, pp. 901-7

