

# Keefektifan Eliminasi Penyakit Sistemik (Huanglongbing dan *Citrus Tristeza Virus*) pada Jeruk dengan Embriogenesis Somatik (*The Effectiveness of Citrus Systemic Diseases (Huanglongbing and Citrus Tristeza Virus) Elimination Through Somatic Embryogenesis*)

Widyaningsih, S, Yulianti, F, dan Devy, NF

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No. 1, Junrejo, Batu 65301

E-mail: sri\_wiwied@yahoo.com

Naskah diterima tanggal 18 Juli 2012 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 3 April 2013

**ABSTRAK.** Perbanyak tanaman dengan teknik embriogenesis somatik diduga mampu mengeliminasi penyakit sistemik pada tanaman jeruk. Namun tingkat keefektifan eliminasi penyakit sistemik tersebut sangat bergantung pada eksplan dan status penyakit pada pohon induk. Tujuan penelitian ialah mengetahui keefektifan perbanyakan dengan embriogenesis somatik dalam membersihkan penyakit sistemik pada jeruk (huanglongbing dan *citrus tristeza virus*). Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu dan *Screenhouse* Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) Tlekung, Kota Batu. Penelitian dilaksanakan pada Bulan Januari 2010 sampai dengan Desember 2011. Pengujian status penyakit sistemik dilakukan terhadap hasil perbanyakan melalui teknik embriogenesis somatik yang berasal dari tanaman induk terinfeksi dan bebas penyakit sistemik huanglongbing (HLB) dan *citrus tristeza virus* (CTV). Analisis penyakit HLB menggunakan metode pengujian PCR, sedangkan analisis penyakit CTV menggunakan metode DAS-ELISA. Pengujian dilakukan pada empat stadia pertumbuhan (kalus, embrio, planlet, dan semai) hasil perbanyakan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa teknik embriogenesis somatik efektif mengeliminasi penyakit HLB, namun kurang efektif untuk penyakit CTV. Hal ini ditunjukkan oleh hasil pengujian yang menunjukkan bahwa semua varietas dan semua stadia yang diuji bebas dari HLB, namun untuk CTV hanya terjadi pada varietas keprok Kinnow, siam Kintamani, dan nipis. Pada varietas JC (*Japanche citroen*) fase embrio, 40% dari sampel yang diuji masih terinfeksi CTV. Oleh karena itu, pengambilan nuselus sebagai sumber eksplan pada perbanyakan tanaman jeruk dengan embriogenesis somatik perlu dilakukan pada tanaman yang bebas dari penyakit sistemik.

Katakunci: Efektivitas; Penyakit; Huanglongbing; *Citrus tristeza virus*; Embriogenesis somatik; Jeruk

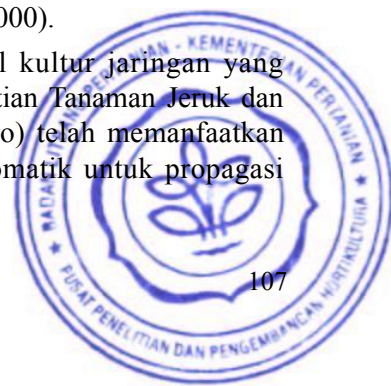
**ABSTRACT.** Plant propagation through somatic embryogenesis technique is expected able to eliminate systemic diseases on citrus plants. However, the effectiveness of the systemic diseases elimination depends on explant and diseases status of the mother plant. The purpose of this study was to know the effectiveness of propagation through somatic embryogenesis to eliminate citrus systemic diseases (huanglongbing and *citrus tristeza virus*). The research was conducted at Integrated Laboratory and *Screenhouse* of Indonesian Citrus and Subtropical Fruit Research Institute (ICSFRI), Tlekung, Batu, East Java. The research was implemented in January 2010 to December 2011. Systemic disease testing conducted on plant materials from somatic embryogenesis technique derived from mother plant which infected and free systemic disease, HLB and CTV. Huanglongbing analyzed by PCR method and CTV by DAS-ELISA method. Testing was conducted at four growth stadia multiplication results (callus, embryos, plantlets, and seedlings). The results showed that somatic embryogenesis technique effective to eliminate HLB but less effective to eliminate CTV. Testing results showed that all varieties in all stadia tested free from HLB but only mandarin Kinnow, tangerine Kintamani, and lime varieties free from CTV. *Japanche citroen* varieties at embryo stage, 40% still infected CTV. Therefore, the decision nucellus as explants on citrus micropropagation through somatic embryogenesis have to be done from disease free plants.

Keywords: Effectiveness; Disease; Huanglongbing; *Citrus tristeza virus*; Somatic embryogenesis; Citrus

Huanglongbing (HLB) merupakan salah satu penyakit yang merugikan pada tanaman jeruk, di wilayah Asia disebabkan oleh *Candidatus Liberobacter asiaticus* (CLas). Di Asia, penyakit ini ditularkan oleh serangga vektor *Diaphorina citri* (Gottwald 2010) dan *Trioza erytreae* di Afrika (Graca 1991). Huanglongbing dapat menginfeksi hampir semua kultivar jeruk (Knapp *et al.* 2004). Penyakit sistemik lain yang sangat merugikan pada usaha jeruk ialah *citrus tristeza virus* (CTV) yang disebabkan oleh virus (Lee & Bar-Joseph 2000). *Citrus tristeza virus* mudah ditularkan melalui

penyambungan dan bersifat semi persisten pada vektor utama, yaitu spesies apid (*T. citricida*), *Aphis gossypii*, *A. spiraeicola*, dan *T. aurantii*. Di Spanyol, *T. citricida* merupakan vektor yang lebih efisien dibandingkan *A. gossypii*, tetapi penyebaran secara epidemik terjadi melalui *A. gossypii* ketika spesies tersebut dominan di lapangan (Cambra *et al.* 2000).

Pengembangan protokol kultur jaringan yang dilakukan oleh Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) telah memanfaatkan teknologi embriogenesis somatik untuk propagasi



klonal batang bawah dan batang atas jeruk. Teknologi embriogenesis somatik pada tanaman jeruk yang dilakukan di Balitjestro yaitu menggunakan eksplan nuselus sebagai bahan eksplan dengan pertimbangan bahwa kultur nuselus dapat menghasilkan tanaman yang memiliki kesamaan karakter dengan tanaman induknya dan bebas penyakit sistemik. Menurut Eisa *et al.* (2005) teknik perbanyakan dengan embriogenesis somatik menghasilkan benih yang bebas virus pada *Chenopodium guinoa*, jenis yang rentan terhadap virus, sedangkan menurut D'onghia *et al.* (2001), perbanyakan dengan embriogenesis somatik mampu menghilangkan penyakit *citrus psorosis virus* (CPSV) pada tiga varietas jeruk (mandarin, *sweet orange*, dan dweet tangor) yang diuji pada stadia planlet yang dihasilkan, sedangkan pada coklat, perbanyakan dengan embriogenesis somatik dengan bahan tanam terinfeksi *cocoa swollen shoot virus* (CSSV) diketahui efektif mengurangi penyakit CSSV. Selama proses embriogenesis somatik, penyakit berkurang secara drastis dari embriogenesis primer ke embriogenesis sekunder berdasarkan analisis dengan PCR-kapiler elektroforesis, sedangkan berdasarkan PCR-agarose elektroforesis pada embriogenesis primer maupun embriogenesis sekunder menunjukkan bahwa infeksi CSSV sudah tereliminasi (Quainoo *et al.* 2008). Selama ini proses eliminasi penyakit CTV pada jeruk dilakukan dengan *shoot tip grafting* (STG) (Fifaei *et al.* 2007), dan belum diketahui keefektifannya dalam mengeliminasi penyakit sistemik yang lain.

Dalam penelitian ini, teknik embriogenesis somatik digunakan untuk membebaskan planlet dari penyakit sistemik, sehingga dapat dihasilkan bibit jeruk yang bebas penyakit sistemik dan seragam. Tujuan penelitian ialah mengetahui efektivitas teknik perbanyakan melalui embriogenesis somatik untuk membersihkan penyakit sistemik pada jeruk (HLB dan CTV). Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini ialah teknik embriogenesis somatik mampu mengeliminasi penyakit sistemik HLB dan CTV pada tanaman jeruk.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di *Screenhouse* dan Laboratorium Terpadu Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) Tlekung, Kota Batu pada Bulan Januari 2010 sampai dengan Desember 2011.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu nuselus yang berasal dari biji tanaman jeruk yang terinfeksi penyakit sistemik HLB (CVPD) dan CTV. Media untuk perbanyakan dengan embriogenesis somatik antara lain

media MS, sukrosa, malt ekstrak, dan agar. ELISA kit untuk deteksi penyakit CTV berasal dari Agdia (USA), primer spesifik yang mengamplifikasi 16S rDNA bakteri (OI1 dan OI2c), agarose, *buffer* ekstraksi, dan bahan kimia lainnya, sedangkan alat yang digunakan yaitu mesin PCR (Biometra), ELISA *reader*, Biodoc gel (Biometra), mikropipet, *sentrifuge*, pisau okulasi, timbangan, dan peralatan lainnya.

### Prosedur Pelaksanaan Penelitian Eksplorasi Tanaman Terinfeksi HLB dan CTV Sebagai Sumber Inokulum

Eksplorasi dilakukan di daerah yang endemik penyakit HLB dan CTV serta di pertanaman jeruk yang diduga masih bebas dari kedua penyakit sistemik tersebut. Eksplorasi dilakukan di lapangan pada awal pembentukan buah. Daun diambil dari tanaman untuk diuji statusnya terhadap penyakit sistemik (indeksing) di laboratorium. Nuselus buah diambil sebagai sumber eksplan pada perbanyakan dengan embriogenesis somatik.

### Perbanyakan Jeruk dengan Teknik Embriogenesis Somatik

Eksplan nuselus yang berasal dari tanaman sehat dan tanaman terinfeksi HLB dan CTV dikulturkan pada media MS + 500 mg/l malt ekstrak + 3 mg/l BAP + 50 g/l sukrosa + 10 g/l agar. Subkultur dilakukan setiap 30 hari pada media yang sama. Parameter yang diamati ialah waktu inisiasi kalus dan persentase fase kalus tumbuh.

Embrio dan planlet yang tumbuh selanjutnya disubkultur pada media MS + 500 mg/l malt ekstrak + 30 g/l sukrosa + 10 g/l agar. Subkultur dilakukan setiap 30 hari pada media yang sama.

### Pengujian Status Penyakit Jeruk Hasil Embriogenesis Somatik

Pengujian dilakukan terhadap hasil perbanyakan dengan teknik embriogenesis somatik yang berasal dari biji tanaman terinfeksi penyakit sistemik HLB dan CTV. Pengujian terhadap penyakit (indeksing) dilakukan pada stadia kalus, embrio, planlet, dan semaian, masing-masing lima botol tiap stadia kalus, embrio, dan planlet, sedangkan pada semaian diambil secara komposit pada masing-masing varietas.

Tahap pelaksanaan indeksing penyakit HLB dilakukan untuk menentukan tanaman terinfeksi HLB dan pengujian pada hasil perbanyakan dengan embriogenesis somatik terhadap infeksi penyakit HLB. Metode yang digunakan dengan teknik *polymerase chain reactions* (PCR), dengan prosedur pelaksanaan kegiatan dilakukan sebagai berikut.

Ekstraksi DNA total tanaman digunakan metode *cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) yang



dimodifikasi untuk melisis dinding sel tanaman (Anonim 2002). Ekstraksi sampel dari daun tanaman jeruk dilakukan dengan mengambil tulang daun dan dipotong kecil-kecil, dengan berat kurang lebih 0,5 g, sedangkan dari hasil perbanyakan somatik embriogenesis diambil stadia kalus dan embrio pada berbagai fase dan planlet masing-masing 0,5 g dan stadia semai diambil bagian daunnya dengan berat yang sama. Selanjutnya masing-masing sampel digerus dan dimasukkan ke dalam eppendorf yang berisi 1500  $\mu$ l *buffer* isolasi DNA + 30  $\mu$ l merkaptotanol, kemudian dicampur rata dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit. Selanjutnya campuran di-*sentrifuge* 6000 rpm selama 5 menit. Supernatnya diambil  $\pm$  750  $\mu$ l. Supernatan ditambah larutan kloroform:isoamilalkohol (24:1) dengan jumlah yang sama dengan supernatan (750  $\mu$ l) untuk memisahkan larutan DNA dari bahan-bahan yang lain, kemudian dicampur rata, dikocok kuat, dan di-*sentrifuge* 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak  $\pm$  600  $\mu$ l, kemudian ditambah isopropanol dingin sebanyak jumlah supernatnya (bolak-balik secara perlahan) dan di-*sentrifuge* 13.000 rpm selama 10 menit. Larutan dibuang, tersisa pelet DNA, lalu dicuci dengan alkohol 70% dan di-*sentrifuge* 10.000 rpm selama 3 menit. Larutan (alkohol) dibuang, kemudian pelet DNA dikeringkan dengan cara membalik eppendorf sampai pelet kering, setelah itu DNA ditambah *buffer* TE (10-20  $\mu$ l).

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan primer yang didesain untuk mengamplifikasi 16S rDNA dari bakteri, dengan urutan basa *forward* primer (OI1) : 5'- GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA-3', dan *reverse* primer (OI2c) : 5' - GCC TCG CGA CTT CGCAACCCA T-3' (Jagoeux et al.1996). Komposisi PCR mix untuk 50  $\mu$ l/sampel: *kit reaction mix* = 25  $\mu$ l, primer *forward* (OI1)= 1  $\mu$ l, primer *reverse* (OI2c) = 1  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O = 21  $\mu$ l, DNA sampel = 2  $\mu$ l. Siklus PCR yang digunakan ialah *pre-treatment* 92°C selama 30 detik (satu siklus), sebanyak 40 siklus, denaturasi 92°C C selama 60 detik, *annealing* 60°C selama 60 detik, *extension* 72°C selama 90 detik, dan *post extension* 72°C selama 10 menit.

Produk DNA hasil amplifikasi dipisahkan dengan metode elektroforesis pada gel agarose 1% yang mengandung etidium bromida (10 mg/l) sebagai pewarna, di dalam larutan satu kali TAE selama 60 menit pada kekuatan arus 100 volt. Deteksi pita DNA dilakukan dengan sistem biodokumentasi. Sampel dinyatakan positif jika muncul pita pada 1160 pasang basa.

Tahapan pelaksanaan indeksing penyakit CTV untuk menentukan tanaman terinfeksi CTV dan pengujian

pada hasil perbanyakan dengan embriogenesis somatik terhadap infeksi penyakit CTV dilakukan dengan metode *double antibody sandwich*-ELISA (DAS ELISA) (Garnsey & Cambra 1991, Tiwari et al. 2009). Metode DAS-ELISA untuk indeksing penyakit CTV dilakukan dengan *coating buffer* terlebih dahulu. *Plate* baru (bagian dalam *plate* jangan sampai tersentuh tangan) disiapkan. Setiap lubang *plate* diisi dengan larutan *coating* antibodi sebanyak 100  $\mu$ l. Inkubasi selama 4 jam pada suhu ruang atau disimpan di dalam refrigerator selama semalam. *Plate* dicuci dengan PBST sebanyak tiga kali, masing-masing 3 menit (dikeringkan dengan posisi *plate* terbalik pada kertas *tissue*). Selanjutnya dilakukan ekstraksi sampel. Sampel daun jeruk dibersihkan dengan *tissue*, diambil tulang daunnya, dipotong kecil-kecil, dan ditimbang sebanyak 0,3 g. Demikian juga sampel yang berasal dari perbanyakan embriogenesis somatik pada berbagai stadia ditimbang pada berat yang sama.

Sampel dihaluskan, ditambahkan *buffer* ekstrak (*grinding*) sebanyak 3 ml atau disesuaikan dengan jumlah sampel yang digunakan. Sampel dimasukkan ke dalam eppendorf menggunakan kain saring. Selanjutnya sampel di-*sentrifuge* selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Langkah selanjutnya ialah kegiatan analisis, yaitu dengan memasukkan masing-masing cairan sampel sebanyak 100  $\mu$ l ke dalam lubang *plate*. Cairan sampel disimpan di dalam refrigerator selama semalam. *Plate* dicuci dengan PBST sebanyak empat kali masing-masing 3 menit. Cairan sampel diberi 100  $\mu$ l larutan *conjugate buffer* pada tiap lubang *plate*. Selanjutnya *plate* diinkubasi selama 2 jam pada inkubator dengan suhu 37°C. *Plate* dicuci dengan PBST sebanyak empat kali, masing-masing 3 menit. Sebanyak 100  $\mu$ l larutan substrat + PNP tablet dimasukkan pada tiap lubang *plate* dan dibiarkan selama maksimal 60 menit dan reaksi dihentikan dengan NaOH. Selanjutnya substrat diamati dengan alat ELISA reader. Sampel dinyatakan positif jika nilai absorbansi sampel lebih besar dari dua kali nilai absorbansi kontrol negatif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Eksplorasi Tanaman Terinfeksi HLB dan CTV

Tabel 1 menunjukkan status penyakit HLB dan CTV pada induk yang digunakan sebagai bahan perbanyakan. Masing-masing varietas dari daerah asal tertentu hanya terinfeksi salah satu penyakit sistemik (HLB atau CTV). Gejala penyakit secara visual dan dari hasil pengujian dengan PCR atau ELISA





**Tabel 1. Status penyakit huanglongbing dan CTV pada induk bahan perbanyakan yang diperbanyak dengan teknik embriogenesis somatik (*Huanglongbing and CTV diseases status on mother plant which used as propagation source with somatic embryogenesis*)**

Varietas (Varieties)	Asal tempat (Original place)	Gejala (Symptoms)	Status penyakit (Disease status)	
			HLB	CTV
<i>J. citroen</i>	Tulungagung	<i>Greening</i>	+	-
Keprak Batu 55	Batu	Daun mengecil, tegak, <i>greening</i>	+	-
Siem	Purworejo	<i>Greening</i> , daun mengecil	+	-
<i>J. citroen</i>	Tlekung	<i>Blotching</i>	-	+
<i>J. citroen</i>	Bali	<i>Vein clearing</i>	-	+
Keprak Kinnow	Batu	<i>Vein clearing, vein cupping, vein crocking</i>	-	+
Siem Kintamani	Bali	<i>Vein clearing</i>	-	+
Nipis	Tulungagung	<i>Blotching</i>	-	+
<i>J. citroen</i>	Bali	Tidak bergejala	-	-
Siem Kintamani	Bali	Tidak bergejala	-	-
Keprak Kinnow	Batu	Tidak bergejala	-	-
Keprak Batu 55	Batu	Tidak bergejala	-	-

di laboratorium menunjukkan keberadaan penyakit sistemik tersebut secara jelas.

#### Pengujian Status Penyakit Jeruk Hasil Embriogenesis Somatik

Pengujian status penyakit sistemik dilakukan terhadap hasil perbanyakan jeruk menggunakan teknik embriogenesis somatik. Penyakit sistemik yang dideteksi yaitu HLB (CVPD) dan CTV.

Status penyakit HLB pada hasil perbanyakan dengan teknik embriogenesis somatik pada beberapa

varietas jeruk yang bijinya berasal dari induk yang positif penyakit HLB ditunjukkan pada Tabel 2.

Menurut Wirawan *et al.* (2004) penyakit sistemik pada jeruk mempunyai peluang terbawa dalam biji. Penyakit HLB ditemukan pada kulit biji, kulit buah bagian dalam, poros serat buah, serat putih buah, dan serat putih buah yang menuju ke biji. Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa teknik embriogenesis somatik dapat mengeliminasi huanglongbing meskipun nuselus yang digunakan berasal dari tanaman yang terinfeksi penyakit huanglongbing.

**Tabel 2. Status penyakit HLB hasil perbanyakan benih jeruk dengan teknik embriogenesis somatik, biji sebagai bahan perbanyakan berasal dari jeruk terinfeksi HLB (*Huanglongbing disease status on part of citrus plant resulted via somatic embryogenesis technique, seed as material propagation origin from citrus-infected by HLB*)**

Varietas (Varieties)	Asal tempat (Original place)	Lama waktu diperbanyak dengan SE (Time of micropropagation via SE)	Stadia (Stadia)	Status penyakit setelah di-SE* (Disease status after propagated via SE)
<i>J. citroen</i>	Tulungagung	5 bulan (Months)	Planlet (Plantlet)	Negatif CVPD (100%)
			Kalus (Callus)	Negatif CVPD (100%)
Keprak Batu 55	Batu	14 bulan (Months)	Embrio (Embryo)	Negatif CVPD (100%)
			Planlet (Plantlet)	Negatif CVPD (100%)
			Kalus (Callus)	Negatif CVPD (100%)
Siem	Purworejo	6 bulan (Months)	Embrio (Embryo)	Negatif CVPD (100%)
			Planlet (Plantlet)	Negatif CVPD (100%)

\*Setiap stadia yang diuji sebanyak lima botol, kontrol positif menunjukkan nilai positif (pita DNA pada 1160 bp), kontrol negatif menunjukkan nilai negatif (Each stadia tested of five bottles, positive control indicated positive score (DNA band on 1160 bp), negative control indicated negative score)



Pengujian pada hasil perbanyakan dengan eksplan nuselus dari tanaman yang terinfeksi CTV menunjukkan bahwa 40% sampel embrio varietas JC hasil perbanyakan SE mengandung virus CTV, sedangkan pada stadia planlet bebas dari virus (Tabel 3).

Hal ini diduga karena nuselus yang digunakan berasal dari induk yang terinfeksi penyakit CTV yang parah dan berlangsung dalam waktu yang lama, sehingga konsentrasi patogen sangat tinggi. Pada stadia embrio, patogen masih berada pada konsentrasi yang tinggi, sehingga ketika diuji dengan ELISA menunjukkan nilai positif, sedangkan pada stadia planlet virus tidak terdeteksi.

Menurut El-Sawy *et al.* (2006), semua planlet yang dihasilkan dengan embriogenesis somatik yang berasal dari ovul bebas dari penyakit CTV berdasarkan pengujian dengan ELISA maupun dengan RT-PCR, sedangkan embriogenesis somatik menggunakan stigma dan *style* berhasil mendapatkan tanaman yang bebas CTV (Meziane *et al.* 2009).

Bahan tanam yang digunakan untuk perbanyakan dengan embriogenesis somatik berpengaruh terhadap eliminasi virus. Menurut Goussard *et al.* (1991), embriogenesis somatik dengan eksplan yang diambil

dari jaringan bakal embrio anggur terinfeksi merupakan cara yang efektif untuk menghilangkan *grapevine leafroll associated virus* (GLRV) pada anggur, tetapi prosedur ini tidak berhasil menghilangkan *grapevine fanleafvirus* (GFLV) dengan bahan perbanyakan yang berasal dari anter.

Hasil indeksing pada sampel materi perbanyakan dengan teknik embriogenesis somatik dengan eksplan nuselus dari pohon yang bebas penyakit HLB dan CTV menunjukkan bahwa semua (100%) hasil perbanyakan bebas dari penyakit HLB dan CTV (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa nuselus sebagai sumber eksplan pada perbanyakan jeruk dengan embriogenesis somatik harus berasal dari tanaman yang bebas dari penyakit sistemik.

Selain dilakukan pengujian status penyakit, pada penelitian ini dilakukan pengamatan waktu inisiasi dan persentase pembentukan kalus pada sampel tanaman jeruk sehat dan terinfeksi penyakit sistemik. Hasil pengujian ditunjukkan pada Tabel 5. Hasil pengamatan terhadap persentase pembentukan kalus dan waktu inisiasi kalus menunjukkan bahwa nuselus dari tanaman yang sehat ketika diperbanyak dengan embriogenesis somatik memiliki daya tumbuh kalus lebih besar

**Tabel 3. Status penyakit CTV pada hasil perbanyakan benih jeruk dengan teknik embriogenesis somatik, biji sebagai bahan perbanyakan berasal dari jeruk terinfeksi CTV (*Citrus tristeza virus disease status on part of citrus plant resulted via somatic embryogenesis technique, seed as material propagation origin from citrus-infected by CTV*)**

Varietas/asal (Varieties/original place)	Lama waktu diperbanyak dengan SE (Time of micropropagation via SE)	Stadia (Stadia)	Rerata nilai absorbansi CTV (Mean of CTV absorbance)	Status penyakit (Disease status) *
JC /Tlekung	6 bulan (Months)	Kalus (Callus)	0,0144	Negatif CTV (100%)
		Embrio (Embryo)	0,2705	Positif CTV (40%)
		Planlet (Plantlet)	0,0102	Negatif CTV (100%)
JC/Bali	5 bulan (Months)	Kalus (Callus)	0,0100	Negatif CTV (100%)
		Embrio (Embryo)	0,0143	Negatif CTV (100%)
		Planlet (Plantlet)	0,0368	Negatif CTV (100%)
Keprok Kinnow	8 bulan (Months)	Kalus (Callus)	0,0060	Negatif CTV (100%)
		Embrio (Embryo)	0,0060	Negatif CTV (100%)
		Planlet (Plantlet)	0,0090	Negatif CTV (100%)
Siem Kintamani	14 bulan (Months)	Kalus (Callus)	0,0042	Negatif CTV (100%)
		Embrio (Embryo)	0,0046	Negatif CTV (100%)
		Planlet (Plantlet)	0,0036	Negatif CTV (100%)
Nipis/ Tulungagung	4 bulan (Months)	Kalus (Callus)	0,0100	Negatif CTV (100%)
		Embrio (Embryo)	0,0130	Negatif CTV (100%)
		Planlet (Plantlet)	0,0035	Negatif CTV (100%)

\*Setiap stadia yang diuji sebanyak lima botol, kontrol negatif untuk varietas nipis, keprok Kinnow, dan JC = 0,001, untuk varietas siem Kintamani 0.0015, kontrol positif untuk varietas nipis, keprok Kinnow, dan JC = 0,144, untuk varietas siem Kintamani 0.165 (Each stadia tested of five bottles, negative control for varieties of lime, mandarin Kinnow, and JC=0.001, while tangerine of Kintamani 0.0015, positive control for varieties of lime, mandarin Kinnow, and JC=0.144, while tangerine of Kintamani 0.165)



**Tabel 4. Status penyakit HLB dan CTV pada hasil perbanyakan benih jeruk dengan teknik embriogenesis somatik, biji sebagai bahan perbanyakan bebas dari penyakit HLB dan CTV (*HLB and CTV diseases status on part of citrus plant resulted via somatic embryogenesis technique, seed as material propagation origin from healthy plant*)**

Varietas ( <i>Varieties</i> )	Lama waktu diperbanyak dengan SE ( <i>Time of micropropagation via SE</i> )	Stadia ( <i>Stadia</i> )	Status penyakit HLB ( <i>HLB disease status</i> )	Status penyakit CTV ( <i>CTV disease status</i> )	Rerata nilai absorbansi CTV ( <i>Mean of CTV absorbance</i> )*
JC-Bali	4 bulan ( <i>Months</i> )	Kalus ( <i>Callus</i> )	-	-	0,0005
		Embrio ( <i>Embryo</i> )	-	-	0,0035
		Planlet ( <i>Plantlet</i> )	-	-	0,004
		Semai ( <i>Seedling</i> )	-	-	0,0035
Siem Kintamani	9 bulan ( <i>Months</i> )	Kalus ( <i>Callus</i> )	-	-	0,0025
		Embrio ( <i>Embryo</i> )	-	-	0,002
		Planlet ( <i>Plantlet</i> )	-	-	0,000
		Semai ( <i>Seedling</i> )	-	-	0,0055
Keprak Kinnow	4 bulan ( <i>Months</i> )	Kalus ( <i>Callus</i> )	-	-	0,002
		Embrio ( <i>Embryo</i> )	-	-	0,002
		Planlet ( <i>Plantlet</i> )	-	-	0,000
		Semai ( <i>Seedling</i> )	-	-	0,001
Keprak Batu 55	7 bulan ( <i>Months</i> )	Kalus ( <i>Callus</i> )	-	-	0,001
		Embrio ( <i>Embryo</i> )	-	-	0,0025
		Planlet ( <i>Plantlet</i> )	-	-	0,003
		Semai ( <i>Seedling</i> )	-	-	

\* Setiap stadia yang diuji sebanyak lima botol, nilai absorbansi kontrol negatif CTV= 0,000, nilai absorbansi kontrol positif CTV= 0,153, positif terinfeksi HLB jika terdapat pita DNA pada 1160 bp (*Each stadia tested of five bottles, absorbance score of negative control CTV=0.000, white absorbance score of positive control = 0.153, positive infected by HLB if there was DNA band on 1160 bp*)

**Tabel 5. Rerata hari tumbuh dan persentase kalus yang terbentuk dengan embriogenesis somatik pada jeruk sehat dan terinfeksi penyakit sistemik (huanglongbing dan CTV) (*Mean of days to grow and percentage of callus formed with somatic embryogenesis in healthy citrus and citrus infected by systemic disease*)**

Varietas ( <i>Varieties</i> )	Rerata waktu inisiasi kalus ( <i>Mean of time of callus initiation</i> )	Kalus ( <i>Callus</i> ) %
<b>Keprak Batu 55</b>		
Sehat ( <i>Health</i> )	38,88	77,50
Terinfeksi HLB ( <i>Infected by HLB</i> )	34,08	48,15
<b>Siam Kintamani</b>		
Sehat ( <i>Health</i> )	37,91	100,00
Terinfeksi HLB ( <i>Infected by HLB</i> )	24,44	74,32
<b>Keprak Kinnow</b>		
Sehat ( <i>Health</i> )	35,14	83,87
Terinfeksi CTV ( <i>Infected by CTV</i> )	34,14	36,94
<b>Japanche citroen (JC)</b>		
Sehat ( <i>Health</i> )	48,51	28,79
Terinfeksi CTV ( <i>Infected by CTV</i> )	45,84	32,45

dibandingkan dengan eksplan nuselus yang berasal dari tanaman yang telah terinfeksi penyakit sistemik.

Fenomena ini berkaitan dengan kualitas nuselus yang ditanam. Tanaman yang sehat memiliki kualitas buah dan nuselus yang lebih baik dibandingkan tanaman yang sakit. Di sisi lain, nuselus yang diperoleh dari

tanaman sakit memiliki rerata hari tumbuh kalus yang lebih pendek. Fenomena ini disebabkan oleh infeksi penyakit yang menyebabkan tanaman mengalami stres. Stres pada tanaman dapat menyebabkan reorganisasi kromatin dan secara *in vitro* mampu menginduksi embrio somatik (Feher 2005), atau dengan kata lain





embriogenesis somatik dianggap sebagai salah satu respons sel terhadap stres (Zavattieri *et al.* 2010).

Perbanyakkan dengan embriogenesis somatik pada jeruk belum mampu menghasilkan benih yang 100% bebas penyakit sistemik, sehingga perlu kehati-hatian dalam pemilihan sumber eksplan untuk bahan perbanyakkan. Selain itu dalam proses aklimatisasi dan perbesarannya pada hasil embriogenesis somatik diperlukan *screenhouse* yang *insect proof*, sehingga vektor sebagai sumber penular pada penyakit HLB dan CTV tidak mampu menularkan penyakit.

## KESIMPULAN DAN SARAN

1. Teknik perbanyakkan dengan embriogenesis somatik pada jeruk efektif membebaskan penyakit HLB pada semua stadia pertumbuhan, tetapi tidak efektif membebaskan penyakit CTV.
2. Infeksi penyakit CTV pada hasil perbanyakkan mencapai 40% pada stadia embrio varietas *Japanche citroen* (JC) dari Tlekung, sedangkan pada empat varietas yang lain (JC dari Bali, siem Kintamani, keprok Kinnow, dan keprok Batu 55) bebas penyakit CTV.
3. Pengambilan nuselus sebagai sumber eksplan pada perbanyakkan tanaman jeruk dengan embriogenesis somatik perlu dilakukan pada tanaman yang bebas penyakit sistemik, sehingga diperoleh benih jeruk yang bebas penyakit sistemik.

## PUSTAKA

1. Anonim 2002, 'Preparation of plant DNA using CTAB', in Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA & Struhl, K (eds.), *short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology*, 5<sup>th</sup> edition, vol. 1, John Wiley & Sons, New York.
2. Cambra, M, Gorris, MT, Marroquín, C, Román, MP, Olmos, A, Martínez, MC, Hermoso de Mendoza, A, López, A & Navarro, L 2000, 'Incidence and epidemiology of *citrus tristeza virus* in the valencian community of Spain', *Virus Res.*, vol. 71, pp. 85-95.
3. D'Onghia, M, Carimi, F, De Pasquale, F, Djelouah, K & Martelli, GP 2001, 'Elimination of *citrus psorosis virus* by somatic embryogenesis from stigma and style cultures', *Plant Pathol.*, vol. 50, pp. 266-9.
4. El-sawy, A, Gomaa, A, Reda, A & Danial, A 2005, 'Somatic embryogenesis and plant regeneration from undevelop ovules of citrus', *Arab J. Biotech.*, vol. 9, pp. 189-202.

5. Eisa, S, Koyro, HW, Kogel, KH & Imani, J 2005, 'Induction of somatic embryogenesis in cultured cells of *Chenopodium quinoa*', *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.*, vol. 81, pp. 243-6.
6. Fehér, A, Pasternak, TP & Dusits, D 2003, 'Transition of somatic plant cells to an embryogenic state', *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.*, vol. 74, no. 3, pp. 201-8.
7. Fifaei, R, Golein, B, Taheri, H & Tadjvar, 2007, 'Elimination of *citrus tristeza virus* of washington navel orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) through shoot-tip grafting', *Int.J. Agric. & Biol.*, vol. 9, no. 1, pp. 27-30.
8. Garnsey, SM & Cambra, M 1991, 'Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens', in Roistacher, CN (ed.), *graft-transmissible diseases of citrus, handbook for detection and diagnosis*, FAO, Rome, pp.193-216.
9. Graca, JV 1991, 'Citrus greening disease', *Ann. Rev. of Phytopathol.*, vol. 29, pp. 109-36.
10. Goussard, PG, Wiid, J & Kasdorf, GGF 1999, 'The effectiveness of *in vitro* somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll associated viruses from grapevines', *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, vol 12, no. 2.
11. Gottwald, TR 2010, 'Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing', *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 48, pp 119-9.
12. Jagoeux, S, Bove, JM, & Garnier, M 1996, 'PCR detection of two "Candidatus" *Liberobacter* species associated with greening disease of citrus', *Molecular and Cellular Probes*, vol. 10, pp. 43-50.
13. Knapp, JL, Halbert, S, Lee, R, Hoy, M, Clark, R & Kesinger, M 2004, 'The Asian citrus psyllid and citrus greening disease', *Citrus Industry*, vol. 79, pp. 1028-9.
14. Lee, RF & Bar-Joseph, M 2000, 'Tristeza', in Timmer, LW, Garnsey, SM & Graham, JH (eds.), *compendium of citrus diseases*, APS Press.
15. Meziane, M, Frasher, D, Carra, A, Djelouah, K, Carimi, F, & D'Onghia, AM 2009, 'Citrus sanitation methods for the elimination of *citrus tristeza virus* (CTV)', in *citrus tristeza virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry*, *Options Méditerranéennes*, vol. 65, pp. 177-80.
16. Tiwari, RP, Hoondal, GS & Tewari, R 2009, 'Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)', in *Laboratory techniques in microbiology & biotechnology*, Abhishek Publication, India.
17. Quainoo, AK, Wetten, AC & Allainguillaume, J 2008, 'The effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the cocoa swollen shoot virus from infected cocoa trees', *J. Virological Methods*, vol. 149, pp. 91-6.
18. Zavattieri, MA, Frederico, AM, Lima, M, Sabino, R & Arnholdz-Schmit, B 2010, *Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions*, *Electronic J. Biotechnol.*, ISSN: 0717-3458, Vol.13, No.1, Issue of 15 January 2010, viewed 22 December 2011, <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol13/issue1/full/4/>>.

