

Perbanyak Massal Embrio Kalamondin Melalui Teknologi Somatik Embriogenesis Menggunakan Bioreaktor

Devy, N F, Yulianti, F, dan Hardiyanto

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No 1, Junrejo, Batu 65301
Naskah diterima tanggal 17 Juni 2010 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 12 September 2011

ABSTRAK. Sejauh ini, penelitian perbanyak somatik embriogenesis baik untuk penyediaan semaian batang bawah maupun varietas komersial jeruk menghasilkan laju multiplikasi yang relatif lambat. Kombinasi antara perbanyak melalui metode somatik embriogenesis dengan penggunaan bioreaktor, diharapkan mampu meningkatkan laju produksi kalus embrionik menjadi planlet. Kajian awal dilakukan menggunakan nuselus Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco) sebagai sumber kalus. Kalus yang dihasilkan diinduksi dan diperbanyak menjadi kalus embrionik dan embrio dengan cara dikulturkan pada *shaker* (100 rpm) serta *bulb bioreactor*. Tujuan penelitian ini ialah membandingkan produksi embrio Kalamondin melalui teknologi somatik embriogenesis pada kultur cair menggunakan *shaker* dan bioreaktor. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, dari September 2008 sampai dengan Desember 2009. Pada tahapan perbanyak embrio dengan metode *shaker*, diperoleh bahwa rerata kemampuan kalus menghasilkan embrio dalam kultur selama 10 minggu ialah 18,12 embrio/g kalus. Dengan kisaran waktu yang sama, total embrio yang dihasilkan 3 g kalus/300 cc media cair di dalam bioreaktor menghasilkan 46 embrio/g kalus atau setara 2,53 kali dibandingkan metode *shaker*. Embrio yang tumbuh pada bioreaktor dapat berkembang hampir 100% menjadi planlet. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa aplikasi bioreaktor untuk tujuan perbanyak massal embrio Kalamondin memiliki pengaruh yang signifikan terhadap laju multiplikasinya.

Katakunci: Bioreaktor; *Citrus mitis* Blanco; Kalus; Planlet; Somatik embrio; Kalamondin

ABSTRACT. Devy, NF, Yulianti, F, and Hardiyanto. 2012. **Kalamondin Embryo Mass Propagation via Somatic Embryogenesis Technique Using Bioreactor.** So far, research on somatic embryogenesis for rootstock and citrus commercial varieties has been faced by low multiplication rate of embryos. Combination of somatic embryogenesis method and bioreactor hypothesized can increase multiplication rate of embryos and improve regeneration of embryogenic calli to produce plantlets. Kalamondin explants were induced and proliferated to be embryonic calli and embryos using both shaker (100 rpm) and bulb bioreactor. The aimed of this research was to compare the production of Kalamondin embryos through somatic embryogenesis method on liquid media using shaker and bulb bioreactor. Research was conducted at Tissue Culture Laboratory of Indonesian Citrus and Subtropical Fruit Research Institute from September 2008 to December 2009. Kalamondin nucelus as a callus source was used in this research. Results of the study indicated that the average of embryos production through shaker technique within 10 weeks of culture incubation was 18.12 embryos/g callus, while application of bioreactor improved embryo productivity up to 46 embryos/g calli (3 g/300 cc media). The multiplication rate using the bioreactor increased up to 2.53 fold compare to shaker method. Results of the study give the real evidence that application of bioreactor for in vitro mass propagation of Kalamondin embryos had high significant effect on embryo multiplication rate.

Keywords: Bioreactor; *Citrus mitis* Blanco; Callus; Plantlet; Somatic embryo; Kalamondin

Somatik embriogenesis adalah suatu pembentukan embrio dari bagian somatik tanaman yang bukan termasuk sel zigotik. Sumber sel somatik ini biasanya secara alamiah tidak terlibat dalam pembentukan dan perkembangan embrio. Penggunaan sel-sel somatik sebagai eksplan dalam protokol kultur jaringan memungkinkan pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel somatik tersebut menjadi embrio, yang disebut embrio somatik. Proses somatik embriogenesis sama dengan embriogenesis zigotik. Pembelahan sel asimetrik juga berlaku untuk perkembangan embrio somatik. Embrio somatik secara morfologi juga sama dengan embrio zigotik yaitu bipolar dengan tipe organ yang sama terdiri dari radikal, hipokotil, dan kotiledon (Arnold *et al.* 2002). Embrio zigotik dan somatik memiliki karakteristik tahapan perkembangan yang sama, kecuali pada tahap yang paling awal, karena berasal dari dua jenis sel yang berbeda. Jika embrio somatik berasal dari hasil fertilisasi, sedangkan embrio somatik berasal dari sel-sel somatik.

Perkembangan protokol kultur jaringan dalam perbanyak sel dan jaringan telah sampai pada level yang memungkinkan untuk melakukan industrialisasi perbenihan. Saat ini, teknologi somatik embriogenesis mulai dikembangkan untuk menghasilkan materi perbanyak bibit dalam jumlah massal menggunakan bioreaktor. Bioreaktor dahulunya banyak digunakan hanya untuk perbanyak pada kultur suspensi sel dan produksi metabolit sekunder, namun dalam perkembangannya, alat ini digunakan juga dalam perbanyak embrio somatik dalam skala besar. Somatik embriogenesis dalam kultur cair dalam bioreaktor telah banyak dilaporkan, di antaranya pada tanaman wortel (Amirato & Styer 1985), ubi jalar (Harrell *et al.* 1994), karet (Etienne *et al.* 1997), dan kopi (Etienne *et al.* 2006).

Menurut Ziv (2000), kelebihan bioreaktor dalam menunjang perbanyak embrio disebabkan penggunaan media cair di dalamnya yang mendorong

terjadinya kontak yang lebih baik antara biomas dengan media, tidak adanya hambatan dalam pertukaran udara, kemudahan dalam pengontrolan komposisi media dan suplai gas/udara serta kemampuan untuk memanipulasi biomas tanaman sesuai dengan volume media. Namun demikian, kendala yang dihadapi pada metode ini ialah kontaminasi yang berasal dari jamur, bakteri, kapang, dan serangga, yang dapat menyebabkan kerugian besar karena kehilangan materi tanaman pada laboratorium komersial.

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) telah melakukan beberapa penelitian somatik embriogenesis baik untuk penyediaan semai batang bawah maupun varietas komersial dengan laju multiplikasi yang relatif lambat. Kombinasi antara perbanyakan melalui somatik embriogenesis dengan penggunaan bioreaktor, diharapkan mampu meningkatkan laju produksi kalus embrionik menjadi planlet. Kajian awal dilakukan menggunakan eksplan nuselus jeruk Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco) sebagai sumber kalus. Menurut Lewinsohn *et al.* (1989), jeruk jenis ini dapat berbunga terus-menerus sepanjang tahun sehingga dapat diambil sampel jaringan pada berbagai stadia fisiologi tanaman. Untuk itu, jeruk Kalamondin dapat digunakan sebagai *raw model* pada penelitian ini, karena sifatnya yang responsif terhadap perlakuan.

Tujuan penelitian ini ialah membandingkan produksi embrio Kalamondin melalui teknologi somatik embriogenesis pada kultur cair menggunakan *shaker* dan bioreaktor.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balitjestro dari bulan September 2008 sampai dengan Desember 2009. Eksplan yang digunakan ialah jaringan nuselus yang diambil dari delapan buah muda yang berumur ± 14 minggu setelah bunga mekar.

Masing-masing buah diambil sampel nuselus, sehingga jumlah sampel keseluruhan ada 40 nuselus.

Eksplan nuselus dikulturkan pada media nuselus, yaitu MS + Vit MS 2X + FeEDTA 2X + 50 g/l sukrose. Kalus yang tumbuh diperbanyak pada media MS padat + 500 mg/l ME + 3 mg/l BA (Devy *et al.* 2007). Setelah kalus dihasilkan cukup dengan struktur yang remah, maka untuk lebih cepat tersedia dalam jumlah cukup, kalus di subkulturkan pada media cair dengan komposisi sama dan di-*shaker* selama 8 minggu. Setelah di-*shaker*, kalus embrionik ditransfer ke dalam dua perlakuan, yaitu (1) *shaker* dan (2) *bulb bioreactor* yang berisi media cair dengan komposisi yang sama untuk menginduksi perkembangan kalus embrionik dan tumbuhnya embrio. Embrio yang telah tumbuh baik dari perlakuan *shaker* dan bioreaktor disemaikan pada media padat MS standar. Secara umum alur perbanyakan kalus maupun embrio disajikan pada Gambar 1.

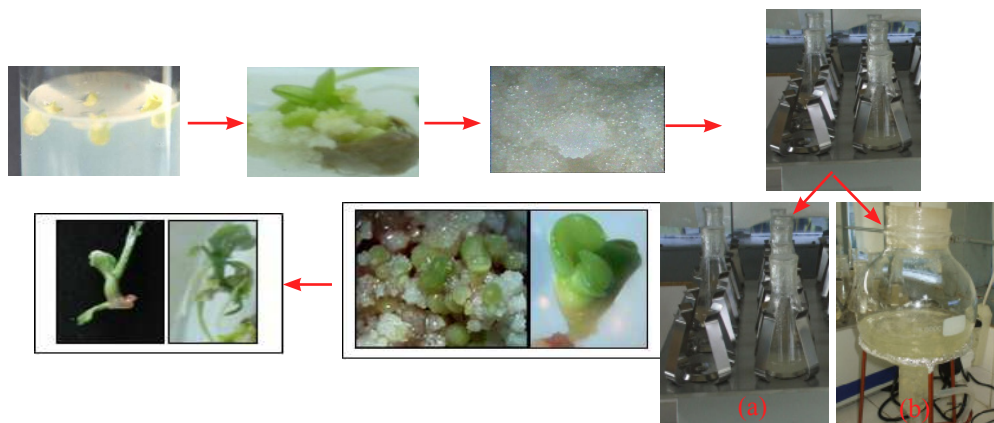
Pengamatan Kemampuan Produksi Embrio/ Nuselus

Saat tumbuh kalus pada eksplan nuselus

Sampel nuselus dikulturkan pada media nuselus yang terdiri atas hara MS makro dan mikro, sukrose 50 g/l; tiamin-HCl 0,4 mg/l; piridoksin-HCl 2 mg/l; asam nikotinic 2 mg/l; *myo-inositol* 200 mg/l; dan *glysin* 8 mg/l; serta *bacto agar* 7 g/l; pH medium diatur sampai mencapai 5,7. Setiap botol terdapat lima jaringan nuselus. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai tampak tumbuhnya kalus atau embrio pada jaringan tersebut.

Jumlah embrio yang tumbuh pada jaringan nuselus

Pengamatan dilakukan dengan mengiris kulit biji serta mengeluarkan embrio yang tumbuh (*direct*



Gambar 1. Alur perbanyakan embrio menggunakan a. *shaker* dan b. *bulb bioreactor* (Scheme of embryos propagation using a. *shakers* and b. *bulb bioreactor*)

embryo) per nuselus. Pengamatan dilakukan pada kultur sampai dengan umur 45 hari.

Perbanyak Kalus Embrionik

Kalus embrionik diperbanyak dengan cara di-*shaker* pada kecepatan 100 rpm, selama 2 bulan menggunakan media cair MS + 3 ppm BA + 500 mg/l ME + 5% sukrose sebanyak 100 cc/erlenmeyer. Kalus hasil perbanyak kemudian diperbanyak dan diinduksi menjadi embrio menggunakan dua cara, yaitu dikulturkan pada *shaker* dan bioreaktor.

Pengamatan Kemampuan Multiplikasi Kalus Embrionik dan Jumlah Embrio yang Tumbuh

Kalus embrionik yang dihasilkan pada tahap II, diperbanyak serta diinduksi menjadi embrio pada media yang sama. Setelah volumenya mencukupi, maka 1 g kalus embrionik dimasukkan ke dalam *shaker* (100 rpm), dikulturkan pada media cair MS + 3 ppm BA + 500 mg/l ME +5% sukrose sebanyak 100 cc/erlenmeyer. Pengamatan dilakukan setiap bulan dengan menimbang berat basah kalus embrionik yang tumbuh. Pengamatan dilakukan sampai kultur berumur 2 bulan (dua kali subkultur).

Pengamatan Kemampuan Produksi Embrio dari Kalus Embrionik pada Bioreaktor

Pada percobaan ini, 3 g kalus embrionik dikulturkan pada bioreaktor yang berisi media cair MS + 3 ppm BA+3 ppm ME secara *in vitro*. Untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan kalus, maka bioreaktor diberi suplai oksigen dengan pencahayaan dengan intensitas ± 1.000 lux, serta dengan suhu ruangan 20°C.

Pengamatan dilakukan secara visual dan kuantitatif. Pengamatan visual dengan cara memberi tanda (*marker*) pada awal kultur dan diulang setiap 2 minggu sekali, sedangkan secara kualitatif, dengan cara menghitung jumlah embrio yang tumbuh dari kalus embrionik pada akhir pengamatan 10 MSK.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan Kemampuan Produksi Embrio/ Nuselus

Saat tumbuh kalus embrionik dari eksplan nuselus

Secara umum pada jaringan nuselus, kalus, dan embrio dapat tumbuh secara bersamaan (Gambar 2). Kalus tumbuh pada bagian ujung serta seluruh permukaan, kemudian diikuti oleh tumbuhnya embrio yang berasal dari jaringan bagian dalam.

Nuselus merupakan suatu jaringan yang terbentuk bersamaan dengan perkembangan suatu biji tanaman. Sel-sel dari jaringan ini mempunyai sifat somatik embriogenesis, yaitu sel-sel berkembang menjadi kalus dan kalus tersebut dapat berdiferensiasi dan berkembang menjadi tanaman melalui fase embrio, sehingga menurut Chapman *et al.* (2000) pada tanaman jeruk proses somatik embriogenesis terjadi secara tidak langsung. Dalam hal ini embrio yang terbentuk dalam biji tersebut bukan merupakan gabungan dari gamet kedua induknya (Salisbury & Ross 1992). Menurut Evans *et al.* (1981) dan Tisserat (1985) jaringan tersebut lebih responsif terhadap medium *in vitro* dibandingkan jaringan lain yang lebih dewasa. Nuselar atau kalus embrionik mempunyai potensial besar untuk menghasilkan embrio somatik untuk produksi tanaman yang bebas virus (Navarro & Juarez 1977).

Dari beberapa penelitian, banyak embrio nuselar yang dapat berkembang pada embrio zigotik pada biji secara individual pada jenis jeruk tertentu, sehingga diklasifikasikan sebagai jeruk poliembrionik. Semaian nuselar banyak digunakan sebagai sumber materi batang bawah karena secara genetik seragam dan sama dengan induknya. Selain hal tersebut, embrio nuselar dapat digunakan pula sebagai eksplan untuk menghasilkan embrio somatik sekunder (Belkoura *et al.* 1995).

Dari hasil pengamatan, rerata saat tumbuhnya kalus atau *direct embryo* terjadi pada selang hari ke 12–40 atau rerata pada hari ke-24 setelah kultur (Tabel 1).

Devy (2004) melaporkan bahwa embrio dan kalus batang bawah jeruk JC dapat tumbuh secara bersamaan pada media MS embrio (MS standar + 3% sukrose + 0,7% *bacto agar*) sekitar 15–45 hari setelah tanam (HST). Pertumbuhan nuselus ditandai dengan pertumbuhan dan perkembangan kalus pada lapisan permukaan atas jaringan. Menurut Mendes-da Gloria *et al.* (1999), kemampuan eksplan untuk tumbuh dan



Gambar 2. Kalus dan embrio (langsung) tumbuh pada jaringan nuselus Kalamondin (*Callus and embryo that grow from a Kalamondin nucellar tissue*)

Tabel 1. Rerata saat tumbuhnya kalus dan embrio jeruk Kalamondin (*The average of Kalamondin citrus callus and embryos growing*)

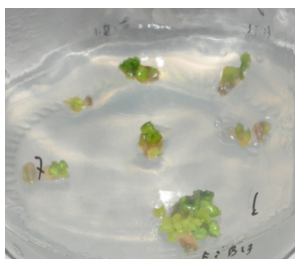
No. Buah (fruits no.)	Rerata hari tumbuhnya kalus dan embrio (<i>The average of callus and embryo growing time</i>)					
	Nuselus 1 (<i>Nucelus 1</i>)	Nuselus 2 (<i>Nucelus 2</i>)	Nuselus 3 (<i>Nucelus 3</i>)	Nuselus 4 (<i>Nucelus 4</i>)	Nuselus 5 (<i>Nucelus 5</i>)	Rerata (<i>Average</i>)
1	33	12	17	33	33	25,6
2	12	31	17	25	17	20,4
3	31	33	25	33	25	29,4
4	31	33	25	33	25	29,4
5	31	17	25	17	17	21,4
6	12	12	17	33	17	18,2
7	40	17	27	25	17	25,2
8	12	17	33	17	33	22,4
Rerata hari tumbuhnya kalus/embrio (<i>The average of callus and embryo growing time</i>)						24,0

berkembang sangat bergantung pada kultivar dan media kulturnya.

Varietas jeruk yang digunakan sebagai eksplan diduga berpengaruh terhadap kemampuan jaringan nuselus untuk tumbuh pada media. Dari hasil penelitian Obukosia & Waithaka (2000) diperoleh informasi bahwa pada kultur nuselus jeruk manis Valencia Late dan RL, embrio somatik dihasilkan dalam rentang waktu 60 hari pada media MS + 0,4 g/l CH atau MS + 10% CW, sedangkan embrio yang dipisahkan dan dikulturkan pada media MS yang mengandung CH atau CW tanpa ZPT, dapat berakar pada 4–8 bulan setelah kultur (BSK) dan tunas pada 6–9 BSK, sedangkan kalus juga dapat tumbuh baik pada 4–5 BSK.

Jumlah embrio yang tumbuh pada jaringan nuselus

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung embrio (*direct embryo*) yang tumbuh pada seluruh permukaan jaringan nuselus. Pengamatan dilakukan pada kultur berumur 45 hari (Gambar 3).



Gambar 3. *Direct embryo* yang tumbuh pada jaringan nuselus Kalamondin (*Direct embryos that grow from a Kalamondin nuselus tissue*)

Kemampuan nuselus Kalamondin untuk menghasilkan *direct embryo* berkisar antara 1–12 buah/eksplan, dari 40 eksplan rerata jumlah *direct embryo* yang tumbuh ialah 4,08 buah/eksplan (Tabel 2). Keragaman jumlah yang relatif tinggi ini diduga

dengan umur atau kematangan secara fisiologis dari sumber buah yang digunakan sebagai sampel. Rerata jumlah ini lebih rendah dibandingkan dengan yang mampu dihasilkan eksplan batang bawah jeruk JC dan Volkameriana. Rerata jumlah embrio yang dihasilkan per nuselus pada Volkameriana dan JC masing-masing 11,8 dan 7 (Devy & Yulianti 2010).

Menurut George (1996), pada embriogenesis secara langsung, struktur globular muncul pada pertumbuhan embrio fase I, walaupun eksplan berada pada media tanpa auksin. Struktur tersebut dapat berkembang menjadi embrio matang dan planlet.

Kemampuan produksi embrio dari kalus

Kalus dari hasil perbanyakan dikulturkan pada media cair MS + 3 ppm BA + 500 mg/l ME +5% sukrose sebanyak 1 g/100 cc media/erlenmeyer. Kultur di-*shaker* secara konstan dengan kecepatan 100 rpm pada ruang inkubasi dengan suhu ruang ± 20°C. Dari hasil pengamatan diperoleh bahwa embrio mulai tumbuh pada minggu ke-4 setelah kultur (Gambar 4).

Pengamatan dilakukan pada 6 dan 10 MSK, dengan menghitung jumlah embrio yang tumbuh pada kultur tersebut. Dari hasil pengamatan, diperoleh pertumbuhan embrio dari kalus pada media kultur MS + 3 ppm BA+3 ppm ME kurang memuaskan, karena jumlah yang terdeteksi sampai dengan umur 2 bulan baru mencapai ±18,46 embrio/g kalus (Tabel 3).

Menurut Han *et al.* (2002), pembentukan embrio dari kalus sangat dipengaruhi oleh ukuran yang telah dicapai oleh kalus itu sendiri serta jenis kultivar eksplan yang dikulturkan. Pada jeruk Satsuma kultivar Miyagawa Wase, kalus dengan ukuran diameter 1 mm menghasilkan embrio yang lebih banyak dibandingkan dengan kalus yang berukuran 0,5 mm, sedangkan dengan ukuran kalus yang sama, embrio yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan pada kalus jeruk Satsuma

Tabel 2. Rerata jumlah *direct embryo* yang tumbuh/eksplan (*The average of total direct embryos/explant*)

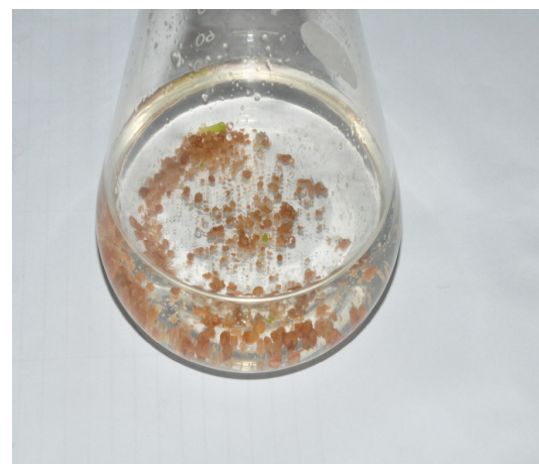
No. Buah (Fruits no.)	Rerata jumlah <i>direct embryo</i> /eksplan (<i>The average of total direct embryos/explant</i>)					
	Nuselus 1 (Nucelus 1)	Nuselus 2 (Nucelus 2)	Nuselus 3 (Nucelus 3)	Nuselus 4 (Nucelus 4)	Nuselus 5 (Nucelus 5)	Rerata (Average)
1	11	2	1	6	5	5
2	1	1	2	3	2	1,8
3	3	1	2	4	4	2,8
4	4	11	1	1	3	4
5	1	5	7	7	1	4,2
6	5	1	11	2	1	4
7	4	12	7	2	4	5,8
8	3	3	9	4	6	5
Rerata jumlah <i>direct embryo</i> /eksplan (<i>The average of total direct embryos/explant</i>)						4,08

kultivar Sugiyama Unshu.

Pengamatan Kemampuan Produksi Embrio dari Kalus Embrionik pada Bioreaktor

Bioreaktor merupakan alat yang mulai dikembangkan untuk penggandaan (*scale up*) pada proses mikropropagasi, khususnya melalui teknologi somatik embriogenesis. Metode ini digunakan untuk mempercepat terbentuknya embrio dari kalus embrionik. Dengan volume tabung lebih besar (3 l) serta dengan adanya suplai oksigen ke dalam kultur tersebut, diharapkan optimalisasi produksi embrio dan planlet menjadi lebih cepat persatuan berat dan waktu. Dari pelaksanaannya, pengamatan hanya dapat dilakukan sampai dengan umur 10 MSK, karena kultur terkontaminasi bakteri. Menurut Ziv (2000), permasalahan utama dalam mikropropagasi pada skala besar dalam bioreaktor ialah kontaminasi mikrobial. Hal ini diduga menyebabkan embrio yang tumbuh relatif rendah dari perkiraan, walaupun hasil tersebut masih lebih tinggi dibandingkan dengan sistem *shaker*.

Secara visual, dari hasil pengamatan diperoleh bahwa pada umur 6 MSK, volume kalus embrionik yang ada bertambah sebanyak 100% atau dua kali dibandingkan dari awal (Gambar 5), sedangkan warna eksplan berubah dari putih kecoklatan menjadi putih kehijauan. Hal ini disebabkan adanya embrio yang



Gambar 4. Embrio yang tumbuh dari kalus embrionik (*The embryos that grow from embryonic callus*)

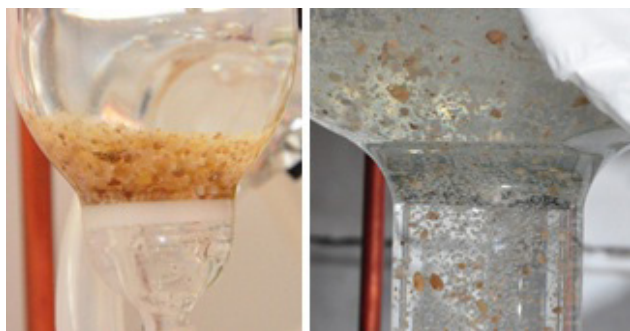
mulai tumbuh pada media tersebut (Gambar 6). Pada minggu ke-10, volume embrio bertambah menjadi tiga kali lipat dibandingkan volume awal (Gambar 7). Menurut Noriega & Sondahl (1993) setelah minggu ketiga, jaringan biomasa kalus embrionik jeruk menjadi dua kali lipat.

Secara kuantitatif terlihat bahwa embrio yang tumbuh dari kalus embrionik jumlahnya lebih tinggi dengan sistem bioreaktor dibandingkan dengan sistem

Tabel 3. Rerata jumlah embrio yang tumbuh/g kalus (6 dan 10 MSK) pada sistem *shaker* (*The average of total embryos/g of callus (6 and 10 WAC) using shaker system*)

Ulangan (Replicate)	Berat kalus awal (Callus weight) g	Jumlah embrio (Total embryos) 6 minggu (weeks)	Jumlah embrio (Total embryos) 10 minggu (weeks)	Rerata jumlah embrio/ kalus (Average of amount embryos), g
1	1,62	28	36	22,22
2	1,75	19	29	16,57
3	2,59	26	43	16,60
Rerata (Average)	1,99	24,33	36	18,12

MSK (WAC): Minggu setelah kultur (*Weeks after culture*)



Gambar 5. Warna dan volume kalus embriogenik awal kultur (*Color and volume of callus embryogenic at starting culture*)



Gambar 6. Warna dan volume kalus embriogenik setelah kultur 6 minggu (*Color and volume of callus embryogenic at 6 weeks culture*)



Gambar 7. Warna dan volume kalus embriogenik setelah kultur 10 MSK (*Color and volume of callus embryogenic at 10 weeks after culture*)



Gambar 8. Planlet Kalamondin (*Plantlets of Kalamondin*)

Tabel 4. Rerata jumlah embrio yang tumbuh/g kalus (10 minggu setelah kultur) pada sistem bioreaktor (*The average of total embryos/g of callus (10 weeks after culture) using bioreactor system*)

Berat kalus awal (<i>Calli weight</i>), g	Jumlah total embrio (<i>Total embryos</i>), 10 mg	Rerata jumlah embrio/g kalus (<i>Average amnt embryos/gram calli</i>), 10 mg
3	146	48,6

shaker. Dengan sistem *shaker*, dalam kurun waktu 10 minggu, setiap gram kalus yang dikultur, tumbuh embrio sejumlah 18,12 (Tabel 3), sedangkan dengan sistem bioreaktor, dengan berat kalus yang sama, jumlah embrio yang tumbuh sejumlah 48,6 (Tabel 4) atau lebih banyak sebesar 253%.

Pengamatan Kemampuan Produksi Planlet

Embrio yang dihasilkan dari bioreaktor, dikulturkan pada media padat untuk persemaian embrio, yaitu media MS embrio (MS standar + Vit MS 2X + FeEDTA 2x). Pada minggu ke-4 setelah kultur, embrio yang disemaikan mulai tumbuh menjadi planlet (Gambar 8).

Dari hasil pengamatan diperoleh bahwa kemampuan berkembangnya embrio menjadi planlet normal pada jeruk Kalamondin sangat memuaskan, yaitu mencapai rerata 100%.

Embrio dapat terbentuk secara individual maupun berproliferasi dengan cara *budding*. Pada embrio yang tumbuh secara bergerombol, untuk lebih cepat berkembang menjadi planlet jika embrio tersebut dipisahkan menjadi individual. Tiga macam pola pertumbuhan embrio *in vitro* yang terjadi, yaitu sebagian embrio berkembang menjadi planlet dengan bagian pucuk dan akar ganda, ada yang tumbuh

akarnya tanpa bagian pucuk serta ada pula yang berkembang tanpa berdiferensiasi menjadi pucuk atau akar. Menurut Obukosia & Waithaka (2000), hal ini disebabkan terjadinya proses pemisahan embrio yang tidak sempurna pada fase perkembangan, sehingga mendorong terjadinya penyambungan pada kedua calon planlet tersebut. Hal lain yang menyebabkan terjadinya ketidaknormalan ialah pertumbuhan dari kotiledon yang berlebihan, sehingga tidak mampu berdiferensiasi menjadi pucuk dan akar.

KESIMPULAN

1. Pada jeruk Kalamondin, embrio somatik dapat dihasilkan dari eksplan nuselus;
2. Pada eksplan nuselus, kalus, dan *direct* embryo dapat tumbuh merata pada hari ke-24 dengan rerata jumlah *direct embryo* 4 buah/eksplan;
3. Dengan sistem *shaker* (100 rpm), pada umur kultur 10 minggu, rerata embrio yang dapat tumbuh ialah 18 embrio/g kalus/100 cc media;
4. Dengan menggunakan bioreaktor, pada umur kultur 10 minggu, total volume embrio yang tumbuh menjadi 300% dengan jumlah embrio sebesar 146 atau rerata setiap gram kalus embrionik mampu menumbuhkan embrio sebanyak 48 atau lebih banyak sebesar 253%;
5. Embrio yang terbentuk pada bioreaktor, dapat tumbuh 100% menjadi planlet.

SARAN

1. Hasil penelitian ini perlu dikaji lebih lanjut terutama dalam hal metode pengendalian kontaminasi media dan kalus, penentuan media yang optimal serta pengaruh oksigen yang terlarut pada perbanyakan embrio dan planlet;
2. Pengujian *true to type* terhadap semaian jeruk hasil somatik embriogenesis perlu dilakukan untuk menjamin kualitas semaian jeruk.

PUSTAKA

1. Amirato, PV, Evans, DE, Sharp, WR, & Yamada, Y 1984, 'Handbook of plant cell culture', *Crop Species*, vol. 3, Macmillan, NY.
2. Bhaskaran, S & Smith, RH 1990, 'Regeneration in cereal tissue culture, a review', *Crop Sci.*, no. 30, pp.1328-36.
3. Belkoura, I, Ismaili, M, Dubois, JV, & Dubois, T 1995, 'Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of Troyer citrange from hypocotyl segments of nucellar embryos', *Fruits*, vol. 50, no. 5, pp. 353-58.
4. Cabasson, C, Alvard, D, Dambier, PD, Ollitrault & Teisson, C 1997, 'Improvement of citrus somatik embryo development by temporary immersion', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, no. 50, pp. 33-7

5. Chapman, AB, Tissier, A-S Delbreil, JP, Vasseur, BJ & Hilbert, J-L 2000, 'Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plants, 1. Scanning and transmission electron microscopy study on embryos originating from direct, indirect, and adventitious pathways', *Can. J. Bot.*, no. 78, pp. 816-23.
6. Devy, NF 2004, 'The propagation of free-virus citrus rootstock var JC via nucellus culture in vitro', paper presented to The 3rd Indonesian biotechnology conference 2004, an International Conference and Exhibition, Bali, 1-3 Desember.
7. Devy, NF, Hardiyanto, & Jati 2007, 'Pengaruh macam media terhadap pertumbuhan kultur embrio nuselar JC *in vitro* dan metode perbanyakan planletnya', *J. Hort. (Ed. khusus)* vol. 17, no. 3, hlm. 215-24.
8. Devy, NF & Yulianti 2010, *Perbanyakan batang bawah jeruk melalui metode somatik embriogenesis*, Laporan akhir penelitian TA 2009, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Tlekung, Malang.
9. D'Onghia, AM, Carimi, F, De Pasquale, F, Djelouah, D, & Martelli 2001, 'Elimination of citrus psorosis virus by somatic embryogenesis from stigma and style cultures', *Plant Pathol.*, no. 50, pp. 26-69.
10. Evans, DA, Sharp, WR, & Flick, CE 1981, Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis, in Thorpe, TA (ed.), *Plant tissue culture methods and applications in agriculture*, Acad Press, New York.
11. Etienne, H, Larfaud, M, Michaux-Ferriere, N, Carron, MP, Berthouly, M & Teisson, C 1997, 'Improvement of somatic embryogenesis *Hevea brasiliensis* (Mull Arg) using the temporary immersion technique', *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant*. no. 33, pp. 81-7.
12. Etienne, H, Dechamp, E, Barry-Etenne, & Bertrand, B 2006, 'Bioreactors in coffee micropropagation', *Braz. J. Plant. Physiol.*, vol. 18, Print version ISSN 1677-0420.
13. George, EF 1996, *Plant propagation by tissue culture part 2, in practice*, 2nd edition. Exegeticsd Ltd, England.
14. Han, SH, Kang, SK, A, 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.
15. Harrell, RC, Bieniek, B, Hood, CF, Munilla, R & Cantlife, DJ 1994, 'Automated in vitro harvest of somatic embryos', *Plant Cell Tissue Organ Culture*, no. 39, pp. 171-83.
16. Lewinsohn, E, Britsch, L, Mazur, Y & Gressel, J 1989, 'Flavone glycoside biosynthesis in citrus', *Plant Physiol.*, no. 91, pp. 1323-28.
17. Navarro, L & Juarez 1977, 'Elimination of citrus pathogens in propagative budwood II, *in vitro* propagation', *Proc. Int. Soc. Citruculture*. no. 3, pp. 973-87.
18. Noriega, C & Sondahl, MR 1993, 'Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors', *Proceedings of the 15th International Scientific Colloquium on Coffee (ASIC)*, Montpellier, France, pp.73-81.
19. Obukosia, SD & Waithaka, K 2000, 'Nucellar embryo culture of *Citrus sinensis* L. and *Citrus limon* L.', *Afr. Crop. Sci. J.*, vol. 8, no. 2, pp. 109-16.
20. Salisbury, FB & Ross, CW 1992, *Plant physiology*, 4th ed', Wadsworth Pub. Com. Belmont, California.
21. Ziv, M 2000, 'Bioreactor technology for plant micropropagation, in Janick, J (ed.), *Horticultural reviews*, John Wiley & Sons, Inc., vol. 24, pp. 1-25.