

34

17

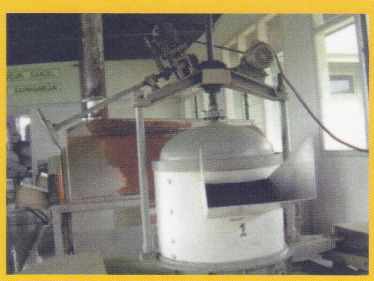
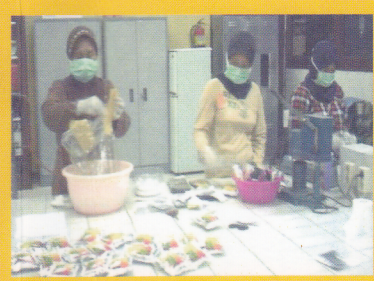
04

ISBN 978-602-8853-10-1
978-602-8853-13-2



PROSIDING SEMINAR HASIL-HASIL PENELITIAN IPB 2010

Buku 3 Bidang Teknologi dan Rekayasa



**PENGEMBANGAN METODE FUSI PROTOPLAS DENGAN TINGKAT
KEBERHASILAN PEMBENTUKAN FUSAN 25% UNTUK
MEMPEROLEH TANAMAN TRIPLOID JERUK GARUT TANPA BIJI
DENGAN PRODUKTIVITAS 15 TON/HA PADA UMUR 8 TAHUN:
ISOLASI PROTOPLAS, KULTUR PROTOPLAS, DAN REGENERASI
PROTOPLAS HASIL FUSI**

(Development of Protoplast Fusion Methods with 25% Efficiency Fusan
Formation and to get Garut Tangerine Triploid Seedless with 15 ton/ha
Productivity at 8 Years Old)

A Purwito¹⁾, A Husni, M Kosmiatin²⁾

¹⁾Dep. Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB

²⁾Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan
Sumber Daya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Jeruk keprok adalah jeruk lokal unggulan Indonesia yang termasuk dalam *true species* dari genus Citrus. Jeruk ini rasanya manis dan tetapi bijinya relatif banyak (15-23 biji/buah). Perbaikan jeruk tanpa biji dapat dilakukan dengan manipulasi tingkat ploidi. Tanaman dengan tingkat ploidi yang triploid biasanya mempunyai buah yang steril (tanpa biji). Hibridisasi somatik melalui teknik fusi protoplas adalah terobosan teknik yang memungkinkan diperoleh tanaman dengan tingkatan ploidi yang meningkat. Strategi ini dilakukan pada perakitan jeruk keprok triploid karena teknik isolasi, fusi dan regenerasi protoplas jeruk keprok dengan tingkat ploidi diploid telah dikuasai. Bahan tanaman yang digunakan untuk produksi sel haploid embriogenik adalah Bahan tanaman kuncup bunga jeruk keprok diambil dari tanaman tua (\pm 20 tahun) dan tanaman okulasi dari tanaman tua (\pm 8 tahun) serta populasi sel haploid jeruk keprok Batu 55 dan keprok Garut. Populasi sel haploid disubkultur berulang setiap 4 minggu pada media *double layer*, yaitu media padat MT+pikloram+ekstrak malt dan media cair yang ditambahkan adalah dasar MT dengan zat pengatur tumbuh BA (0-3 mg/l) dan Pikloram 0-20 mg/l serta ditambahkan ekstrak malt 500 mg/l. Hasil penelitian diperoleh bahwa Eksplan kuncup bunga yang berasal dari tanaman yang lebih muda (8 tahun) lebih baik responnya dibandingkan eksplan yang berasal dari tanaman yang lebih tua (>30 tahun). Pra perlakuan dingin lebih dari 3 hari lebih respon membentuk kalus dari pada praperlakuan kurang dari 3 hari. Formulasi enzim terbaik untuk mengisolasi protoplas diploid (kalus dan daun in vitro) dan protoplas haloid (polen) adalah macerozim 0,5% dan selulase 0,5% dengan masa inkubasi enzim 16 jam (*overnight*). Konsentrasi PEG 20% memberikan jumlah fusan yang lebih banyak dibanding dengan PEG 4% baik yang biner fusi, homo fusi, dan multi fusi. Regenerasi pembentukan dinding sel fusan, pembelahan sel, dan pembentukan suspensi sel terbaik diperoleh dari formulasi media MW+EM 500 mg/l+2.4 D 0.1 mg/l+BA 3 mg/l.

Kata kunci : Citrus reticulata, tanpa biji, triploid, fusi, protoplas haploid, protoplas diploid.

ABSTRACT

Tangerine is a citrus seed Indonesia and including a true species of the genus Citrus. This orange tastes sweet but relatively many seeds fruit seed (15-23 seeds/fruit). Seedless citrus improvement can be done by manipulating the level ploidy. Plants with triploid ploidy level usually have sterile fruit (seedless). Somatic hybridization by fusion technique is a breakthrough technique that allows the plant generated by an increased level ploidy. The strategy chosen to assemble the triploid tangerine because the technique

of protoplast isolation, fusion and regeneration of tangerine with diploid level has been mastered ploidy. The plant material used for the production of embryogenic haploid cell is a tangerine flower buds were taken from older plants (\pm 20 years) and grafting plants from old plants (\pm 8 years) and the haploid cell population tangerine of Batu 55 and Garut and the haploid cell population of BATu 55 and Garut tangerine. Haploid cell population repeatedly subcultured every 4 weeks in a double layer media: solid media MT + picloram + malt extract and liquid media, and liquid medium that added is the basic of the MT with growth regulators BA (0-3 mg / l) and Picloram 0-20 mg / l and add malt extract 500 mg/l. The plant material used for the production of diploid callus is a population of diploid cells induced from embryonic nucellar tangerine. Callus induction conducted on MS medium MW + vitamin + BA 3 mg / l malt extract + 500mg / l. The population of cells/callus that formed were subcultured every 4 weeks on MS or MW medium + vitamin + malt extract 500mg /l. Flower bud explants derived from young plants (8 years) responded better than explants from older plants (> 30 years). Pre cold treatment for more than 3 days on the response forming callus from pretreatment less than 3 days. The best enzyme formulations for the isolation of protoplasts from diploid (callus and leaves in vitro) and protoplast Haploid (pollen) is macerozim 0.5% and 0.5% cellulase enzyme with incubation period of 16 hours (overnight). With the concentration of PEG of 20% gives fusan amounted to more than 4% PEG two binary fusion, fusion homo, and multi-fusion. Regeneration of cell wall formation and cell suspension fusan best media formulations obtained from MW+EM 500 mg / l 2.4 D 0.1 mg / l+BA 3 mg / l.

Keywords : Citrus reticulata, seedless, triploid, fusion, haploid protoplasts, diploid protoplasts

PENDAHULUAN

Jeruk keprok adalah salah satu jeruk lokal unggulan Indonesia yang termasuk dalam *true species* dari genus Citrus. Jeruk ini rasanya cukup manis dan hampir mendekati kategori tipe jeruk yang sesuai dengan kebutuhan pasar dunia untuk konsumsi dalam keadaan segar. Akan tetapi jeruk tersebut masih mempunyai biji yang relatif banyak, berkisar antara 15-23 biji per buah sehingga kalah bersaing dengan jeruk produk negara lain. Hal ini terbukti dengan maraknya buah impor jeruk di pasar lokal mulai dari kaki lima, toko dan supermarket yang menekan produk jeruk lokal sehingga menjadi terpuruk. Hal ini mengakibatkan kerugian bagi petani jeruk di Indonesia. Keadaan ini diperparah dengan mulai diberlakukannya ASEAN FTA/AFTA yang disusul dengan ASEAN-China FTA sehingga pasar sesama ASEAN termasuk Indonesia semakin terbuka bagi produk-produk pertanian dari negara-negara produsen jeruk (China, Amerika Serikat, Australia, dan Pakistan) yang tingkat pertumbuhannya sangat pesat dan mempunyai harga yang relatif lebih murah (Hutabarat dan Setyanto, 2007).

Untuk menghindari tekanan buah jeruk impor tersebut maka diperlukan sentuhan inovasi teknologi terhadap jeruk lokal untuk meningkatkan kualitas buah sehingga dapat diterima dan bersaing di pasar global. Salah satu cara yang dapat dilakukan secara efisien dan efektif adalah membuat tanaman jeruk lokal tipe baru yang *seedless* (tanpa biji) dan mempunyai warna yang menarik sehingga sesuai dengan permintaan pasar.

Perbaikan jeruk tanpa biji dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain dengan cara manipulasi genetik pada tingkat ploidi. Perubahan tingkat ploidi akan menimbulkan perubahan ukuran dan vigoritas pohon, kualitas dan ketiadaan biji dalam buah (Mooney, *et al.*, 1997). Penggunaan kultivar poliploid mulai komersil sejak dikenalnya jeruk *Tahiti lime* yang merupakan jeruk triploid hasil poliploidisasi spontan (Bachi, 1940) dan tetraploid *Triphasia* (Esen dan Soost, 1972) yang merupakan jenis jeruk yang hampir tidak memiliki biji sama sekali.

Fenomena poliploid mempunyai peranan penting dalam proses evolusi pada banyak tanaman. Pemulia tanaman dapat melakukan manipulasi tingkat ploidi untuk mengamati tingkat keragaman melalui seleksi. Fenomena perubahan tingkat poliploidi ini sangat jarang ditemukan pada tanaman jeruk. Hal ini ditunjukkan oleh jarangya ditemukan jeruk yang tetraploid dan triploid, yang pada umumnya adalah diploid dengan jumlah kromosom sebanyak 18 (Lapin, 1937). Hongkong wild kumquat dan *Triphasia* adalah poliploid dengan level tetraploid yang alami ditemukan pada tanaman jeruk (Esen dan Soost, 1972) dan *Tahiti Lime* yang merupakan jenis jeruk yang mempunyai ploidi triploid (Bachi, 1940).

Tanaman dengan tingkat ploidi yang triploid biasanya mempunyai buah yang steril (tanpa biji) sehingga mempunyai nilai komersial yang tinggi. Menurut Falavigna dan Rotino, (2005), tidak terbentuknya biji dalam buah dapat meningkatkan produktivitas dan mutu buah seperti pada tanaman pisang, terung, anggur, semangka dan persimmon. Penggunaan jeruk triploid lebih banyak digunakan karena tanaman lebih vigor dan daun lebih lebar serta lebih tebal (Gmitter dan Ling, 1991), tumbuh lebih cepat, panen lebih baik dan lebih dapat beradaptasi dengan lingkungan yang lebih luas dibanding tanaman jeruk tetraploid

(Usman, *et al.*, 2006). Dari segi ekonomis jeruk triploid memiliki nilai yang lebih baik dibanding jeruk tetraploid.

Perubahan tingkat ploidi pada tanaman jeruk dapat diperoleh secara alami ataupun dengan manipulasi kromosom. Secara alami perubahan tingkat ploidi sangat rendah persentasenya dan sangat bergantung pada kemampuan partenokarpi, mandul jantan/betina dan inkompatibilitas tanaman asal (Koltunow, *et al.*, 1997). Manipulasi kromosom dengan memanfaatkan agen mutagen seperti kolkisin telah banyak dilakukan (Mooney, *et al.*, 1997). Tanaman mutan kemudian diseleksi, tetapi tingkat kesulitan seleksinya cukup tinggi karena adanya berbagai tingkatan ploidi pada individu tanaman yang diperoleh setelah perlakuan (khimera). Meskipun demikian sudah diperoleh tanaman jeruk tetraploid dan triploid yang dihasilkan melalui manipulasi kromosom dengan teknik kultur *in vitro* walaupun keberhasilannya masih kecil (Zhang, *et al.*, 2007).

Selain dengan agen mutagen, tanaman jeruk triploid dapat juga diperoleh dengan cara menyilangkan jeruk tetraploid dengan diploid, kemudian dilakukan penyelamatan embrio. Cara ini sudah dilakukan di New Zealand dan Australia (Mooney *et al.*, 1997), tetapi tingkat rekombinasinya cukup tinggi sehingga proses seleksi cukup lama dan menyulitkan.

Teknik lain adalah dengan mengkulturkan jaringan endosperma triploid dan meregenerasikannya membentuk tanaman. Cara ini sulit juga dilakukan karena jaringan endosperma pada biji jeruk terbatas jumlah dan waktunya sehingga keberhasilan meregenerasikannya masih rendah (Mooney, 1997). Selain itu endosperma yang digunakanpun harus berasal dari persilangan terkontrol untuk mengurangi faktor segregasi.

Teknologi yang sekarang ini mulai banyak dilakukan adalah hibridisasi somatik antara protoplas diploid dengan protoplas haploid. Teknologi ini memungkinkan diperoleh populasi sel triploid tanpa khawatir terjadi segregasi, karena hibridisasi dapat dilakukan pada protoplas yang berasal dari tanaman yang sama. Protoplas diploid dapat diperoleh dari jaringan mesofil daun atau kalus,

(Usman, *et al.*, 2006). Dari segi ekonomis jeruk triploid memiliki nilai yang lebih baik dibanding jeruk tetraploid.

Perubahan tingkat ploidi pada tanaman jeruk dapat diperoleh secara alami ataupun dengan manipulasi kromosom. Secara alami perubahan tingkat ploidi sangat rendah persentasenya dan sangat bergantung pada kemampuan partenokarpi, mandul jantan/betina dan inkompatibilitas tanaman asal (Koltunow, *et al.*, 1997). Manipulasi kromosom dengan memanfaatkan agen mutagen seperti kolkisin telah banyak dilakukan (Mooney, *et al.*, 1997). Tanaman mutan kemudian diseleksi, tetapi tingkat kesulitan seleksinya cukup tinggi karena adanya berbagai tingkatan ploidi pada individu tanaman yang diperoleh setelah perlakuan (khimera). Meskipun demikian sudah diperoleh tanaman jeruk tetraploid dan triploid yang dihasilkan melalui manipulasi kromosom dengan teknik kultur *in vitro* walaupun keberhasilannya masih kecil (Zhang, *et al.*, 2007).

Selain dengan agen mutagen, tanaman jeruk triploid dapat juga diperoleh dengan cara menyilangkan jeruk tetraploid dengan diploid, kemudian dilakukan penyelamatan embrio. Cara ini sudah dilakukan di New Zealand dan Australia (Mooney *et al.*, 1997), tetapi tingkat rekombinasinya cukup tinggi sehingga proses seleksi cukup lama dan menyulitkan.

Teknik lain adalah dengan mengkulturkan jaringan endosperma triploid dan meregenerasikannya membentuk tanaman. Cara ini sulit juga dilakukan karena jaringan endosperma pada biji jeruk terbatas jumlah dan waktunya sehingga keberhasilan meregenerasikannya masih rendah (Mooney, 1997). Selain itu endosperma yang digunakanpun harus berasal dari persilangan terkontrol untuk mengurangi faktor segregasi.

Teknologi yang sekarang ini mulai banyak dilakukan adalah hibridisasi somatik antara protoplas diploid dengan protoplas haploid. Teknologi ini memungkinkan diperoleh populasi sel triploid tanpa khawatir terjadi segregasi, karena hibridisasi dapat dilakukan pada protoplas yang berasal dari tanaman yang sama. Protoplas diploid dapat diperoleh dari jaringan mesofil daun atau kalus,

konsentrasi dan waktu inkubasi yang paling baik untuk menginduksi terjadinya fusi protoplas pada tanaman jeruk.

Pengamatan dilakukan secara mikroskopik untuk mengamati protoplas yang diperoleh, penghitungan densitas protoplas dilakukan dengan hemositometer, jumlah dan persentase protoplas yang mengalami fusi.

Regenerasi sel hibrid

Penelitian dilakukan untuk meregenerasikan sel-sel hibrid hasil fusi antara protoplas haploid dan diploid. Mikrokalus fusan yang terbentuk disubkultur pada media. Protoplas yang telah difusikan dengan larutan PEG dengan efisiensi fusi tertinggi dikulturkan untuk meregenerasi dinding sel protoplas.

Media kultur yang digunakan untuk meregenerasi dinding sel, pembelahan sel dan pembentukan mikrokalus adalah media MT + 500 mg/l EME (Grosser and Gmitter Junior, 1990) dan media MS + Vitamin Morell + 500 mg/l EME (Husni, 2005) dengan penambahan kombinasi BA dengan NAA yang diseterilisasi dengan filter 0,22 mikron. Kultur disimpan dalam inkubator dalam keadaan gelap pada suhu 28⁰C sampai terbentuk dinding sel dan mampu melakukan pembelahan.

Kultur sel fusan dipindahkan pada kondisi kultur dengan suhu 19 – 28⁰ C untuk mendorong pembelahan sel sampai terbentuk koloni sel. Agar koloni sel yang dihasilkan bertambah banyak, ditambahkan media yang sama kemudian kultur dipindahkan ke dalam ruangan yang diberi cahaya ±1000 lux dengan suhu 19- 25⁰C.

Pengamatan dilakukan secara mikroskopik (*in verted*) terhadap pertumbuhan dan perkembangan setiap sel sampai membentuk embrio.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi populasi sel haploid dan diploid

Bahan tanaman kuncup bunga jeruk keprok diambil dari tanaman tua (± 20 tahun) dan tanaman okulasi dari tanaman tua (± 8 tahun). Kuncup bunga di pra perlakukan pada temperatur dingin (± 10⁰C) dengan variasi lama simpan kuncup bunga 1-7 hari. Antera diisolasi dari kuncup bunga yang sudah dipraperlakukan

dingin dan telah steril. Antera dikulturkan pada formulasi media dasar MS modifikasi dan MT dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4 D dan pikloram.

Pada eksplan yang berasal dari tanaman jeruk keprok tua terlihat respon antera pada media *in vitro* tidak begitu baik baik pada media dasar. Hal ini ditunjukkan dengan tingginya persen eksplan yang mengalami kematian (Tabel 1). Eksplan yang tidak mati umumnya tidak mengalami pertumbuhan. Eksplan yang berespon positif, membengkak dan mengkalus sangat rendah.

Pra perlakuan dingin tidak memberikan pengaruh karena eksplan yang mati terjadi pada seluruh praperlakuan, mulai penyimpanan 1 hari sampai 7 hari. Antera yang mengkalus hanya 3,13% (Tabel 1) yang ditumbuhkan pada media dasar MT dengan penambahan 2,4-D 20 mg/l serta sudah dipraperlakukan dingin selama 5 hari.

Hasil ini berbeda dengan antera jeruk keprok Garut yang disimpan selama 3 hari pada temperatur rendah, antera ini mampu membentuk kalus pada media dasar MT dengan penambahan 30 mg/l pikloram maupun 2,4-D (Kosmiatin *et al*, 2009). Pada antera yang diambil dari tanaman jeruk keprok hasil okulasi dari tanaman jeruk keprok tua yang berumur sekitar 8 tahun, respon *in vitro* antera sangat berbeda dengan antera dari tanaman induknya. Antera yang berasal dari tanaman yang relatif muda lebih respon pada seluruh perlakuan formulasi media. Pra perlakuan yang diuji menunjukkan kecenderungan bahwa lama penyimpanan yang lebih lama pada suhu mempunyai respon yang lebih baik. Hal ini ditunjukkan dengan rendahnya kematian antera pada pra perlakuan 5 dan 7 hari dibandingkan pra perlakuan 1 hari (Tabel 2). Penyimpanan pra perlakuan 1 hari pada suhu dingin mengalami kematian 100% antera atau kontaminasi. Persentase kematian antera terendah (0%) berasal dari antera yang disimpan selama 3 hari atau lebih dari 3 hari pada suhu rendah. Pada *C. Clementina* pra perlakuan dilakukan pada suhu rendah selama 8-15 hari. Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa kondisi viabilitas antera dapat dipertahankan dan menunjukkan perkembangan mikrospora dengan inti tunggal tertinggi (Germana, 2003). Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa kuncup bunga jeruk keprok mulai mencoklat bila disimpan lebih dari 5 hari dan setelah 7 hari dan akhirnya menjadi layu. Hal ini terjadi karena jarak lokasi tanaman jeruk keprok yang sangat jauh

dari laboratorium, sehingga memerlukan penanganan yang lebih baik selama dalam perjalanan.

Tabel 1. Respon antera yang berasal dari tanaman jeruk keprok tua setelah disimpan 1, 3, 5, dan 7 hari serta formulasi media dasar kultur yang digunakan.

Formulasi Media (mg/l)	Pra perlakuan (hr)	Σ antera	% respon antera pada formulasi media induksi kalus			
			Tetap	Mati	Bengkak	Klus
MS+Pik 10	1	Ktm	-	-	-	-
	3	13	100	0	0	0
	5	25	100	0	0	0
	7	ktm	-	-	-	-
MS+Pik20	1	Ktm	-	-	-	-
	3	25	100	0	0	0
	5	16	0	100	0	0
	7	25	100	0	0	0
MS+Pik 30	1	Ktm	-	-	-	-
	3	22	100	0	0	0
	5	27	66,67	14,81	18,52	0
	7	23	91,30	8,70	0	0
MS+2,4-D 10	1	Ktm	-	-	-	-
	3	25	100	0	0	0
	5	8	100	0	0	0
	7	12	33,33	66,67	0	0
MS+2,4-D 20	1	Ktm	-	-	-	-
	3	14	78,57	21,43	0	0
	5	19	100	0	0	0
	7	14	100	0	0	0
MS+2,4-D 30	1	Ktm	-	-	-	-
	3	16	43,75	56,25	0	0
	5	16	100	0	0	0
	7	15	33,33	66,67	0	0
MT+Pik 10	1	Ktm	-	-	-	-
	3	30	23,33	76,67	0	-
	5	13	23,08	76,92	0	-
	7	18	11,11	50,00	38,89	-
MT+Pik20	1	Ktm	-	-	-	-
	3	30	30,00	70,00	0	0
	5	Ktm	-	-	-	-
	7	17	0	100	0	0
MT+Pik 30	1	15	46,67	53,33	0	0
	3	31	22,58	77,42	0	0
	5	13	38,46	61,54	0	0
	7	Ktm	-	-	-	-
MT+2,4-D 10	1	Ktm	-	-	-	-
	3	30	13,33	86,67	0	0
	5	26	26,92	53,85	19,23	0
	7	Ktm	-	-	-	-
MT+2,4-D 20	1	Ktm	-	-	-	-
	3	15	6,67	73,33	20,00	0
	5	32	21,87	56,25	18,75	3,13
	7	14	0	100	0	0
MT+2,4-D 30	1	15	46,67	53,33	0	0
	3	29	24,14	75,86	0	0
	5	15	33,33	66,67	0	0
	7	13	15,38	84,62	0	0

Keterangan : MS = Media dasar MS +vitamin Morel dan Weitmore;MT = Media dasar MT Pik = Pikloram; Perlakuan dingin pada temperatur 10°C

Menurut Custer (2003), kuncup bunga yang digunakan sebagai sumber mikrospora untuk kultur haploid harus secepat mungkin dibawa ke laboratorium untuk mempertahankan viabilitas anteranya. Selain itu, formulasi media kultur dan cara penyimpanan juga sangat mempengaruhi keberhasilan kultur haploid.

Formulasi media dasar yang digunakan yaitu MS modifikasi dan MT. Ke dua media dasar tersebut dapat digunakan sebagai media kultur untuk menginduksi terjadinya pembentukan kalus dari antera. Kedua jenis media dasar ini juga tetap memberikan hasil yang baik bila dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh kelompok auksin 2,4-D maupun pikloram. Meskipun kedua jenis media dasar tersebut berhasil menginduksi pembentukan kalus, persentase pembentukan kalus tertinggi diperoleh dari antera yang di pra perlakukan selama 7 hari dan dikulturkan pada media MS modifikasi dengan penambahan pikloram 30 mg/l (82,35%, Tabel 2). Hasil yang cukup baik juga diperoleh dari antera yang diperlakukan sama tetapi dikulturkan pada media MS modifikasi yang dikombinasikan dengan 2,4-D 20 mg/l (80,65%, Tabel 2). Dari hasil ini terlihat bahwa penggunaan auksin pikloram maupun 2,4-D efektif menginduksi pembentukan kalus pada media dasar MS modifikasi.

Penggunaan MS modifikasi lebih baik dari pada MT, hal ini terjadi karena vitamin MW yang ditambahkan pada medium basal mengandung komposisi yang lebih lengkap daripada MT. Vitamin MW terdiri dari kombinasi myo-inositol, asam nikotinat, thiamin, pyridoksin, biotin, asam folat dan kalsium panthotenat, sedangkan vitamin MT hanya terdiri dari kombinasi myo-inositol, asam nikotinat, thiamin, pyridoksin. Penggunaan komposisi vitamin yang kompleks banyak berhasil pada dalam kultur antera *C. Clementina* (Germana, 2003); asparagus (Falagvina *et al.*, 1999); *Brassica sp* (Ferrie, 2003); Rye (Pulli dan Guo, 2003).

Hasil penelitian ini juga memperlihatkan bahwa bahan tanaman yang diambil dari tanaman yang berbeda umurnya mempunyai respon yang berbeda pula terhadap media kultur yang digunakan, meskipun jenis jeruk yang digunakan sama.

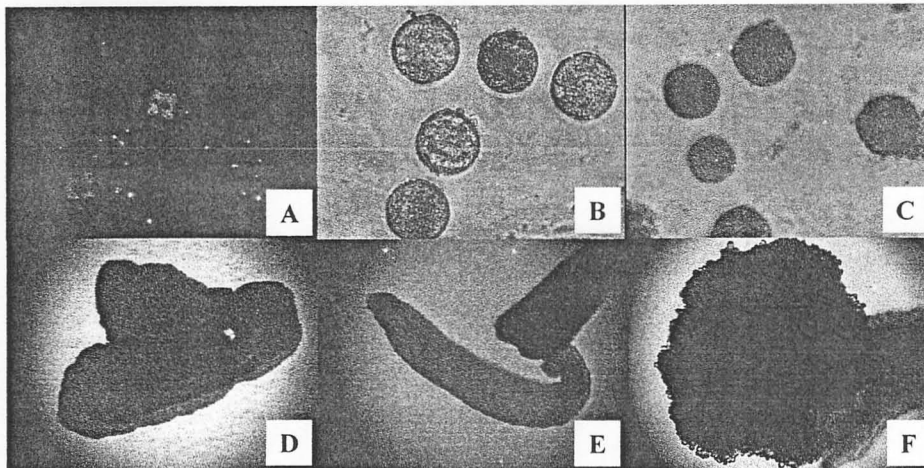
Hal ini juga sesuai dengan yang terjadi pada kultur antera *C. clementina* dan tanaman berkayu lainnya, dimana keberhasilannya sangat ditentukan oleh genotipe, kondisi fisiologi tanaman donor (Germana *et al.*, 2000).

Tabel 2. Respon antera yang berasal dari tanaman jeruk keprok okulasi setelah disimpan 1, 3, 5, dan 7 hari serta formulasi media dasar kultur yang digunakan.

Formulasi Media (mg/l)	Pra perlakuan (hari)	Σ antera	% respon antera pada formulasi media induksi kalus			
			Tetap	Mati	Bengkak	Kalus
MSPik 10	1	Ktm	-	-	-	-
	3	26	84,62	0	15,38	0
	5	24	0	58,33	0	41,67
	7	34	5,88	38,24	26,47	29,41
MSPik20	1	Ktm	-	-	-	-
	3	Ktm	-	-	-	-
	5	31	48,39	0	35,48	16,13
MSPik 30	7	10	60,00	10,00	30,00	0
	1	Ktm	-	-	-	-
	3	16	100	0	0	0
MS2,4-D 10	5	28	32,14	0	32,14	35,71
	7	17	17,65	0	0	82,35
	1	Ktm	-	-	-	-
MS2,4-D 20	3	34	76,47	0	11,76	11,76
	5	15	20,00	33,33	46,67	0
	7	17	0	0	41,18	58,82
	1	Ktm	-	-	-	-
MS2,4-D 30	3	29	100	0	0	0
	5	15	0	0	100	0
	7	31	0	0	19,35	80,65
	1	Ktm	-	-	-	-
MTPik 10	3	14	78,57	0	21,43	0
	5	34	2,94	41,18	8,82	47,06
	7	30	40,00	0	53,33	6,67
	1	Ktm	-	-	-	-
MTPik20	3	14	50,00	35,71	14,29	0
	5	28	25,00	35,71	32,14	7,14
	7	15	13,33	33,33	53,33	0
	1	14	0	100	0	0
MTPik 30	3	17	41,18	41,18	17,65	0
	5	16	0	0	37,50	62,50
	7	ktm	-	-	-	-
	1	36	16,67	83,33	0	0
MT2,4-D 10	3	29	34,48	48,28	17,24	0
	5	Ktm	-	-	-	-
	7	13	23,08	46,15	23,08	7,69
	1	15	0	100	0	0
	3	15	46,67	40,00	13,33	0
MT2,4-D 20	5	32	6,25	37,50	34,38	21,88
	7	ktm	-	-	-	-
	1	Ktm	-	-	-	-
	3	18	22,22	77,78	0	0
	5	14	0	50,00	7,14	14,29
MT2,4-D 30	7	16	0	25,00	31,25	43,75
	1	18	0	100	0	0
	3	16	37,50	43,75	18,75	0
	5	26	23,08	42,31	15,38	7,69
	7	30	13,33	23,33	30,00	33,33

Keterangan :MS = Media dasar MS +vitamin Morel dan Weitmore; MT = Media dasar
MT Pik = Pikloram; Perlakuan dingin pada temperatur 10°C

Meskipun tanaman jeruk keprok muda berasal dari tanaman yang sama ternyata, respon antera tanaman muda lebih baik dari tanaman induknya. Menurut Reed (2005), umur dan kondisi fisiologi tanaman donor sangat mempengaruhi hasil dari penelitian androgenesis.



Gambar 1. Perkembangan Mikrospora (A. Tetrad; B. Inti tunggal; C. Inti Ganda) dan kalus yang baru terinduksi pada antera jeruk keprok (D,E, dan F)

Untuk mendorong pertumbuhan dan perkembangan kalus tersebut disub kultur kembali pada media yang sama (media induksi kalus) dengan interval subkultur diperpendek menjadi 2-4 minggu atau ketika kalus memperlihatkan perubahan warna menjadi coklat. Hasil sub kultur berulang yang telah dilakukan (7 kali sub kultur) pada media yang sama dengan media induksi kalus terlihat biakan antera jeruk keprok yang tetap hidup dan membentuk kalus jumlahnya tidak berubah (Tabel 3 dan 4). Hal ini menunjukkan bahwa sub kultur setiap 4 minggu berhasil mempertahankan viabilitas biakan, akan tetapi belum mampu menginduksi pembentukan kalus atau sel-sel baru. Untuk memacu pembelahan sel dan mempertahankan viabilitas biakan pada sub kultur ke 7 ditambahkan casein hidrolisat pada media kultur. Respon biakan terhadap penambahan casein hidrolisat belum terlihat perubahannya sampai saat pelaporan data.

Tabel 3. Respon antera jeruk keprok Garut pada sub kultur berulang (sub kultur 4 dan 7) pada media yang sama dengan induksi kalus

Media (mg/l)	Sub kultur ke - 4 (%)			Sub kultur ke - 7 (%)		
	Kalus	Bengkak	Tetap	Kalus	Bengkak	Tetap
MT+pikloram 20	12/102 (11,76)	50/102 (49,2)	40/102 (39,22)	12/102 (11,76)	50/102 (49,2)	40/102 (39,22)
MT+BA3	1/33 (3,03)	20/33 (60,61)	12/33 (36,36)	1/33 (3,03)	20/33 (60,61)	12/33 (36,36)
MS+2,4-D20	2/45 (4,44)	25/45 (55,56)	18/45 (40,00)	2/45 (4,44)	25/45 (55,56)	18/45 (40,00)
MS+2,4-D30	0	0	11/11 (100)	0	0	11/11 (100)

Tabel 4. Respon biakan antera jeruk keprok Batu 55 pada sub kultur berulang (sub kultur 4 dan 7) pada media yang sama dengan induksi kalus

Media (mg/l)	Sub kultur ke - 4 (%)			Sub kultur ke - 5 (%)		
	Kalus	Bengkak	Tetap	Kalus	Bengkak	Tetap
MT+pikloram 20	3/24 (12,5)	21/24 (87,5)	0	3/24 (12,5)	21/24 (87,5)	0
MT+pikloram 30	0	4/4 (100)	0	0	4/4 (100)	0
MT+BA3	0	13/23 (56,5)	10/23 (43,5)	0	13/23 (56,5)	Mencoklat
MS+2,4-D10	0	3/5 (60,0)	2/5 (40,0)	0	3/5 (60,0)	2/5 (40,0)
MS+2,4-D20	0	17/27 (63,0)	10/27 (37,0)	0	17/27 (63,0)	10/27 (37,0)
MS+2,4-D30	0	4/15 (26,7)	11/15 (73,3)	0	4/15 (26,7)	11/15 (73,3)

Produksi kalus diploid dilakukan dengan mensubkultur kalus dan tunas pada media yang sama. Kalus yang dihasilkan dapat tumbuh dan berkembang menjadi kalus-kalus yang embriogenik. Hal ini ditandai dengan adanya penambahan luas kalus dengan rata-rata 1.25 cm², tipe kalusnya embriogenik berwarna putih dan mempunyai pre-embrio sebanyak 32.50 pre-embrio/kalus (Tabel 5).

Tabel 5. Perbanyak kalus diploid jeruk keprok pada media MW+EM 500 mg/l+BA 3 mg/l, 4 minggu setelah subkultur.

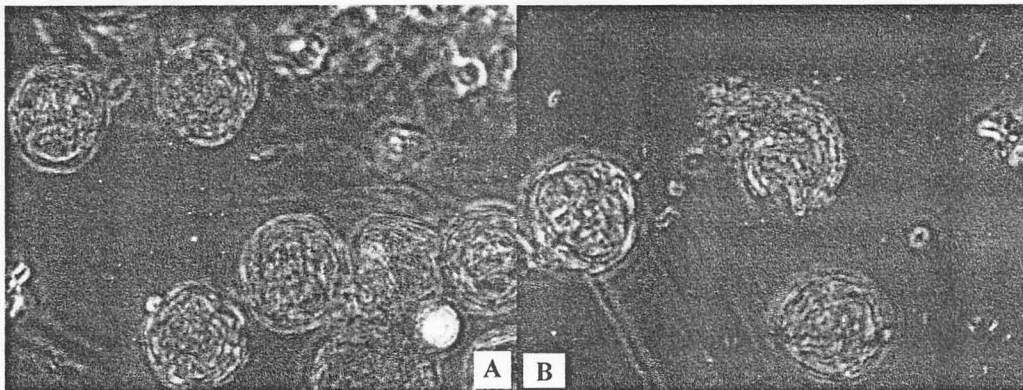
Pertumbuhan kalus	Keterangan
Rata-rata luas kalus	1.25 cm ²
Tipe kalus	Embriogenik berwarna putih
Rata-rata jumlah pre-embrio	32.50 pre-embrio/kalus

Isolasi dan fusi protoplas populasi sel haploid dan diploid jeruk keprok

Isolasi protoplas diploid dilakukan menggunakan kalus jeruk keprok diploid. Protoplas haploid sulit diperoleh dari kalus haploid karena jumlah dan

kualitas kalusnya rendah (warna kalus agak coklat) sehingga tidak cukup baik digunakan sebagai sumber protoplas. Sumber protoplas haploid dicoba dengan menggunakan mikrospora dari anter bunga keprok yang berukuran petal antara 4-6 mm.

Formulasi enzim yang digunakan untuk isolasi protoplas dari kalus diploid dan anter jeruk keprok garut adalah macerozim 1 dan 1,5% yang dikombinasikan dengan selulase 1 %. Penggunaan kombinasi ini belum dapat mengisolasi protoplas dari populasi sel haploid maupun diploid. Protoplas yang utuh setelah diinkubasi (Gambar 2a.) dalam larutan enzim selama 20 jam pecah ketika diendapkan (Gambar 2b)



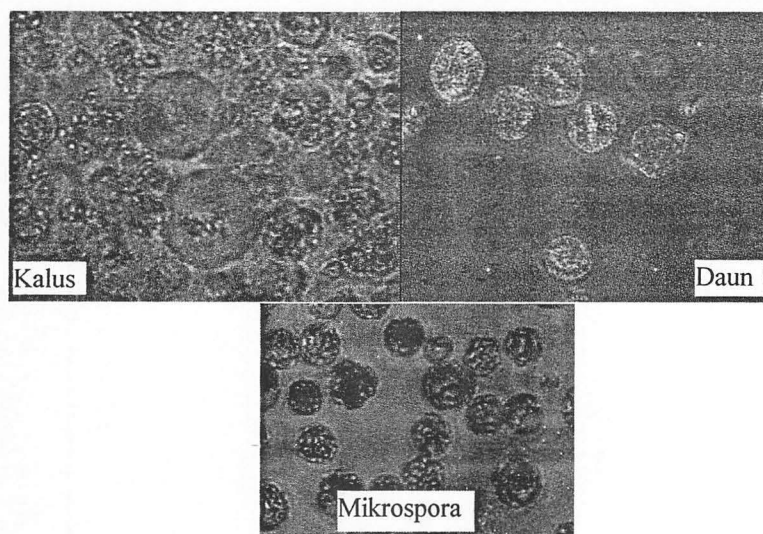
Gambar 2. Protoplas anter pada larutan enzim setelah diinkubasi satu malam (± 16 jam) (A) dan protoplas setelah diendapkan (B).

Isolasi protoplas haploid dan diploid kembali dilakukan setelah mendapatkan kembali kuncup bunga jeruk keprok garut. Formulasi enzim diturunkan menjadi macerozim 0,5% dan selulase 0,5% dengan masa inkubasi enzim 16 jam (*overnight*). Perlakuan yang dicoba adalah perlakuan awal pada kuncup bunga untuk mendapatkan mikrospora, yaitu anter dipotong-potong, anter digerus dan isolasi mikrospora dengan cara pengendapan. Pada kalus diploid tidak dilakukan perlakuan awal tetapi kalus langsung diinkubasi pada formulasi larutan enzim. Dari hasil isolasi protoplas tersebut diperoleh protoplas yang cukup banyak dengan kerapatan 10^5 protoplas/ml (tabel 5).

Tabel 5. Rata-rata jumlah protoplas yang diperoleh dari anter dan kalus diploid jeruk keprok Garut

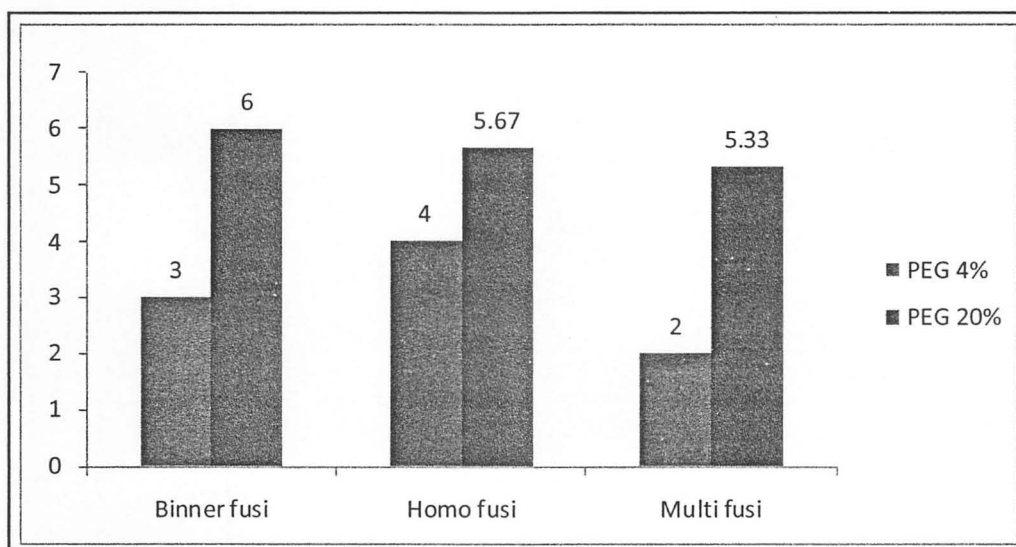
Sumber Protoplas	Rataan Jumlah protoplas	Keterangan
Kalus diploid	$7,6 \times 10^5$	Viabel
Antera dipotong	$1,2 \times 10^5$	Viable
Antera digerus	$1,7 \times 10^5$	Viable
Mikrospora	$1,4 \times 10^5$	Viable
Daun <i>in vitro</i>	$5,2 \times 10^5$	Viable

Rata-rata jumlah protoplas yang diperoleh berkisar pada kerapatan 10^5 protoplas/ml. Rata-rata jumlah protoplas yang paling banyak berasal dari kalus sebagai sumber protoplas ($7,6 \times 10^5$ protoplas/ml) dan diikuti oleh daun *in vitro* sebanyak $5,2 \times 10^5$ protoplas/ml. Rata-rata jumlah protoplas yang dihasilkan dari mikrospora yang berasal dari perlakuan anter (dipotong dan digerus) juga menghasilkan kerapatan 10^5 protoplas/ml. Protoplas paling banyak dari perlakuan anter berasal dari anter yang di gerus ($1,7 \times 10^5$). Perbedaan kenampakan protoplas hasil isolasi tersaji pada Gambar 3. Perbedaan penampakan protoplas yang dihasilkan antara protoplas yang berasal dari kalus berwarna bening, protoplas yang berasal dari mikrospora berwarna kehijauan, dan protoplas yang berasal dari daun berwarna lebih hijau.



Gambar 3. Protoplas hasil isolasi paada formulasi enzim macerozim dan dari kalus, mikrospora, dan daun.

Berdasarkan hasil fusi protoplas yang dilakukan diperoleh bahwa PEG 20% memberikan jumlah fusan yang lebih banyak dibanding dengan PEG 4% baik yang biner fusi, homo fusi, dan multi fusi (Gambar 4). Tipe biner fusi yang dihasilkan dari PEG 20% adalah sebanyak 6 fusan per bidang pandang, homo fusi 5,67 fusan per bidang pandang, dan multi fusi sebanyak 5,33 fusan per bidang pandang. Sedangkan fusan yang berasal dari *induksi* dengan PEG 4% adalah 3 fusan per bidang pandang yang biner fusi, 4 fusan per bidang pandang yang homo fusi, dan 2 fusan per bidang pandang yang multi fusi.



Gambar 4. Jumlah protoplas berfusi (fusan) pada perlakuan induksi fusi dengan PEG 4% dan 20%.

Regenerasi sel hibrid

Protoplas hasil fusi yang telah dicuci dengan media pencuci dikulturkan pada media perlakuan. Media yang digunakan adalah MT dan MW dengan penambahan EM 500 mg/l + 2,4-D 0,1 mg/l + BA 3 mg/l. Dari hasil kultur yang dilakukan diperoleh bahwa semakin lama umur kultur maka semakin banyak jumlah protoplas yang melakukan regenerasi dinding sel sehingga diperoleh sel-sel yang lengkap yang berasal dari protoplas baik pada media MT maupun pada media MW (Tabel 6).

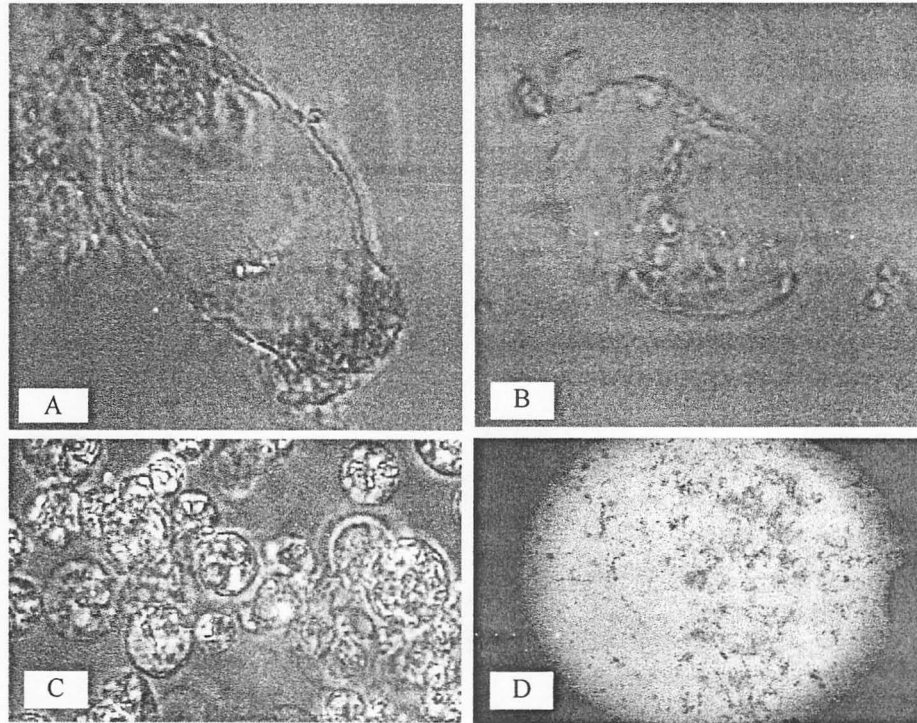
Tabel 6. Regenerasi protoplas hasil fusi (fusan) dengan PEG pada media MT dan MW dengan penambahan EM 500 mg/l + 2,4-D 0,1 mg/l + BA 3 mg/l

Media Kultur	PEG (%)	Respon Protoplas (%)	
		Berdinding	Membelah
		Minggu ke-2	Minggu ke-4
MT+EM 500 mg/l+2.4 D 0.1 mg/l+BA 3 mg/l	4%	0.30 (30%)	0.27 (27%)
	20%	0.30 (30%)	0.30 (30%)
MW+EM 500 mg/l+2.4 D 0.1 mg/l+BA 3 mg/l	4%	0.40 (40%)	0.35 (35%)
	20%	0.18 (18%)	0.07 (7%)

Jumlah dan persentase sel protoplas yang terbentuk pada media MT adalah sebanyak 0.3 protoplas per bidang pandang (30%) baik dari hasil induksi fusi dengan PEG 4% maupun PEG 20%. Sedangkan jumlah dan persentase sel protoplas yang terbentuk pada media MW adalah sebanyak 0.4 protoplas per bidang pandang (40%) dari hasil induksi fusi dengan PEG 4% dan 0.18 protoplas per bidang pandang (18%) dari hasil induksi fusi dengan PEG 20%. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Husni *et al.*, (2009) bahwa jumlah protoplas yang melakukan regenerasi dinding sel yang diinduksi fusi dengan PEG 4% lebih banyak jumlahnya dari pada protoplas yang melakukan regenerasi dari hasil induksi fusi dengan PEG 20%.

Pertumbuhan dan perkembangan protoplas fusan pada media kultur dapat tumbuh dan berkembang melakukan pembelahan sel (mitosis) baik pada media MT maupun pada media MW. Hal ini dapat terlihat dari hasil pengamatan secara mikroskopis terdapat sel-sel baru (sel muda) pada media yang ditandai dengan inti sel yang lebih besar. Sel yang sedang melakukan pembelahan ditandai dengan adanya sel yang memanjang dan mempunyai dua kutub dan selanjutnya terpisah menjadi dua sel. Jumlah protoplas yang melakukan pembelahan pada media MT adalah sebanyak 0,20 regeneran (20%) dari hasil induksi fusi dengan PEG 4% dan 0.30 regeneran (30%) dari hasil induksi fusi dengan PEG 20%. Sedangkan pada media MW adalah 0,35 regeneran (35%) dari hasil induksi fusi dengan PEG 4% dan 0.07 regeneran (7%) dari hasil induksi fusi dengan PEG 20%. Perbedaan protoplas yang sudah melakukan regenerasi dinding sel dan telah melakukan pembelahan sel tersaji pada Gambar 5.

Pengamatan terhadap kondisi dan perkembangan kultur masih dilakukan sampai dihasilkan mikro kalus sehingga masih diperlukan kelanjutan dari penelitian ini.



Gambar 5. Penampakan protoplas yang sudah melakukan pertumbuhan dan perkembangan (A= protoplas yang sudah berding, B= protoplas yang sedang melakukan pembelahan, C= koloni sel, dan D= suspensi sel)

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Eksplan kuncup bunga yang berasal dari tanaman yang lebih muda (8 tahun) lebih baik responnya dibandingkan eksplan yang berasal dari tanaman yang lebih tua (>30 tahun)
2. Pra perlakuan dingin lebih dari 3 hari lebih respon membentuk kalus dari pada praperlakuan kurang dari 3 hari
3. Formulasi enzim terbaik untuk mengisolasi protoplas diploid (kalus dan daun in vitro) dan protoplas haploid (polen) adalah macerozim 0,5% dan selulase 0,5% dengan masa inkubasi enzim 16 jam (*overnight*)

4. Konsentrasi PEG 20% memberikan jumlah fusan yang lebih banyak dibanding dengan PEG 4% baik yang biner fusi, homo fusi, dan multi fusi
5. Regenerasi pembentukan dinding sel fusan, pembelahan sel, dan pembentukan suspensi sel terbaik diperoleh dari formulasi media MW+EM 500 mg/l+2.4 D 0.1 mg/l+BA 3 mg/l

DAFTAR PUSTAKA

- Bachi, O. 1940. Observation Citological Citrus, I. Numero de cromosomas de algunas especies y variedades. *Journal of Agronomi (Piracicaba)* 3: 249-258
- Esen, A and R K Soost. 1972. Tetraploid progenies from 2x x 4x crosses of Citrus and their origin. *Journal of American Society of Horticultural Sciences.* 97:410-414
- Falavigna, A. and G.L. Rotino. 2005. Parthenocarpy, a strategy for fruit development under adverse environmental conditions. Makalah dalam Seminar Peranan Bioteknologi dalam perbaikan tanaman untuk cekaman abiotik. Bogor. 9 h.
- Germana, M A. 2003. Haploids and double haploids in Citrus ssp. Pp. 303-308. *In* M Maluszynski, K J Kasha, B P Forster and I Szarejko (*Eds.*). *DoubleHaploid Production in Crop Plants A manual.* Kluwer Academic Publishers
- Gmitter, F G and X Ling. 1991. Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicines. *J. Amer.Soc. Hort.Sci.* 116: 317-321
- Gmitter, F G Jr., X B Ling and X X Deng. 1990. Induction of triploid citrus plants from endosperm calli *in vitro*. *Theor. Appl. Genet.* 80: 785-790
- Husni, A., I. Mariska dan Hobir. 2004. Fusi Protoplas dan regenerasi protoplas hasil fusi antara *Solanum melongena* dengan *S. torvum*. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 9(1):1-8.
- Hutabarat, B dan A. Setyanto. 2007. Komoditas jeruk Indonesia dipersimpangn jalan pasar domestik dan internasional. Pusat Analisis Social Ekonomi dan Kebijakan Pertanian (PSE-KP), Departemen Pertanian. Makalah dalam Seminar Nasional Jeruk 2007, Yogyakarta, 13-14 juni 2007. 30 h.
- Jaskani, M J. 1998. Interploidal hybridization and regeneration of Kinnow mandarin. Ph.D Thesis. Dept. of Hort., Univ. Agric., Faisalabad, Pakistan.

Koltunow, A M, A Vivian-Smith and S R Sykes. 2007. Molecular and conventional breeding strategies for seedless citrus. ISHS Acta Horticulturae 535: First International Citrus Biotechnology Symposium

Lapin, W.K. 1937. Investigation of polyploidy in citrus work. All-Unian Sci. Res. Inst. Humid Subtrop.I:1-68.

Mooney, P, M Atson and A Harty. 1997. Developing New Seedless Citrus Triploid Cultivars. HortResearch Publication. The Horticulture and Food Institute of New Zealand Ltd.

Usman, M, T Safed, M M Khan dan B Fatima. 2006. Occurrence of Spontaneous Polyploids in Citrus. Hort. Sci. (Prague) 33 (3): 124-129

Zhang, J, M Zhang and X Deng. 2007. Obtaining autotetraploids in vitro at a high frequency in Citrus sinensis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 89(2-3): 211-216