

Studi Pendahuluan : Perkembangan Jaringan Endosperma dan Induksi Pembentukan Kalus dari Endosperma Jeruk Siam (*Citrus nobilis* L)

(Preliminary study: Endosperm development and callus induction and formation from Endosperm of Tangerine (*Citrus nobilis* L.))

M. Kosmiatin¹, A. Husni¹ dan A. Purwito²

¹ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar No 3A, Bogor.

² Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, IPB, Jalan Meranti Raya, Dramaga, Bogor

E-mail: mkosmiatin@yahoo.co.id

Abstrak

Jeruk merupakan salah satu buah yang konsumsi segarnya cukup tinggi. Hingga saat ini, produksi jeruk di Indonesia menurun antara lain disebabkan oleh alih fungsi areal pertanaman jeruk ke komoditas lain yang lebih menguntungkan. Kurangnya minat penanaman jeruk karena kualitas buah jeruk lokal tidak dapat bersaing dengan jeruk impor sehingga harga tidak dapat bersaing. Kriteria jeruk yang berkualitas adalah jeruk dengan rasa manis-segar, warna menarik, mudah dikupas dan tanpa biji. Jeruk Siam Indonesia sebenarnya sudah memiliki rasa dan warna yang baik tetapi hingga saat ini belum ada jeruk Siam tanpa biji. Salah satu pendekatan pembentukan jeruk tanpa biji adalah dengan mengkulturkan endosperma sehingga dapat beregenerasi membentuk tanaman triploid. Tanaman triploid sulit membentuk biji karena ketidakseimbangan perpasangan kromosom saat gametogenesis. Keberhasilan kultur endosperma ditentukan oleh tahapan perkembangan eksplan endosperma yang memiliki kemampuan untuk berproliferasi dan berdiferensiasi, formulasi media dan lingkungan kulturnya. Penelitian pendahuluan ini dilakukan untuk mengetahui tahapan perkembangan endosperma yang berespon baik untuk dikulturkan, formulasi media untuk proliferasi sel-sel endosperma dan lingkungan kultur yang mendukung pertumbuhannya. Penelitian dilakukan dengan mengkulturkan jaringan endosperma yang diisolasi dari berbagai umur buah muda jeruk pada formulasi media induksi kalus jeruk Siam diploid kemudian dioptimasi dengan menambahkan bahan organik dan biotin. Biakan dikulturkan dalam kondisi gelap, kurang terang dan terang. Hasil penelitian menunjukkan bahwa endosperma dari buah yang berumur 12 dan 13 minggu setelah anthesis dapat diisolasi dan diinduksi pembentukan kalusnya. Penambahan ekstrak malt atau biotin lebih baik untuk menginduksi pembentukan kalus. Inkubasi pada kondisi kurang cahaya lebih baik dalam menginduksi pembentukan kalus.

Kata Kunci: *Citrus Nobilis*, Kultur Endosperma, Tahapan Perkembangan Endosperma, Kasein Hidrolisat, Ekstrak Malt

Abstract

Citrus is one of the fruits consumed high. Until recently, the production of citrus in Indonesia decreased among others caused by over function of citrus land to other more profitable commodities. Lack of interest in planting of citrus because the quality of the local citrus fruits can't compete with imported oranges so prices cannot compete. Quality of citrus criteria is orange juice with sweet-fresh, attractive colors, easily peeled and seedless. Indonesian tangerine actually already has a good flavor and color but until now there has been no tangerine seedless. One approach to the formation of citrus seedless is culturing of endosperm cells so it can regenerate triploid plant form. Seed formation of triploid plants is difficult because of the unbalance chromosomes pairing during gametogenesis. The success of endosperm culture is determine of development stages of endosperm as explants that have the ability to conduct proliferate and differentiate, medium formulation and culture environment. Preliminary research was conducted to know the stages of endosperm development that response to endosperm cultured, media formulations for the proliferation of endosperm cells and culture environment to supporting its growth. Research done by cultured endosperm cells was isolated from various age of fruit-tangerine on diploid callus induction medium then optimized by adding organic compound and biotin. Endosperm culture cultured at dark, medium light and light incubation room. The results showed that the

endosperm cells isolated from young fruit, 12 and 13 weeks after anthesis, can be induced the callus formation. The addition of malt extract or biotin is better to induce the callus formation. Incubation conditions better in medium light induces the formation callus.

Keywords: *Citrus Nobilis*, Endosperm Culture, Stage of Endosperm Development, Kaseinl Hidrolisat, Malt Extract

Pendahuluan

Jeruk merupakan salah satu komoditas hortikultura nasional yang penting, tetapi hingga saat ini produksi dan daya saingnya terhadap buah jeruk impor masih rendah. Produksi jeruk nasional dibatasi oleh lahan pertanaman yang bersaing dengan komoditas lain yang lebih menguntungkan. Salah satu kendala yang menurunkan daya saing jeruk Siam adalah jumlah biji yang cukup tinggi, sekitar 15 biji/buah, sementara jumlah biji merupakan salah satu kriteria kualitas buah jeruk yang penting dan berdaya saing tinggi (Karp, 2007). Sampai saat ini belum ada jeruk Siam lokal Indonesia yang direkomendasikan buahnya tidak berbiji. Perakitan buah jeruk tanpa biji dapat dilakukan dengan teknik *in vitro* melalui beberapa pendekatan diantaranya dengan merakit tanaman jeruk yang memiliki tingkat ploidi triploid.

Tanaman triploid sangat berharga karena memberikan nilai tambah ekonomi dalam memperbaiki mutu dan kualitas buah karena buahnya tidak berbiji, lebih besar, dan lebih produktif. Selain keunggulan tersebut, tanaman triploid juga mempunyai kemampuan pertumbuhan yang lebih cepat dan bunganya lebih besar (Gupta, 1982) dan lebih cepat panen serta biomasnya lebih besar (Thomas dan Chaturvedi, 2008).

Fenomena perubahan tingkat poliploidi ini sangat jarang ditemukan pada tanaman jeruk. Ploidi jeruk pada umumnya adalah diploid dengan jumlah kromosom 18 (Lapin, 1937). *Tahiti Lime* yang merupakan jenis jeruk komersial tanpa biji yang mempunyai ploidi triploid alami (Bachi, 1940).

Tanaman triploid dapat dirakit dengan berbagai cara pendekatan baik secara konvensional maupun non konvensional. Penggunaan endosperma dalam kultur *in vitro* akan menghasilkan tanaman triploid. Jaringan endosperma berkembang setelah fertilisasi ganda terjadi dan jaringan ini merupakan hasil fusi antara 2 inti polar dan satu inti *generatif* sperma sehingga sel yang berkembang merupakan sel yang triploid (Berger, 2003). Jaringan ini dapat dikulturkan pada saat sel-selnya sudah berkembang dengan dinding sel yang tumbuh sempurna. Menurut Hoshino *et al.*, (2011), tanaman triploid yang dihasilkan dari kultur endosperm lebih unggul dari pada tanaman triploid dari hasil persilangan.

Keberhasilan kultur endosperma ditentukan oleh berbagai faktor, diantaranya adalah tahapan endosperma, formulasi media dan kondisi pengkulturan. Endosperma muda mempunyai fase sel-sel yang baru dan pada umumnya mempunyai respon yang lebih baik apabila dikulturkan (Tao *et al.*, 2009) seperti pada tanaman jeruk besar dan apel (Wang dan Chang, 1978), *Citrus grandis* cv White Siamese (Gmitter *et al.*, 1990), cv Tosa-Buntan (Yang *et al.*, 2000), *Citrus sinensis* cv Hongjiang (Chen *et al.*, 1990), dan cv Ridge Pineapple (Gmitter *et al.*, 1990).

Penelitian bertujuan untuk mengetahui tahapan perkembangan endosperma yang respon untuk kultur *in vitro* dan mengetahui formulasi media untuk menginduksi pembentukan kalus dari endosperma.

Metodologi

Penelitian dilakukan di laboratorium kultur *in vitro* Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor. Bahan tanaman yang digunakan adalah tanaman jeruk Siam yang berumur 5 tahun setelah disambung dari mata tunas sebagai sumber jaringan endosperma. Penelitian dilakukan dalam dua kegiatan berurutan yaitu studi tahapan perkembangan endosperma jeruk Siam dan induksi pembentukan kalus dari jaringan endosperma.

Studi tahapan perkembangan endosperma jeruk Siam

Bahan tanaman yang digunakan adalah buah muda yang berumur 8, 9, 10, 11, 12, 13, dan 14 minggu setelah anthesis. Buah diukur diameternya sebelum disterilisasi. Sterilisasi buah dilakukan dengan merendam buah dalam alkohol 96% kemudian dilalukan pada lampu bunsen. Biji diisolasi kemudian dipotong secara transversal untuk mengamati perkembangan embrio dan endosperma. Pengamatan dilakukan dengan bantuan mikroskop binokuler pada perbesaran 40 kali. Pengamatan dilakukan pada visual ukuran biji, visual endosperma dan embrio.

Induksi pembentukan kalus dari jaringan endosperma

Tahapan perkembangan endosperma

Bahan tanaman yang dikulturkan adalah jaringan endosperma dari berbagai umur buah jeruk, 10, 11,12, 13, 14 minggu setelah anthesis. Sterilisasi buah dilakukan dengan merendam buah dalam alkohol 96% kemudian dilalukan pada lampu bunsen.

Isolasi endosperma dilakukan dalam laminar *air flow cabinet* dengan bantuan mikroskop binokuler dengan perbesaran 40x. Endosperma diisolasi dari biji yang dikeluarkan dari buah yang sudah disterilkan. Endosperma dikulturkan pada formulasi media induksi pembentukan kalus embriogenik jeruk Siam diploid (Husni, 2010). Biakan kemudian diinkubasi di ruang kultur tanpa cahaya.

Lingkungan Kultur

Bahan tanaman yang digunakan adalah jaringan endosperma yang diisolasi dari buah berumur 13 minggu setelah anthesis. Jaringan endosperma dikulturkan pada media induksi pembentukan kalus embriogenik jeruk Siam diploid (Husni, 2010). Biakan dikulturkan pada lingkungan gelap (tanpa cahaya) dan cahaya rendah (±600 lux) selama 16 jam. Temperatur ruang kultur dijaga pada suhu 22-25 °C.

Optimasi media induksi pembentukan kalus dari jaringan endosperma

Optimasi induksi pembentukan kalus dilakukan pada media Husni *et al.* (2010) dengan penambahan biotin 0.7 mg/l; ekstrak malt 500 mg/l; kaseinl hidrolisat 250 mg/l; ekstrak malt +biotin; kaseinl hidrolisat + biotin. Bahan tanaman yang digunakan adalah

jaringan endosperma yang diisolasi dari buah muda berumur 13 minggu setelah anthesis. Biakan diinkubasi di ruang kultur dengan cahaya rendah (± 600 lux) selama 16 jam dan suhu ruang kultur dijaga pada suhu 22-25 °C.

Pengamatan pada induksi kalus dari jaringan endosperma dilakukan setiap minggu. Pengamatan dilakukan terhadap persentase pembentukan kalus dan embriosomatik langsung.

Hasil dan Pembahasan

Studi tahapan perkembangan endosperma jeruk Siam

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa buah yang berumur 8 dan 9 minggu setelah anthesis dengan mikroskop binokuler pembesaran 40x belum dapat mengamati embrio dan jaringan endosperma (Tabel 1). Endosperma masih berupa cairan yang diduga merupakan sel induk endosperma dengan multi inti bebas yang belum mengalami selulerisasi. Pada tahapan ini baik embrio zigotik maupun nuselar belum teramati.

Tabel 1. Tahapan perkembangan endosperma pada buah 8-14 minggu setelah anthesis.

Umur Buah (MSA)	Ukuran yang teramati			
	Buah (cm)	Biji (cm)	Embrio (μm)	Endosperma (volume)
8	1,3	0,2	-	-
9	1,7	0,3	-	-
10	2,0	0,4	< 100	+
11	2,1	0,55	100-150	++
12	2,4	0,6	100-200	++
13	3,0	0,7	>200*	+
14	3,5	0,9	>500**	Tidak ada

Keterangan : MSA , minggu setelah anthesis

* Embrio nuselar 1-2 buah/biji

- Endosperma inti bebas (cair)

** Embrio nuselar >2 buah/biji

+ Endosperma kental

Embrio dan endosperma mulai teramati pada minggu ke sepuluh setelah anthesis. Embrio zigotik tumbuh di bagian mikrofil kantung embrio (biji) dengan ukuran kurang dari 100 (μm) dan endosperma mulai terlihat mengental membentuk jaringan seperti *jelly*, meskipun masih banyak bagian yang cair.

Jaringan endosperma yang mengental bertambah hingga umur 12 minggu setelah anthesis. Volume endosperma mulai berkurang pada minggu ke 13 seiring dengan tumbuhnya embrio nuselar pada dinding mikrofil kantung embrio. Pada minggu ke 14 jaringan endosperma tidak terlihat lagi, pada beberapa biji terlihat jaringan tipis transparan (tembus pandang) yang merupakan sisa dari jaringan endosperma. Pada tahapan ini embrio zigotik sudah mencapai masak morfologis (bentuk torpedo) dan embrio nuselar sudah bertambah banyak (lebih dari 3) dengan berbagai tahapan perkembangan embrio.

Induksi pembentukan kalus dari jaringan endosperma

Tahapan perkembangan endosperma

Berdasarkan pengamatan pada buah, jaringan endosperma mulai teramati pada buah yang berumur 10 - 14 minggu setelah anthesis. Jaringan endosperma tersebut diisolasi

kemudian dikulturkan pada media induksi pembentukan kalus jeruk Siam diploid (Husni *et al.*, 2010). Setelah 6 minggu dikulturkan, terlihat bahwa hanya endosperma yang berasal dari buah 12 dan 13 minggu setelah anthesis yang dapat diinduksi pembentukan kalusnya dengan persentase yang tidak terlalu tinggi hanya 7,14 dan 3,10% (Tabel 2). Gmitter *et al.*, (1990) melaporkan bahwa kalus terinduksi dari endosperma jeruk manis (*C. sinensis*), grape fruit (*C. paradisiaca*) dan Pommelo (*C. grandis*, sekarang *C. maxima*) dari endosperma 12-14 minggu setelah anthesis. Persentase yang rendah pada penelitian ini mungkin disebabkan formulasi media dan lingkungan kultur belum mampu menginduksi pembentukan kalus secara maksimal. Hal ini menunjukkan bahwa walaupun komposisi media untuk induksi pembentukan kalus dengan eksplan embrio zigotik dan nuselar (dengan tingkatan ploidi diploid) cukup baik, ternyata tidak cukup baik untuk menginduksi pembentukan kalus dari jaringan endosperma (triploid).

Tabel 2. Respon jaringan endosperma pada berbagai tahapan perkembangan pada media induksi kalus, 6 minggu setelah dikulturkan pada media induksi kalus (Husni *et al.*, 2010)

Umur endosperma (Minggu Setelah Anthesis)	Respon biakan (%)	
	Kalus	Embriosomatik langsung
10	0	0
11	0	0
12	7,14	0
13	3,10	0
14	0	0

Lingkungan Kultur

Lingkungan kultur terutama cahaya sangat mempengaruhi respon dari eksplan. Beberapa eksplan memerlukan kondisi cahaya terang (\pm 1000 lux) selama 16 jam, atau cukup dengan cahaya rendah atau bahkan kondisi gelap untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangannya. Induksi pembentukan kalus sering tidak memerlukan cahaya seperti pada tanaman *Allium chinense* (Yan *et al.*, 2009). Pada beberapa tanaman, cahaya diperlukan untuk menginduksi eksplan dalam pembentukan kalusnya seperti pada jeruk Siam dengan eksplan embrio nuselar dan embrio zigotik (Husni *et al.*, 2010), tanaman obat *Cardiospermum halicacabum* (Thomas dan Mseena, 2006), *Curcuma soloensis* (Zhang *et al.*, 2011).

Jaringan endosperma diisolasi dari buah yang berumur 13 minggu setelah anthesis. Enam minggu setelah inkubasi terlihat bahwa induksi kalus dari jaringan endosperma lebih respon pada kondisi cahaya rendah, sekitar 600 lux selama 16 jam (Tabel 3). Pada kultur endosperma ini juga terbentuk embriosomatik langsung meskipun persentasenya juga rendah. Pada induksi kalus jeruk Siam dengan menggunakan eksplan embrio zigotik dan nuselar (diploid) lebih baik dilakukan pada kondisi terang (Husni *et al.*, 2010). Hal yang berbeda pada eksplan jaringan endosperma (triploid) jeruk Siam Medan dimana kondisi kultur dengan cahaya 100 lux, induksi pembentukan kalusnya kurang dari 10% (Tabel 2). Pada kondisi gelap, induksi kalus dari jaringan endosperma juga tidak berhasil dengan baik.

Hasil yang lebih baik diperoleh dari eksplan yang dikulturkan pada kondisi cahaya rendah, sekitar 600 lux, meskipun masih kurang dari 50%.

Tabel 3. Persentase pembentukan kalus dan embrio somatik langsung pada inkubasi kultur gelap dan cahaya rendah, 6 minggu setelah dikulturkan pada media induksi kalus (Husni *et al.*, 2010).

Lingkungan inkubasi	Respon biakan (%)	
	Kalus	Embriosomatik langsung
Gelap	2,38	4,76
Cahaya rendah	23,81	7,14

Optimasi media induksi pembentukan kalus dari jaringan endosperma

Menurut Yan *et al.* (2009), untuk keberhasilan induksi kalus pada tanaman *A. sinensis* selain ditentukan oleh eksplan yang tepat juga sangat ditentukan oleh formulasi media yang tepat. Pada jeruk, umumnya induksi kalus dilakukan dengan menambahkan BA pada media induksi kalusnya (Gmitter *et al.*, 1990; Carimi *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 2009). Induksi kalus dari embrio nuselar dan zigotik jeruk Siam berhasil dilakukan dengan baik pada media MS modifikasi dengan penambahan BA 3 mg/l (Husni *et al.*, 2010), tetapi untuk eksplan endosperma hasil belum begitu baik sehingga diupayakan dengan penambahan bahan organik untuk mengoptimalkan pembentukan kalus dari eksplan endosperma.

Optimalisasi pembentukan embrio dicoba dengan menambahkan bahan organik (kasein hidrolisat dan ekstrak malt) kedalam media dan memperkaya vitamin dengan menambahkan biotin kedalam media induksi. Hal ini juga dilakukan Gmitter *et al.* (1990) dan Yang *et al.* (2000) yang lebih memperkaya medium induksi kalus untuk endosperma dibanding medium untuk jaringan diploidnya. Pada kultur endosperma jeruk Siam, enam minggu setelah kultur terlihat bahwa induksi pembentuk kalus terbaik diperoleh dari media dengan penambahan biotin atau ekstrak malt (Tabel 4). Sementara penambahan kasein hidrolisat tidak dapat meningkatkan persentase pembentukan kalus dari jaringan endosperma jeruk meskipun bahan ini banyak digunakan untuk kultur endosperma tanaman dikotil (Hoscino *et al.*, 2011). Kombinasi bahan organik dengan vitamin juga tidak meningkatkan pembentukan kalus dari jaringan endosperma, berbeda dengan tanaman jambu biji (Rai *et al.*, 2008) penambahan bahan organik yang dikombinasikan dengan vitamin dapat meningkatkan induksi kalus embriogenik. Induksi kalus dari eksplan jeruk Siam medan lebih efektif pada media dengan penambahan ekstrak malt karena bahan ini merupakan bahan organik yang lebih murah dari pada biotin.

Tabel 4. Respon jaringan endosperma pada berbagai formulasi media untuk induksi pembentukan kalus, pada media induksi kalus (Husni *et al.*, 2010).

Media induksi (Minggu Setelah Anthesis)	Respon biakan (%)	
	Kalus	Embriosomatik langsung
Biotin	53.13	0
Ekstrak malt	53.13	0
Kasein hidrolisat	36.47	20,83
Ekstrak malt +Biotin	40.64	0
Kaseinl hidrolisat+ Biotin	48.98	0

Kesimpulan

Dari rangkaian penelitian pendahuluan ini dapat disimpulkan bahwa :

- Jaringan endosperma jeruk dapat diisolasi dari buah muda 10-14 minggu setelah anthesis
- Jaringan endosperma yang respon untuk diinduksi pembentukan kalusnya adalah endosperma yang diisolasi dari buah 12-13 minggu setelah anthesis
- Inkubasi pada lingkungan cahaya rendah (\pm 600 lux) lebih baik dibandingkan pada kondisi gelap
- Penambahan ekstrak malt atau biotin baik untuk menginduksi pembentukan kalus, tetapi secara ekonomis penambahan ekstrak malt lebih menguntungkan.

- Ucapan Terima Kasih

- Penelitian ini didanai oleh program Hibah Pasca Sarjana atas nama Dr. Agus Purwito (FAPERTA, IPB) Tahun Anggaran 2011 dan Balitjestro yang sudah menyediakan bahan tanaman jeruk Siam Medan.

- Daftar Pustaka

- Bachi, O. 1943. Cytological observations in citrus, III Megasporogenesis, fertilization and polyembryony. Bot. Gaz. 105: 221-225
- Carimi, F, F De Pasquale, F G Crescimanno. 1995. Somatic embryogenesis in Citrus from styles culture . Plant Science 105: 81-86
- Chen, Z G, S Q Lin and Q L Lin. 1988. The development of plantlets from the endosperm of loquat. Pp 363-364. In Genetic Manipulation in Crops. Proc. Int. Symp. Genetic Manipulation in Crops, Beijing.
- Hoshino,T, Y Miyashita, And TD Thomas. 2011. *In vitro* culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding. Scientia Horticulture. 130 (1):1-8
- Husni A, Purwito A, Mariska I, Sudarsono. 2010. Regenerasi tanaman jeruk Siam melalui embryogenesis somatic. *J Agrobiogen* 6(2): 79-83
- Lapin, W.K. 1937. Investigation of polyploidy in citrus work. All-Unian Sci. Res. Inst. Humid Subtrop.I:1-68
- Gmitter, F G Jr., X B Ling, and X X Deng. 1990. Induction of triploid Citrus plants from endosperm calli *in vitro*. Theor. Appl. Gen. 80: 785-790
- Khan, E U, X Z Fu, J Wang, Q J Fan, X S Huang, G N Zhang, J Shi, J H Liu. 2009. Regeneration and characterization of plants derived from leaf in vitro culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars. Sci Hort. 120: 70-76
- Karp, D. 2007. Mandarins growing nears Bakersfield, Calif. Marisorpa, Calif
- Thomas, T D, and R Chaturverdi. 2008. Endosperm cultura: A novel method for triploid plant. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 93 (1):1-14
- Tao, R, K Ozawa, M Tamura and A Sugiura. 2009. Dodecaploid plant regeneration from endosperm cultura of Persimmon (*Diospyros kaki* L.).
- Wang D, and C J Chang. 1978. Triploid citrus plantlet from endosperm culture. Scie Sinica. 21: 822-827

- Yang, X, A Kitajima and K Hasegawa. 2000. Callus induction and embryoid regeneration from the endosperm culture of "Tossa-Buntan" pummel (*Citrus grandis* [L.]). *Environment Control Biol.* 38 (4): 241-246
- Yan, MM, C Xu, C-H Kim, Y-C Um, A Bah, D-P Guo. 2009. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). *Sci Hortic.* 123:124-128
- Zhang, S, N Liu, A Sheng, G Ma, G Wu. 2011. Direct and callus-mediated regeneration of *Curcuma soloensis* Valetton (Zingiberaceae) and ex vitro performance of regenerated plants. *Sci Hortic.* 130: 899-

Diskusi

1. Nama Penanya :
 Pertanyaan/saran/komentar :
 Jawab :