

PENGARUH OSMOLIT TERHADAP MATURASI EMBRIO SOMATIK JERUK (*Citrus reticulata* Blanco.)

Nurul Hidayah, Wahyu Widoretno dan Retno Mastuti

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang
Email; nurulcintabunda@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh osmolit (PEG dan agar) terhadap maturasi embrio somatik (ES) jeruk keprok batu 55. Embrio somatik diinduksi dari jaringan nuselus buah muda jeruk keprok batu 55 pada media MT padat yang ditambah ekstrak malt 500 mg/L, gula 50 g/L dan BAP 3 mg/L. Embrio somatik fase globular hasil induksi diperbanyak pada media MT tanpa ekstrak malt dan zat pengatur tumbuh. Maturasi ES fase globular diinduksi pada media MS yang mengandung agar (10, 12.5, 15, 17.5, dan 20 g/L) atau PEG (0, 2.5, 5, 7.5, dan 10%). Setelah delapan minggu dihitung persentase setiap fase perkembangan ES. Hasil penelitian menunjukkan eksplan nuselus dapat berkembang menjadi ES fase globular, hati, torpedo dan kotiledon. Penambahan PEG dan peningkatan konsentrasi agar menurunkan persentase ES fase globular.

Kata kunci: agar, embrio somatik, osmolit, zat pengatur tumbuh

ABSTRACT

This research was conducted to evaluate the effect of osmolit (PEG and agar) on maturation of citrus somatic embryos (SE). Somatic embryos induction was carried out by culturing nucellus explants of young citrus fruit on MT medium, added with 500 mg/L extract malt, 50 g/L sugar and 3 mg/L BAP. Globular SE's were multiplied by subculturing them on MT media without plant growth regulators. Maturation of SE was done by culturing globular SEs on MS media containing (10, 12.5, 15, 17.5 and 20 g/L) agar or (2.5, 5, 7.5 and 10 %) PEG. After eight weeks, the percentage of each stage of SE development. The results showed that the nucellus explants of jeruk keprok batu 55 could developed into stages of SE include globular, heart, torpedo and cotyledon. The addition of PEG in the medium and the increased concentration of agar decreased globular stage SE.

Key Words: agar, somatic embryo, osmolite, temperature, plant growth regulator

PENDAHULUAN

Kendala utama yang membatasi produksi jeruk keprok lokal adalah sedikitnya ketersediaan bibit bermutu dan bebas penyakit. Pengembangan bibit unggul dan bermutu penting dalam upaya pengembangan tanaman jeruk keprok lokal yang memiliki beberapa varietas salah satunya adalah jeruk keprok batu 55. Jeruk keprok batu 55 banyak diminati oleh masyarakat, karena memiliki keunggulan yaitu daging buahnya berasa manis agak masam dan bertekstur lembut (Mukhtar *et al*, 2005), biji sedikit, banyak mengandung air dan aromanya segar (Agrimas Kapitalindo, 2007).

Upaya yang telah dilakukan untuk meningkatkan produksi jeruk keprok batu 55 adalah peningkatan budidaya jeruk, perluasan area tanam, penyediaan bibit dalam jumlah

banyak dan bebas penyakit serta meningkatkan produktivitas buah jeruk (Hardiyanto dan Suprianto, 2010). Teknik kultur jaringan *in vitro* dapat dilakukan untuk memperoleh bibit dalam jumlah banyak dan mempermudah regenerasi tanaman jeruk keprok batu 55. Keberhasilan untuk mendapatkan bibit tanaman secara massal, tingkat keseragaman tinggi dan bersifat klonal atau sama dengan induknya dapat dilakukan melalui embriogenesis somatik *in vitro* (Lengkong, 2009). Embriogenesis somatik merupakan proses perkembangan sel somatik membentuk tanaman baru melalui tahap perkembangan embrio tanpa melalui fusi gamet (Lengkong, 2009).

Menurut Ricci *et al*. (2002) perbanyakan tanaman jeruk dapat dilakukan melalui

embriogenesis somatik *in vitro* dengan menggunakan eksplan nuselus yang diinduksi pada media MT (Murashige dan Tucker, 1969) ditambah ekstrak *malt* pada medium kultur. Maturasi embrio somatik (ES) merupakan salah satu tahapan yang penting dalam regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik. Selama tahap maturasi, embrio somatik mengalami perubahan morfologi dan biokimia. Maturasi yang tidak lengkap dari embrio somatik merupakan faktor yang menentukan rendahnya tingkat konversi embrio menjadi tanaman (Hussein *et al*, 2006). Hambatan dalam menginduksi maturasi merupakan salah satu penghambat utama dalam keberhasilan embriogenesis somatik, bukan hanya pada tanaman kedelai tetapi juga tanaman lain (Korbes dan Droste, 2005). Dengan demikian, penelitian ini dilakukan untuk meningkatkan maturasi ES jeruk menggunakan beberapa konsentrasi osmolit agar dan PEG.

Perkembangan ES dipengaruhi oleh ketersediaan air pada medium. Potensial air yang rendah pada medium dapat meningkatkan maturasi ES (Ali *et al*, 2010). Salah satu senyawa osmolit yang berpengaruh terhadap rendahnya potensial air adalah *polyethylene glycol* (PEG) dan *gelling agent* seperti agar atau gelrite. Agar pada konsentrasi tinggi dapat mengurangi ketersediaan air, sehingga dapat menurunkan potensial air di dalam media (Steuter, 1981). Peningkatan konsentrasi agar sebesar 10 g/L mampu meningkatkan jumlah maturasi ES *Persea americana* dibanding dengan 7,5 g/L agar (Martin *et al*, 2011). Penambahan PEG pada media kultur telah terbukti mampu meningkatkan persentase ES *Citrus macroptera* dibanding pada media tanpa penambahan PEG (Miah *et al*, 2002).

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh osmolit (agar dan PEG) terhadap maturasi ES jeruk keprok Batu 55.

BAHAN DAN METODE

Bahan Uji. Sumber eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah muda jeruk keprok batu 55 (80-90 minggu setelah anthesis) yang berasal dari Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro), Malang.

Induksi dan Multiplikasi ES. Induksi ES dengan eksplan nuselus yang diisolasi dari

buah jeruk muda dilakukan pada media MT, ditambah ekstrak malt 500 mg/L, gula 50 g/L dan BAP 3 mg/L selama satu bulan. Setiap botol berisi empat eksplan nuselus. Selanjutnya ES fase globular yang dihasilkan disubkultur pada media multiplikasi yakni media MT tanpa penambahan ZPT selama empat minggu untuk perbanyakkan ES fase globular yang akan digunakan pada tahap selanjutnya.

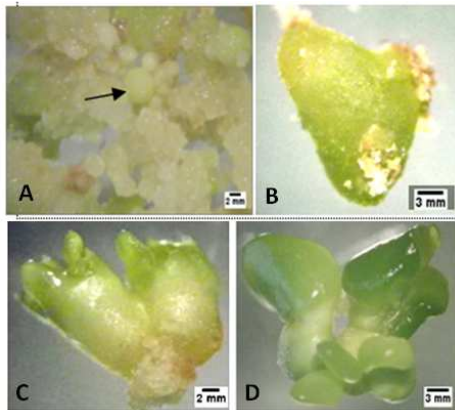
Maturasi ES. Maturasi ES fase globular hasil multiplikasi diinduksi pada media MS yang ditambah dengan agar (10, 12.5, 15, 17.5, dan 20 g/L) atau PEG (0, 2.5, 5, 7.5, dan 10 %). Kultur diinkubasi dibawah sinar lampu TL dengan intensitas cahaya 35,39 watt/m² pada suhu 25 ± 1 °C. Setelah delapan minggu kultur, diamati persentase masing-masing fase perkembangan ES (embrio globular, hati, torpedo dan kotiledon) dan persentase ES matur.

Analisis Data. Data kuantitatif yang diperoleh diolah dan diuji menggunakan uji *Analysis of variance* (ANOVA) menggunakan program statistik *SPSS Release For Windows 15*. Apabila hasil uji ANOVA berbeda signifikan dilanjutkan dengan uji BNJ pada tingkat kepercayaan 95 % untuk mengetahui perlakuan yang memberikan pengaruh signifikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

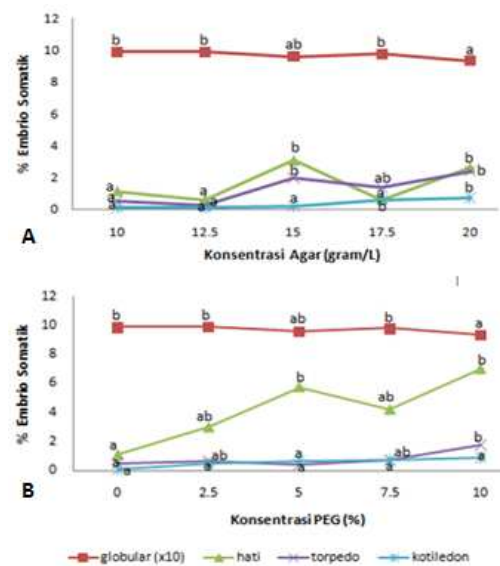
Pengaruh Agar dan PEG pada Maturasi ES. Setelah delapan minggu kultur eksplan nuselus menghasilkan empat fase perkembangan ES yang meliputi fase globular, hati, torpedo dan kotiledon. Embrio somatik jeruk fase globular berbentuk bulat, bertekstur lebih lunak dan berwarna putih (Gambar 1A). Embrio somatik fase hati berbentuk menyerupai hati, berwarna hijau kekuningan dan sedikit keras (Gambar 1B). Embrio somatik fase torpedo berbentuk tabung (Gambar 1C). Fase akhir perkembangan ES adalah fase kotiledon yang berukuran paling besar diantara ketiga fase perkembangan embrio somatik, memiliki dua kotiledon, berwarna hijau dan bertekstur lebih keras (Gambar 1D). Media maturasi dengan penambahan PEG dan peningkatan konsentrasi agar mampu menunjang perkembangan eksplan nuselus jeruk keprok batu 55 menjadi ES dari fase globular hingga menjadi kotiledon. Hasil penelitian ini sesuai dengan

hasil penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa konsentrasi agar dan PEG yang semakin meningkat dapat menurunkan ketersediaan air pada media dan menghambat perbanyakan ES namun memicu perubahan dalam perkembangan ES, yakni dari ES fase globular kemudian berkembang menjadi kotiledon (Ravindra *et al*, 2004).



Gambar 1. Fase perkembangan ES jeruk kepek batu 55 setelah dikultur selama 8 minggu pada media maturasi ES. (A) globular, (B) hati, (C) torpedo, (D) kotiledon.

Pada medium dengan penambahan agar 20 g/L persentase ES fase globular menurun signifikan menjadi 93 ± 0.1 % (Gambar 2A). Persentase ES fase hati dan torpedo menunjukkan respon dengan pola yang sama terhadap perlakuan konsentrasi agar, yaitu tidak berbeda signifikan pada konsentrasi 10 dan 12.5 g/L kemudian meningkat pada 15 g/L, menurun pada 17.5 g/L dan kembali meningkat pada 20 g/L. Sedangkan persentase ES fase kotiledon meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi agar yaitu dari 0.1 ± 0.02 % pada kontrol (10 g/L) menjadi 0.7 ± 0.11 pada penambahan agar 20 g/L (Gambar 2A). Agen pematidat seperti agar yang ditambahkan pada media mampu meningkatkan perkembangan ES. Agar dengan konsentrasi tinggi menyebabkan akumulasi cadangan protein dan pati yang mendukung perkembangan ES (Ibrahim *et al*, 2004; Ramarosandratana *et al*, 2001; Tewary *et al*, 2000).



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi osmolit terhadap persentase ES jeruk kepek batu 55. (A) Agar ; (B) PEG

Pada medium dengan penambahan PEG 10 % ES fase globular turun signifikan menjadi 90 ± 2.4 % (Gambar 2B). Persentase ES fase hati meningkat signifikan sampai penambahan PEG 5 %, menurun pada 7.5 % dan kembali meningkat pada 10 % PEG. Persentase ES fase torpedo semakin meningkat dari 0.5 ± 0.4 % pada kontrol (tanpa PEG) menjadi 1.8 ± 0.7 % pada penambahan PEG 10 %, sedangkan persentase fase kotiledon pada medium kontrol maupun dengan penambahan PEG 2.5 – 10 % tidak berbeda nyata (Gambar 2B). Hasil penelitian ini mendukung apa yang telah dilaporkan sebelumnya yang melaporkan bahwa PEG merupakan polimer etilen oksida yang mengontrol air. Atom oksigen pada monomer tersebut dapat mengikat molekul air melalui ikatan hidrogen sehingga terjadi penurunan potensial air pada media (Steuter, 1981). Selain itu, penurunan potensial air pada media dapat mempengaruhi kandungan poliamin endogen (Stasolla *et al*, 2003) dan meningkatkan sintesis enzim protease (Gardner, 1991). Poliamin berperan dalam percepatan perkecambahan ES pada proses embriogenesis somatik pada tanaman *Picea glauca* (Stasolla *et al*, 2003). Sementara itu enzim protease yang semakin aktif menyebabkan akumulasi prolin semakin tinggi sehingga menstimulasi sintesis asam absisat (ABA) yang dapat mempercepat maturasi ES (Gardner, 1991).

KESIMPULAN

Penambahan PEG dan peningkatan konsentrasi agar pada media maturasi menurunkan persentase ES jeruk keprok batu 55 fase globular.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh hibah Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T) 2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrimas Kapitalindo. 2007. Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis: Jeruk, diunduh 10 Agustus 2011, <<http://www.agrimaskapitalindo.com>>.
- Ali, S.B.G.M., Kouros V., Hassan B. S., Siamak K. and Charles L. 2010. 'Enhancement Of Maturation and Germination Of Somatic Embryos in Persian walnut (*Juglans regia* l.) Using Osmolites, Hormones and Cold Treatments', *African Journal of Food Science.*, vol. 4, no.12, pp. 735 –743.
- Gardner, F.P., Pearce R.B. and Mitchell R. L. 1991. Fisiologi Tanaman Budidaya. Terjemahan: Herawati Susilo. UI Press. Jakarta.
- Hardiyanto. and Suprianto A. 2010. Jeruk Keprok Variety Batu 55. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropik. Malang.
- Hussein, S., Ibrahim R. and Kiong A. 2006. Somatic Embryogenesis: An Alternative Method for In Vitro Micropropagation. *Iranian Journal Of Biotechnology*, vol. 4, no. 3
- Ibrahim, M.S.D., Rostiana O. and Khumaida N. 2010. Pengaruh Umur Eksplan terhadap Keberhasilan Pembentukan Kalus Embriogenik pada Kultur Meristem Jahe (*Zingiber officinale* Rosc). *Jurnal Litri*, vol. 16, no. 01, pp. 37-42.
- Korbes, A.P. and Droste A. 2005. Carbon Sources and Polyethylene glycol on Soybean Somatic Embryo Conversion. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, vol. 40, no 3
- Lengkong, E.F. 2009. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik pada Kentang Unggul Lokal Siperjohn Asal Minahasa Selatan. *Formas*, vol. 2, no. 4, pp. 244-249.
- Martin, B.M., Sesmero R., Quesada M.A., Alfaro F.P. and Romero C.S. 2011. Water Relations in Cilture Media Influence Maturation Of Avocado Somatic Embryos. *Journal Of Plant Physiology*, vol. 168, pp. 2028-2034.
- Miah, M.N., Sahina I. and Hadiuzzaman S. 2002. Regeneration of Planlets Through Somatic Embryogenesis from Nucellus Tissue of *Citrus macroptera*, vol. 12, no. 2, pp.167-172.
- Mukhtar, R., Khan M.M., Rafiq R., Shahid A. and Khan F.A. 2005. In Vitro Regeneration and Somatic Embryogenesis in (*Citrus aurantifolia* and *Citrus sinensis*). *International Journal Of Agriculture and Biology*, vol. 7, pp. 3.
- Murashige, T. and Tucker D.P.H. 1969. Growth Factor Requirements Of Citrus Tissue Culture, In: *International Citrus symposium*. Riverside. Proceeding. Riverside: University Of California, pp. 1155-1161.
- Ramarosandratana, A., Harvengt L., Bouvet A., Calvayrac R. and Paques M. 2001. Effects Of Carbohydrate Source, Polyethylene Glycol and Gellan Gum Concentration on Embryonal-Suspensor Mass (Esm) Proliferation and Maturation of Maritime Pine Somatic Embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, vol. 37, pp. 29-34.
- Ravindra B., Choundhury H. and Tandon P. 2004. Initiation, Maintenance and Maturation of Somatic Embryos from Thin Apical Dome Sections in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord) Promoted by Partial Desiccation and Gellan Gum, *Scientia Hortikultura*. vol.102, pp.449-459.
- Ricci, A.P., Filho F.D.A.A.M., Mendes B.M.J. and Piedade S.M.D.S. 2002. Somatic Embryogenesis In *Citrus sinensis*, *C. reticulata* dan *C. nobilis* x *C. deliciosa*, *Scientia Agricola*, vol. 59, no.1, pp. 41-46.
- Stasolla, C., Egertsdotter U., Craig D., Liu W. and Sederoff R.R. 2003. The Effects of Polyethylene Glycol on Gene Expression of Developing White Spruce Somatic Embryos. *Plant Physiology*, vol. 131, pp. 49–60.

- Steuter, A.A. 1981. Water Potential of Aqueous Polyethylene Glycol. *Plant Physiol*, vol. 67, pp. 64-67.
- Tewary, A.S., Raghunath M.K. and Sarkar A. 2000. *In vitro* Response of Promising Mulberry (*Morus* sp.) Genotypes for Tolerance to Salt and Osmotic Stresses, *Plant Growth Regulation*, vol. 30, pp. 17-2.