

# Induction of Somatic Embryogenesis of Pontianak Siamese Orange Cotyledon Cultures on Murashige Skoog Media with the Addition of 2,4-D and Kinetin

Zulfa Zakiah<sup>1\*</sup> & Masnur Turnip<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan Barat, Indonesia;

## Article History

Received : April 25<sup>th</sup>, 2024

Revised : May 01<sup>th</sup>, 2024

Accepted : May 13<sup>th</sup>, 2024

\*Corresponding Author:

**Zulfa Zakiah**, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan Barat, Indonesia

Email:

[zulfa.zakiah@fmipa.untan.ac.id](mailto:zulfa.zakiah@fmipa.untan.ac.id)

**Abstract:** Conventional citrus propagation has weaknesses, one of which is susceptible to CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) and other diseases which are the main cause of the decline in population and production of pontianak siam orange plants in West Kalimantan. One alternative to in vitro propagation of citrus seedlings is the induction of somatic embryogenesis. The purpose of the study was to obtain the best combination of 2,4-D and kinetin concentrations for callus induction and somatic embryo induction from Pontianak siam orange cotyledon explants, observing the developmental phase (stage) of embryos formed. The implementation of the study used a factorial completely randomized design (CRD) consisting of 2 factors. The first factor is the concentration of 2,4-D consisting of 4 concentration levels, namely 0; 0.5; 1; 1.5; 2 mg/L. The second factor is kinetin concentration consisting of 4 concentration levels, namely 0; 0.5; 1; 1.5; 2 mg/L. The observation parameters include the time of callus emergence (hst), the percentage of explants forming callus (%), the texture and color of the callus, observing the stage of the embryo found. The results showed that 72% of treatments were able to induce callus from pontianak siam orange cotyledons with an average callus appearance at 7 hst. The callus formed is compact and crumbly with varied callus colors, namely white, yellowish, greenish and brownish. The best treatment that produces embryogenic callus is the combination of D0.5K0.5; D1K1; D0.5K1.5; D1.5K1.5 and D2K2 with the characteristics of crumbly callus and yellowish and brownish colors. The results of microscopic observations found that the somatic embryo phase formed was the pro-embryo phase.

**Keywords:** Embryogenic callus, *Citrus nobilis* var. *microcarpa*, propagation, somatic embryogenesis.

## Pendahuluan

Jeruk siam pontianak (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*) merupakan salah satu varietas unggul jeruk siam yang dikembangkan di Kalimantan Barat sebagai salah satu sentra produksi jeruk lokal di Indonesia. (Banaty, 2017). Berdasarkan data dari Dinas Pertanian Kalbar, produksi jeruk siam pontianak mengalami penurunan dari tahun 2019 hingga tahun 2020 sebesar 13,38%. Selanjutnya menurut data Badan Pusat Statistik Kabupaten Sambas (2020) produktivitas jeruk siam

pontianak di Kabupaten Sambas, mengalami penurunan sebesar 30% dari tahun 2018 hingga 2020. Menurut Bagaskara *et al.*, (2018) penurunan produksi jeruk siam pontianak terjadi akibat adanya serangan bakteri *Liberobacter asiaticus* penyebab penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) yang menyebabkan gagal panen dan memperpendek masa hidup tanaman jeruk.

Budidaya jeruk siam pontianak di Kalimantan Barat hingga saat ini masih dilakukan secara tradisional seperti cangkok, sambung pucuk, okulasi, dan stek.

Perbanyakan secara tradisional tersebut tidak dapat dilakukan dalam skala besar, dan apabila dilakukan terus menerus akan mengakibatkan penurunan kemampuan yang berakibat pada penurunan produksi dan kualitas (Margareta *et al.*, (2019). Perbanyakan menggunakan teknik *in vitro* merupakan langkah alternatif yang dapat dilakukan. Perbanyakan jeruk secara *in vitro* dapat dilakukan melalui induksi embriogenesis untuk memperoleh bibit secara massal dan mempunyai sifat identik dengan induknya serta tahan terhadap cekaman biotik ataupun abiotik (Devy *et al.*, 2014; Hardiyanto *et al.*, 2021). Embriogenesis somatik merupakan proses regenerasi tanaman yang menghasilkan struktur bipolar dari sel somatik (Mendez-Hernandez *et al.*, (2019). Pembentukan embrio somatik mengikuti pola pertumbuhan dan perkembangan seperti pada embrio zigotik. Tahapan perkembangan embrio diawali dengan pembentukan proembrio, embrio tahap globular, tahap hati, tahap torpedo, tahap kotiledon, pematangan dan perkecambahan (Gray, 2005).

Induksi kalus embriogenik dari eksplan tanaman merupakan tahap awal proses pembentukan embrio somatik secara tak langsung.. Rusdianto dan Indrianto (2012) menyatakan bahwa kalus embriogenik mempunyai ciri kalus bertekstur remah (*friable*), berwarna putih bening atau putih kekuningan. Beberapa faktor penentu terbentuknya kalus embriogenik diantaranya jenis eksplan dan komposisi media. Berbagai eksplan dapat digunakan untuk menginduksi embrio somatik. Hasil penelitian D'Onghia *et al.* (2001) melaporkan bahwa regenerasi kalus yang diinduksi dari eksplan tangkai putik tiga jenis jeruk Common Mandarin, Sweet Orange, dan Sweet Tangor melalui embriogenesis somatik mampu membentuk planlet yang bebas virus Citrus Psorosis Virus (CPsV). Husni *et al.* (2010) berhasil menginduksi embrio somatik jeruk siam menggunakan eksplan nuselus dan embrio zigotik dari buah muda jeruk siam Simadu dan Pontianak pada media dasar Murashige dan Wetmore (MW) dengan 3 mg/l BA + 500 mg/l *malt ekstrak*. Penelitian Kosmiatin *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa eksplan endosperm jeruk siam cv. Simadu yang ditanaman pada media MS dengan 3 mg/L BA dan 500 mg/L Casein Hidrolisat atau

ekstrak malt berhasil membentuk kalus embriogenik .

Induksi embriogenesis somatik umumnya menggunakan hormon auksin dan sitokinin. Auksin berfungsi menginduksi kalus embriogenik, sedangkan inisiasi proses embriogenik kalus dipengaruhi oleh sitokinin. Auksin yang paling umum digunakan untuk tujuan ini adalah 2,4-D (George *et al.*, (2008). Umumnya penambahan 2,4-D dikombinasikan dengan kinetin untuk meningkatkan pertumbuhan kalus. Penelitian Mukhtar *et al.*, (2005) berhasil menginduksi embrio somatik dari potongan nodus jeruk lemon (*Citrus aurantifolia*) dengan penambahan 2,4-D dan air kelapa pada media MS. Proliferasi embrio terjadi saat embrio dikultur pada media dengan penambahan 1,5 mg/L kinetin. Gholami *et al.* (2013) melakukan kultur "*immature seeds*" dari *Citrus lemon* (L.) Burm.f. ('Eureka') dan berhasil menginduksi kalus embriogenik (44,55%) pada media MS dengan penambahan 500 mg/L *malt extract*, 50 g/L sukrosa dan 3 mg/L BAP.

Penelitian Mazri & Belkoura (2021) melaporkan kultur *immature ovule Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Washington Navel pada media MS dengan penambahan 500 mg/L ekstrak ragi tanpa penambahan zpt hanya mampu menghasilkan 50% kalus yang membentuk embrio somatik. Informasi tentang induksi embriogenesis somatik dari kultur kotiledon jeruk siam pontianak belum pernah dilakukan. Berdasarkan uraian di atas dilakukan penelitian awal perbanyakan jeruk siam pontianak dengan tujuan untuk mendapatkan kalus embriogenik dari eksplan kotiledon jeruk siam pontianak pada media MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin. Kalus embriogenik yang dihasil diharapkan dapat digunakan untuk perbanyakan jeruk siam pontianak melalui embriogenesis somatik secara tak langsung (*indirect somatic embryogenesis*).

## Bahan dan Metode

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret sampai dengan September 2023 di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA Untan, Pontianak.

### Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah buah jeruk siam pontianak yang diperoleh langsung daei petani Jeruk di Sambas, komposisi media Murashige Skoog, 2,4-D dan kinetin, serta bahan kimia lainnya.

### Rancangan penelitian

Penelitian eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktorial yang terdiri dari 2 faktor yaitu 4 taraf konsentrasi 2,4-D (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/L), dan 4 taraf konsentrasi kinetin (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/L). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 4 kali, sehingga diperoleh 100 unit percobaan.

### Persiapan, sterilisasi alat dan media

Semua alat gelas yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dengan sabun cair. Selanjutnya alat dikeringkan dan disterilisasi menggunakan otoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 15 lbs (1 atm) selama 20-30 menit. Media yang digunakan adalah media Murashie Skoog padat. Persiapan media induksi kalus diawali dengan proses pembuatan stok larutan nutrisi dan stok zpt dengan melakukan penimbangan zat kimia sesuai komposisi. Setelah semua larutan stok selesai dibuat, pembuatan media dimulai dengan cara memipet larutan stok dari botol penyimpannya sesuai aturan dan melarutkannya dalam akuades (a), pada wadah lain sebanyak 7 gram agar dilarutkan dengan akuades sampai mendidih dan bening (b), kemudian a dan b di gabungkan dan dicukupkan volumenya sesuai jumlah perlakuan yang akan dibuat. Selanjutnya media dibagi sebanyak perlakuan (Tabel 1), dan masing-masing media ditambahkan zpt sesuai perlakuan dan dicukupkan volumenya dengan menambahkan akuades, selanjutnya diatur pH media menjadi 5,8-6,2 menggunakan larutan NaOH 1N atau HCl 1N. Media dituang ke dalam botol kultur kira-kira 1/5 volume botol kultur. Selanjutnya media disterilisasi menggunakan otoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 15 lbs selama 20 menit.

**Tabel 1.** Kombinasi media induksi kalus dengan perlakuan 2,4-D dan kinetin

2,4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0

0	D <sub>0</sub> K <sub>0</sub>	D <sub>0</sub> K <sub>0,5</sub>	D <sub>0</sub> K <sub>1</sub>	D <sub>0</sub> K <sub>1,5</sub>	D <sub>0</sub> K <sub>2</sub>
0,5	D <sub>0,5</sub> K <sub>0</sub>	D <sub>0,5</sub> K <sub>0,5</sub>	D <sub>0,5</sub> K <sub>1</sub>	D <sub>0,5</sub> K <sub>1,5</sub>	D <sub>0,5</sub> K <sub>2</sub>
1,0	D <sub>1</sub> K <sub>0</sub>	D <sub>1</sub> K <sub>0,5</sub>	D <sub>1</sub> K <sub>1</sub>	D <sub>1</sub> K <sub>1,5</sub>	D <sub>1</sub> K <sub>2</sub>
1,5	D <sub>1,5</sub> K <sub>0</sub>	D <sub>1,5</sub> K <sub>0,5</sub>	D <sub>1,5</sub> K <sub>1</sub>	D <sub>1,5</sub> K <sub>1,5</sub>	D <sub>1,5</sub> K <sub>2</sub>
2,0	D <sub>2</sub> K <sub>0</sub>	D <sub>2</sub> K <sub>0,5</sub>	D <sub>2</sub> K <sub>1</sub>	D <sub>2</sub> K <sub>1,5</sub>	D <sub>2</sub> K <sub>2</sub>

### Sterilisasi buah dan penanaman eksplan

Proses diawali dengan mencuci bersih buah jeruk yang kondisinya baik dan matang dengan deterjen dan air mengalir selama ±30-60 menit. Setelah itu, buah dimasukkan ke dalam LAFC untuk tahap disterilisasi. Buah jeruk diletakkan satu persatu dalam cawan petri kemudian dicelupkan ke dalam alkohol 70% dan dilewatkan di atas bunsen selama beberapa detik secara merata. Buah jeruk dibelah secara melingkar dan diambil bijinya. Kulit biji dibuang kemudian kotiledon biji dipisahkan. Eksplan kotiledon dipotong dengan ukuran ±0,5x0,5 cm dengan cara dilukai bagian pinggirnya. Eksplan selanjutnya ditanam pada media dengan posisi horizontal di atas media. Setiap botol ditanam satu eksplan. Botol-botol kultur yang berisi eksplan diberi label tanggal penanaman dan perlakuan, kemudian disimpan dengan cara disusun pada rak kultur di ruang inkubasi pada suhu ±25°C selama 28 hari. Selama masa inkubasi dilakukan penyemprotan alkohol 70% setiap hari pada botol kultur.

### Subkultur kalus

Subkultur dilakukan dengan cara memindahkan eksplan yang sudah memberikan respon ataupun eksplan yang masih hidup ke media baru dengan komposisi media dan zat pengatur tumbuh yang sama dengan media sebelumnya. Subkultur dilakukan pada kultur berumur 28 hst, dilakukan sebanyak 1 kali dan dipelihara sampai umur kultur 56 hst.

### Parameter pengamatan

Parameter pengamatan meliputi waktu inisiasi kalus (hst), persentase terbentuknya kalus (%), warna dan tekstur kalus, serta fase embrio somatik yang terbentuk.

### Analisis data

Semua data yang diperoleh dalam penelitian analisis secara deskriptif dilengkapi dengan foto hasil penelitian dan tabulasi data hasil pengamatan.

## Hasil dan Pembahasan

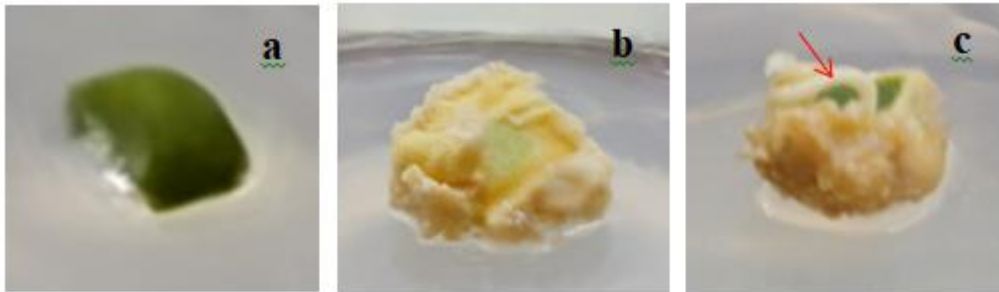
### Respon pertumbuhan eksplan kotiledon jeruk siam Pontianak

Eksplan kotiledon jeruk siam pontianak yang dikultur pada media induksi kalus memberikan respon yang berbeda-beda. Respon pertumbuhan eksplan diamati sampai umur kultur 56 hari setelah tanam (hst).

Beberapa perlakuan tidak memberikan respon sama sekali namun eksplan masih hidup, ditandai warna eksplan yang masih tetap hijau dan tidak mengalami pencoklatan (Gambar 1a). Respon pertumbuhan yang terlihat pada eksplan adalah terbentuknya kalus dan akar (Gambar 1b dan 1c). Respon pertumbuhan eksplan yang muncul pada setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Respon pertumbuhan eksplan kotiledon jeruk siam Pontianak pada media induksi kalus dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada umur kultur 56 hst

Perlakuan (mg/L) 2,4-D	kinetin	Respon pertumbuhan	Warna	Tekstur
			kalus	kalus
0	0	elongasi eksplan, kalus tidak tumbuh	-	-
	0,5	kalus, akar	putih, kekuningan	kompak
	1,0	elongasi eksplan, kalus tidak tumbuh	-	-
	1,5	elongasi eksplan, kalus tidak tumbuh	-	-
	2,0	elongasi eksplan, kalus tidak tumbuh	-	-
0,5	0	kalus	kecoklatan	kompak
	0,5	kalus	putih, kekuningan	remah
	1,0	kalus	kekuningan	remah
	1,5	kalus	putih, kekuningan	remah
	2,0	kalus	putih, kekuningan, kecoklatan	kompak
1,0	0	elongasi eksplan, kalus tidak tumbuh	-	-
	0,5	elongasi eksplan, kalus tidak tumbuh	-	-
	1,0	kalus	putih, kekuningan	remah
	1,5	kalus	kekuningan, kecoklatan	kompak,
	2,0	kalus, akar	kekuningan, kecoklatan	kompak, remah
1,5	0	elongasi eksplan kalus tidak tumbuh	-	-
	0,5	kalus	kekuningan	kompak
	1,0	elongasi eksplan kalus tidak tumbuh	-	-
	1,5	kalus	putih, kekuningan	remah
	2,0	kalus	putih, kekuningan	remah, kompak
2,0	0	kalus (sedikit)	kecoklatan	kompak
	0,5	kalus	kekuningan	kompak
	1,0	kalus	putih, kekuningan	remah, kompak
	1,5	kalus	kekuningan	remah, kompak
	2,0	kalus	putih, kekuningan, kehijauan	remah, kompak



**Gambar 1.** Respon pertumbuhan eksplan kotiledon jeruk siam Pontianak pada media induksi kalus dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada umur kultur 56 hst, a. elongasi eksplan (D0K0), b. eksplan yang membentuk kalus (D1K1) c. eksplan yang membentuk kalus dan akar (tanda panah) (D1K2)

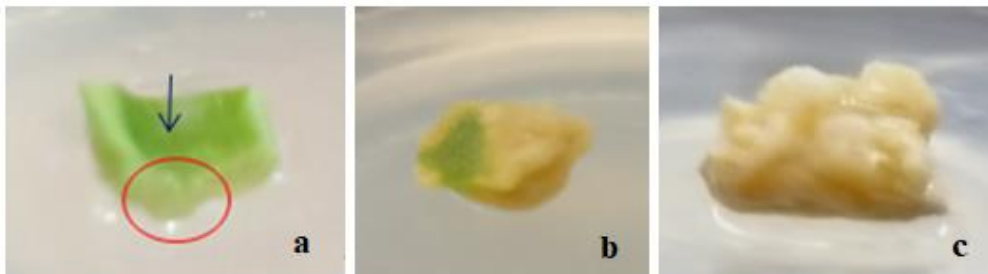
Respon yang muncul pada eksplan kotiledon yang dikultur dalam media dengan penambahan berbagai konsentrasi 2,4-D dan kinetin diawali dengan terjadinya pembesaran atau elongasi eksplan pada hari ketiga. Terjadinya elongasi diduga karena zat pengatur tumbuh auksin dan kinetin yang ditambahkan ke dalam media. Menurut Junairiah *et al.* (2018) auksin menginduksi dinding sel untuk meregang yang terjadi akibat sekresi asam melalui aktivasi enzim yang dapat memutus ikatan hidrogen antar selulosa penyusun dinding sel. Peregangan sel menyebabkan sel dapat mengalami pemanjangan. Pertambahan ukuran sel terjadi karena sel menyerap molekul air sebagai respon peningkatan konsentrasi zat terlarut dalam vakuola yang menimbulkan tekanan turgor.

Elongasi dapat menggambarkan terjadinya proses pembesaran sel dan pembelahan pada sel eksplan. Selain terjadinya elongasi pada bagian pinggir eksplan yang terluka terlihat menebal sehingga ukuran eksplan menjadi lebih besar dibanding saat awal kultur. Rusdianto dan Indrianto (2012) menjelaskan bahwa jenis eksplan yang digunakan, komposisi media dan zat pengatur

tumbuh yang ditambahkan ke dalam media berinteraksi sehingga menimbulkan respon eksplan yang membesar. Sari *et al.* (2018) menjelaskan bahwa nutrisi yang diserap eksplan dari media mempengaruhi terjadinya pembengkakan dan pemanjangan eksplan Selanjutnya George dan Sherrington (1984) mengemukakan bahwa kalus yang terbentuk pada eksplan menunjukkan terjadinya perubahan perimbangan hormon endogen setelah penyerapan nutrisi oleh jaringan.

#### Waktu muncul kalus

Eksplan kotiledon yang ditanam pada media padat mulai memperlihatkan respon pada hari ketiga. Eksplan mengalami elongasi atau pemanjangan dan pembesaran eksplan. Pembentukan kalus terlihat rata-rata di hari ke-7 setelah tanam, ditandai terjadinya pembekakan dan akhirnya muncul berupa tonjolan berwarna putih pada bagian pinggir eksplan yang terluka (Gambar 2a). Pertumbuhan kalus terlihat jelas setelah kultur memasuki umur 28 hst dan pada umur 56 hst kalus terlihat mulai menutupi eksplan (Gambar 2 b dan 2c).



**Gambar 2.** Pembentukan kalus dari eksplan kotiledon pada media MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin, a. kalus muncul pada bagian pinggir eksplan yang terluka umur 7 hst (lingkaran merah), b. kalus umur 28 hst, c. kalus umur 56 hst. tanda panah= eksplan

Pembentukan kalus mulai terlihat rata-rata pada hari ke-7 terutama pada eksplan yang ditumbuhkan dalam media dengan perlakuan kombinasi 2,4-D dan kinetin. edangkan pada perlakuan tunggal 2,4-D ataupun perlakuan tunggal kinetin banyak eksplan yang tidak membentuk kalus. Hal ini menunjukkan bahwa induksi pembentukan kalus pada eksplan kotiledon memerlukan penambahan kombinasi 2,4-D dan kinetin. Di duga auksin dan sitokinin yang ditambahkan ke dalam media dan diserap oleh jaringan eksplan menyebabkan terjadinya perimbangan rasio auksin dan sitokinin endogen jaringan eksplan sehingga memicu pembentukan kalus. Konsentrasi auksin dan sitokinin yang seimbang dapat memicu pertumbuhan kalus (Lisnandar *et al.*, 2012). Selanjutnya Rusdianto

dan Indrianto (2012) menjelaskan bahwa perbedaan respon yang muncul pada perlakuan yang diberikan diduga berhubungan dengan responsifitas jaringan eksplan terhadap media kultur.

#### Persentase eksplan membentuk kalus (%)

Respon pertumbuhan eksplan berupa kalus dari semua perlakuan sebesar 72%, yang artinya dari 25 kombinasi perlakuan 18 kombinasi mampu menginduksi terbentuknya kalus. Tingkat pertumbuhan kalus pada masing-masing perlakuan juga berbeda, terlihat dari diameter kalus yang terbentuk. Nilai persentase eksplan membentuk kalus pada setiap perlakuan ditampilkan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Persentase eksplan membentuk kalus dari kultur kotiledon jeruk siam Pontianak pada media padat Murashige Skoog dengan penambahan konsentrasi 2,4-D dan kinetin umur 56 hst

Perlakuan 2,4-D (mg/L)	Persentase eksplan membentuk kalus (%)				
	Kinetin (mg/L)				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
0	0±0,00	50±57,73	0±0,00	0±0,00	0±0,00
0,5	50±57,73	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
1,0	0±0,00	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
1,5	0±0,00	100±0,00	0±0,00	100±0,00	100±0,00
2,0	50±57,73	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00

Hasil pada Tabel 2. terlihat bahwa persentase terbentuknya kalus pada setiap perlakuan berbeda-beda berkisar 0-100%. Data pada tabel juga dapat menjelaskan bahwa perlakuan yang menghasilkan persentase 100 % adalah semua perlakuan kombinasi konsentrasi 2,4-D dan kinetin, walaupun ada 2 perlakuan yang tidak memberikan respon sama sekali, tetapi kondisi eksplan masih segar dan hidup (Gambar 1a). Hasil tersebut menunjukkan bahwa eksplan kotiledon memiliki potensi yang tinggi untuk membentuk kalus jika dikultur pada media dengan penambahan zpt dari golongan auksin dan sitokinin secara bersamaan ke dalam media tumbuh. Menurut George dan Sherrington (1984), induksi kalus dapat terjadi lebih cepat jika menggunakan jaringan meristematik yang kaya akan hormon pertumbuhan seperti auksin dan sitokinin seperti kotiledon. Selanjutnya Pe´rez-Jime´nez *et al.* (2013) menjelaskan bahwa kandungan hormon endogen yang kompleks di dalam kotiledon seperti auksin (IAA), asam absisat dan sitokinin

(Zeatin) akan mempengaruhi pemanjangan, proliferasi dan diferensiasi sel.

#### Warna dan Tekstur Kalus

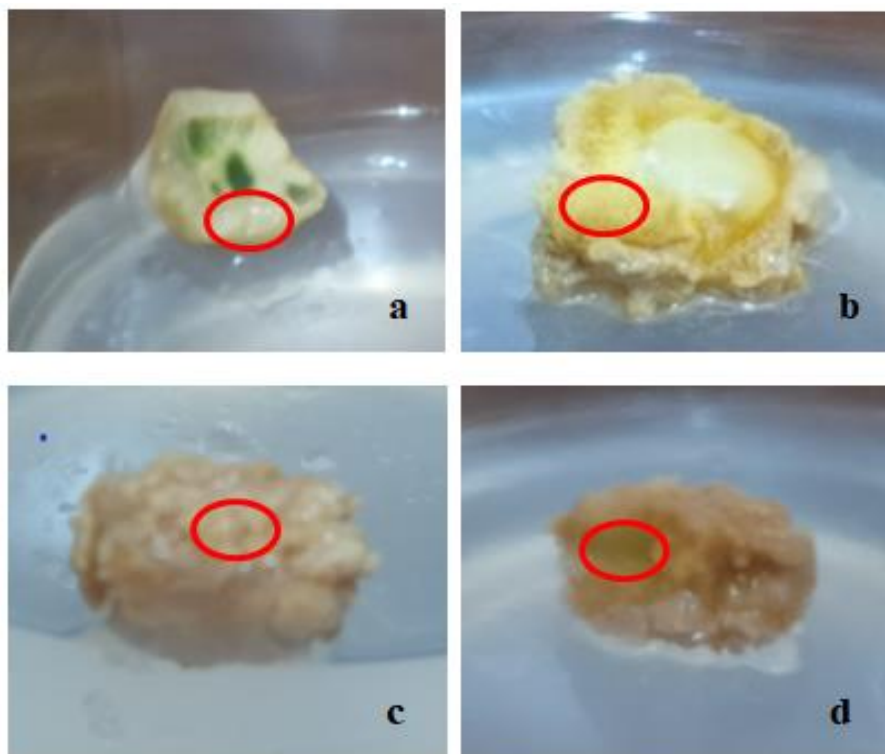
Kalus yang terbentuk pada perlakuan kombinasi ataupun pada beberapa perlakuan tunggal (D0,5K0, D2K0 dan D0K0,5) memperlihatkan warna yang bervariasi yaitu putih, kekuningan, kehijauan dan kecoklatan (Gambar 3). Warna kalus yang diamati dari awal munculnya kalus pada pinggiran eksplan sampai akhir pengamatan 56 hst mengalami perubahan. Awal terbentuknya kalus berwarna putih dan seiring waktu mengalami perubahan menjadi kekuningan, kehijauan dan kecoklatan serta ada yang masih berwarna putih.

Tekstur kalus yang dihasilkan adalah meremah dan kompak (Gambar 4). Tekstur tersebut dapat ditemukan pada kalus yang terbentuk dalam satu eksplan ataupun pada eksplan yang berbeda. Dari pengamatan warna dan tektur kalus yang dihasilkan pada kultur kotiledon menunjukkan bahwa kalus yang

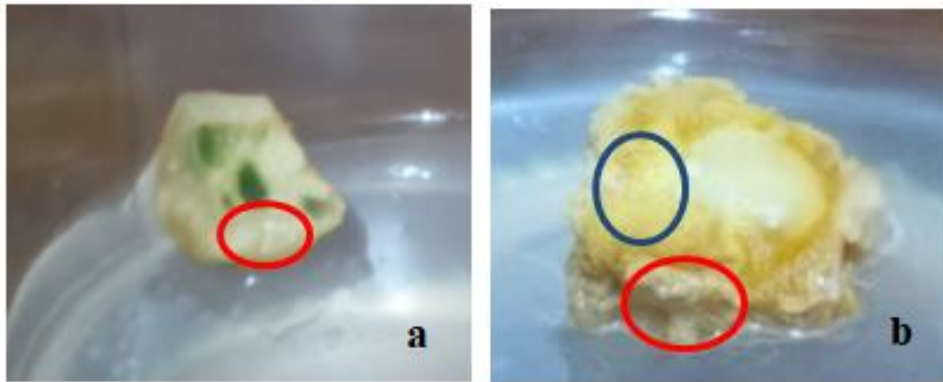
dihasilkan merupakan kalus embriogenik, ditandai oleh warna kalus yang putih dan kekuningan serta tekstur kalus yang meremah. Kebanyakan kalus yang terbentuk merupakan kalus dengan tekstur campuran kalus meremah dan kompak. Kalus meremah ditemukan pada lima kombinasi perlakuan yaitu D0,5K0,5; D1K1; D0,5K1,5; D1,5K1,5 dan D2K2.

Warna kalus yang terlihat diawal kemunculan adalah kalus berwarna putih. Selama periode kultur warna kalus ada yang berubah menjadi warna kekuningan, kehijauan dan kecoklatan. Menurut Shinta *et al.* (2020) kalus yang tumbuh baik namun tidak mengandung kloroplas umumnya berwarna putih dan kekuningan. Tekstur kalus yang dihasilkan adalah kompak dan meremah. Menurut Fitriani *et al.* (2016) kalus yang meremah dapat diamati dengan jelas dari penghubung antar sel yang ikatannya longgar; sehingga mudah dipisahkan menjadi banyak agregat sel tunggal.

Berdasarkan pengamatan kalus berwarna kekuningan dan kecoklatan dengan tekstur meremah menunjukkan sifat kalus yang embriogenik. Warna kalus yang terbentuk dapat digunakan untuk mengetahui karakter kalus embriogenik atau tidak (Shinta *et al.* 2020). Terbentuknya kalus embriogenik diduga karena perlakuan 2,4-D dan kinetin yang diberikan. Hal ini sesuai pendapat George *et al.* (2008) yang menjelaskan bahwa inisiasi kalus embriogenik umumnya menggunakan auksin eksogen berupa 2,4-D. Selanjutnya menurut Lee *et al.* (2011) terjadi peningkatan laju sintesis protein (protein pembangun atau enzim) setelah penambahan sitokinin yang mendorong pembelahan sel dalam kultur jaringan dengan meningkatkan transisi G2 ke mitosis. Hasil penelitian Rusdianto dan Indrianto (2012), memperoleh kalus berwarna putih bening atau putih kekuningan dengan tekstur friable atau remah dari kultur kalus wortel dengan penambahan 2,4-D merupakan kalus yang dapat mengikuti pola embriogenik.



**Gambar 3.** Warna kalus pada kultur kotiledon jeruk siam pontianak pada media induksi kalus dengan penambahan 2,4-D dan kinetin umur 56 hst. a. kalus putih (D0,5K1,5), b. kalus kekuningan (D1K1), c. kalus kecoklatan (D0,5K0,5), d. kalus kehijauan (D2K2)

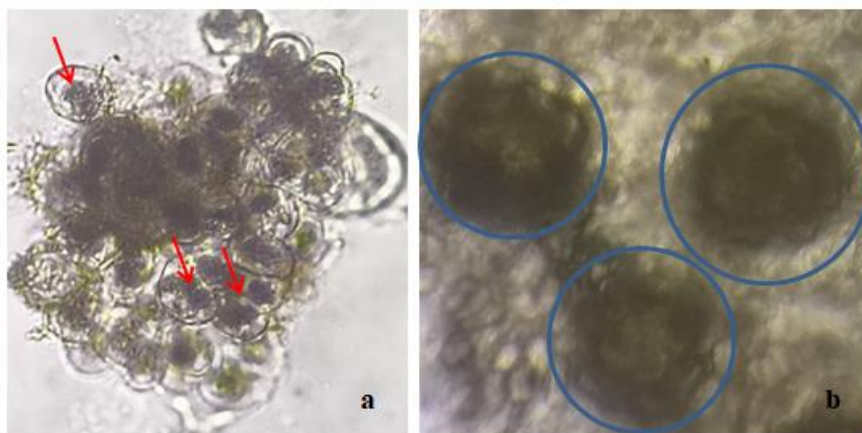


**Gambar 4.** Tekstur kalus pada kultur kotiledon jeruk siam pontianak pada media induksi kalus dengan penambahan 2,4-D dan kinetin umur 56 hst. a. kalus meremah (D0,5K1,5), b. kalus kompak (linkaran biru) dan kalus meremah (lingkaran merah) (D1K1)

### Pengamatan mikroskopis kalus embriogenik

Hasil pengamatan struktur sel kalus secara mikroskopis menunjukkan bahwa sel-sel penyusun kalus merupakan sel embriogenik yang dicirikan dengan sel yang berbentuk isodiametris, memiliki nukleus yang besar dan sitoplasma yang pekat (Gambar 5a). Sel-sel inilah yang berpotensi untuk berdiferensiasi

membentuk embrio somatik. Hasil pengamatan juga diperoleh sel embriogenik yang sudah berdiferensiasi menjadi embrio somatik fase proembrio (Gambar 5b). Menurut Pierik (1987) sel embriogenik berukuran kecil, memiliki inti besar, vakuola kecil dengan sitoplasma padat dan diketahui memiliki potensi proliferasi yang tinggi.



**Gambar 5.** Mikroskopis kalus embriogenik dari kultur kotiledon jeruk siam Pontianak pada media MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin umur 56 hst, a. sel embriogenik penyusun kalus (panah merah), b. sel embriogenik yang telah berdiferensiasi menjadi embrio somatik fase pro embrio (lingkaran biru)

### Kesimpulan

Penambahan 2,4-D dan kinetin menunjukkan pengaruh nyata terhadap induksi kalus dari kotiledon jeruk siam pontianak dibanding perlakuan kontrol. Kalus yang dihasilkan bertekstur kompak dan remah dengan warna kalus bervariasi yaitu putih, kekuningan, kehijauan dan kecokelatan. Kalus embriogenik dihasilkan pada lima perlakuan kombinasi yaitu

D0,5K0,5; D1K1; D0,5K1,5; D1,5K1,5 dan D2K2 dengan ciri kalus remah berwarna kekuningan dan kecokelatan. Pada pengamatan mikroskopis ditemukan embrio somatik pada fase pro embrio.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dekan Fakultas MIPA atas pendanaan



penelitian ini melalui Dana DIPA Fakultas MIPA dengan no kontrak 2655/UN22.8/PT.01.05/2023.

## Referensi

- Badan Pusat Statistik Kabupaten Sambas. (2020). Kabupaten Sambas dalam Angka 2020. BPS Kabupaten Sambas. Sambas.
- Bagaskara BA, Irawan IGP, Sritamin M, dan Yuniti IGAD. (2018). Perbanyak Tanaman Jeruk Siam (*Citrus nobilis* L.) dengan Teknik Kultur in vitro Menggunakan Biji Tanaman Terinfeksi Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD). *AGROTROP*, 8(2): 179-188. <https://eprints.unmas.ac.id/id/eprint/186/>.
- Banaty OA. (2017). Teknologi Budidaya Jeruk Siam Pontianak Pada Lahan Suboptimal Di Sambas, Kalimantan Barat. *Prosiding Seminar Nasional Mewujudkan Kedaulatan Pangan pada Lahan Sub Optimal Melalui Inovasi Teknologi Pertanian Spesifik Lokasi*. <https://repository.pertanian.go.id/handle/123456789/9407>
- Devy NF., Yenni & Hardiyanto. (2014). The Growth Performance Of Citrus Derived From Somatic Embryogenesis Plantlet And Scion Stock. *Indonesian Journal Agriculture Sciences*, 15(2): 71-78. <https://repository.pertanian.go.id/server/api/core/bitstreams/73efe709-6a35-4be6-863a-bd63573ccc2e/content>
- D'Onghia AM, Carimi F, De Pasquale F, dan Djelouah K. (2001). Elimination of citrus psorosis virus by somatic embryogenesis from style cultures. *Plant Pathology*, 50(2):1-5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00550.x>
- Fitriani H, Aryaningrum PD, dan Sri Hartati N. (2016). Proliferation of embryogenic callus of Satoimo taro (*Colocasia esculenta* var. antiquorum) in culture media with various levels of sucrose and gelling agent. *Nusantara Bioscience*, 8(1), 316-320. DOI <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n080230>
- George EF, dan Sherrington PD. (1984). Plant propagation by tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegenetic Limited, England.
- George EF, Hall MA, dan Klerk GD. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. 3 ed. Springer. Belanda.
- Gholami AA., Alavi SV., Majd A., & Fallahian F. (2013). Plant regeneration through direct and indirect somatic embryogenesis from immature seeds of citrus. *European Journal of Experimental Biology*, 3(3):307-310. [www.pelagiaresearchlibrary.com](http://www.pelagiaresearchlibrary.com)
- Gray DJ. (2005). Propagation from nonmeristematic tissues: Nonzygotic embryogenesis. In R.N. Trigiano and D.J. Gray (eds.) *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press LLC: 187-200.
- Hardiyanto, Sutopo, Sugiatno A, Al Fanshuri B, dan Aji TG. (2021). Teknologi Produksi Jeruk, dalam: *Teknologi Inovatif Jeruk Suhat Nusantara* (Editor: Budiarto K, dan Sugiharto AN). Penerbit IPB Press: 155-215.
- Husni A, Purwito A, Mariska I, dan Soedarsono. (2010). Regenerasi Jeruk Siam melalui Embriogenesis Somatik. *Jurnal AgroBiogen*, 6(2): 75-83. DOI: 10.21082/jbio.v6n2.2010.
- Junairiah, J., Purnomo, P., Utami, E. S. W., Ni'matuzahroh, N., & Sulistyorini, L. (2018). Callus Induction of Piper betle Var Nigra Using 2,4-Dichlorofenoxyacetic Acid and 6-Benzil Aminopurin. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 10(3), 588-596. <https://journal.unnes.ac.id/nju/biosaintifika/article/view/15962>
- Kosmiatin M, Purwito A, Wattimena GA, dan Mariska I. (2014). Induksi Embriogenesis Somatik dari Jaringan Endosperma Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) cv Simadu. *Jurnal Agronomi Indonesia*, 42 (1) : 44 – 51. <https://journal.ipb.ac.id/index.php/jurnalagrnomi/article/view/8149>
- Kosmiatin M. dan A. Husni. (2018). Mikropropagasi Jeruk: Bunga Rampai. Pemanfaatan SDG dan Bioteknologi Mendukung Pertanian Berkelanjutan.

- (penyunting: Sabran M. Lestari EG, Utami DW, Purnamaningsih R, Suryadi Y, Tasma IM, Mastur, Sustiprijatno, Wibisono RAS). Kementerian Pertanian Republik Indonesia: 210-230.
- Lee Y, Lee DE, Lee HS, Kim SK, Lee WS, Kim SH, Kim MW. (2011). Influence of auxins, cytokinins., and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 10, 9-19. DOI: 10.1007/s11240-010-9832-3
- Lisnandar DS, Mudyantini W, dan Pitoyo A. (2012). Pengaruh Pemberian Variasi Konsentrasi NAA ( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid) dan 2,4 D terhadap Induksi Protocorm Like Bodies (PLB) Anggrek Macan (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.). *Bioteknologi*, 9(2): 66-72. <https://smujo.id/bbs/article/view/1578>
- Margareta F, Budianto, dan Sutoyo. (2019). Studi Tentang Metode Perbanyak Tanaman Jeruk Siam Pontianak (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*) secara Vegetatif di Kebun Percobaan Puntan Desa Sido Mulyo Kota Batu. *Berkala Ilmiah PERTANIAN*, vol. 2(1):26-29. <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/BIP/article/view/16152>.
- Mazri MA., & Belkoura I. (2021). Effect of plant growth regulators and malt extract on somatic embryogenesis and in vitro grafting of Citrus plants. *African & Mediterranean Agricultural Journal*. 130: 1-16. <http://dx.doi.org/10.34874/IMIST.PRSM/afirmed-i130.31376>
- Méndez-Hernández HA., Ledezma-Rodríguez M., Avilez-Montalvo RN., Juárez-Gómez YL., Skeete A., Avilez-Montalvo J., De-la-Peña C., & Loyola-Vargas VM. (2019). Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. (Review). *Frontiers in Plant Science*, 10(77): 1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Mukhtar R, Khan MM, Rafiq R, Shahid A, dan Khan FA. (2005). In Vitro Regeneration and Somatic Embryogenesis in (*Citrus aurantifolia* and *Citrus sinensis*). *International. Journal of Agriculture & Biology*, 7(3):518-520. [https://www.fspublishers.org/published\\_papers/19147\\_..pdf](https://www.fspublishers.org/published_papers/19147_..pdf)
- Pe´rez-Jime´nez M, Cantero-Navarro E, Acosta M, dan Cos-Terrer J. (2013). Relationships between endogenous hormonal content and direct somatic embryogenesis in *Prunus persica* L. Batsch cotyledons. *Plant Growth Regulation: An International Journal on Plant Growth and Development*, 71(3):219–224. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-013-9822-7>
- Pierik RLM. (1987). In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Rusdianto dan Indrianto A. (2012). Induksi Kalus Embriogenik Pada Wortel (*Daucus carota* L.) menggunakan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Bionature*, 13(2): 136-140. <https://ojs.unm.ac.id/bionature/article/view/1439>
- Sari YP, Kusumawati E, Saleh C, Kustiawan W, dan Sukartingsih. (2018). Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa*. *Nusantara Bioscience*. 10 (3):183-192. <https://smujo.id/nb/article/view/2776>
- Shinta, Minarno EB, Rofiqoh I. (2020). In vitro embryogenic callus induction of *Carica pubescens* Lenne and K.Koch using 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid) and BAP (6-Benzylaminopurin). *Journal of Biological Researches*, 25(2), 38-44. <https://www.berkalahayati.org/index.php/jurnal/article/view/49>