

## JURNAL METAMORFOSA

### Journal of Biological Sciences

eISSN: 2655-8122

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

#### Induksi Perkecambahan In Vitro Jeruk Hasil Fusi Protoplas Pada Medium Dengan Penambahan Asam Giberelat

#### Induction Of Protoplast Fusion Citrus In Vitro Germination In Medium By Addition Of Gibberellic Acid

Anak Agung Ayu Laksmi Damarnegari<sup>1\*</sup>, Ida Ayu Astarini<sup>1</sup>, Made Ria Defiani<sup>1</sup>, Mia Kosmiatin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Prodi Biologi, FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali

<sup>2</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No 3A, Bogor 16111, Indonesia

\*Email: [laksmidamar@gmail.com](mailto:laksmidamar@gmail.com)

#### INTISARI

Pemuliaan tanaman adalah upaya pengembangan tanaman dengan memanipulasi sistem genetik tanaman untuk mendapatkan kultivar baru yang lebih unggul. Upaya pemuliaan tanaman seringkali menghasilkan biji yang bersifat inkompatibel, sehingga perlu dilakukan proses penyelamatan untuk mengurangi risiko gugurnya embrio. Penambahan asam giberelat merupakan salah satu cara untuk mempercepat perkecambahan biji yang tidak kompatibel. Tujuan penelitian adalah untuk menentukan pemberian konsentrasi asam giberelat yang tepat terhadap perkecambahan embrio globular jeruk hasil fusi protoplas. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB BIOGEN), Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian, Bogor. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan konsentrasi asam giberelat yaitu 0, 1, 2, 3 ppm, masing-masing terdiri dari 7 ulangan. Eksplan yang digunakan adalah embrio globular jeruk galur FS 29 dan FS 89 hasil fusi protoplas jeruk Siam Simadu dengan Mandarin Satsuma berukuran rata-rata 3 mm. Pengamatan dilakukan terhadap persentase embrio yang berkecambah, waktu berkecambah, jumlah dan persentase kecambah sempurna dan tidak sempurna (abnormal, hanya bagian akar atau bagian tunas yang berkembang). Data dianalisis menggunakan uji Crosstab dengan *software* IBM SPSS Statistics 22. Hasil penelitian menunjukkan penambahan asam giberelat pada media dapat mempercepat perkecambahan dan meningkatkan persentase kecambah yang dihasilkan. Media perkecambahan terbaik pada jeruk FS 29 adalah VMW + 2 ppm dan 3 ppm asam giberelat dengan persentase perkecambahan 85,7% dalam waktu 7 hari sedangkan media perkecambahan terbaik pada jeruk FS 89 adalah VMW + 1 ppm asam giberelat dengan persentase perkecambahan 100% dalam waktu 8,5 hari. Media VMW + 1, 2, 3 ppm asam giberelat pada jeruk FS29 dan VMW + 2 ppm dan 3 ppm asam giberelat pada jeruk FS89 baik digunakan untuk mendapatkan kecambah sempurna dengan tingkat keberhasilan sebesar 100%.

Kata kunci: Citrus sp., asam giberelat, inkompatibel, in vitro, perkecambahan embrio

#### ABSTRACT

Plant breeding is an effort to develop plants by manipulating the genetic system of plants to get new superior cultivars. Plant breeding often produces incompatible seeds, so a rescue process is needed to reduce the risk of embryo death. The addition of gibberellic acid could break the seed dormancy for

seed that hard to germinate. The purpose of this study was to find out the best concentration of gibberellic acid for germination of citrus globular embryos from protoplast fusion. Research was conducted at the Biology and Cell Biology Research Group In Vitro Culture Laboratory, Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (BB BIOGEN), Agricultural Research and Development Agency, Ministry of Agriculture, Bogor. The study used Completely Randomized Design (CRD) with concentration 0, 1, 2 and 3 ppm of gibberellic acid as treatment, each consists of 7 replicates. This study used globular embryos measuring  $\pm 3$  mm of inbred FS 29 and FS 89 from protoplast fusion between Siam Simadu and Mandarin Satsuma citrus. Observations were made on the percentage of germinated embryos, time of germination, the number of the complete and incomplete shoot (abnormal, only part of the roots or buds that developed). Data were analyzed using Crosstab analysis test with IBM SPSS Statistics 22 software. Result showed that addition of gibberellic acid induce faster germination time and increase seedling percentage. The best germination medium for citrus FS 29 was VMW with 2 ppm and 3 ppm gibberellic acid with the seedling percentage around 85,7% in 7 days, while the best germination medium for citrus FS 89 was VMW with 1 ppm gibberellic acid with 100% seedling embryos in 8,5 days. VMW medium added with 1 ppm, 2 ppm and 3 ppm gibberellic acid for citrus FS29 and VMW medium added with 2 ppm and 3 ppm for citrus FS89 were good to get the complete sprouts with a succes rate of 100%.

**Keyword:** Citrus sp. gibberellic acid, incompatible, in vitro, embryo germination

## PENDAHULUAN

Tanaman jeruk (*Citrus* sp.) adalah tanaman buah tahunan (*perennial*) asal Cina yang dapat tumbuh dengan baik di daerah tropis dan subtropis (Adelina *et al.*, 2017). Buah jeruk merupakan salah satu jenis buah-buahan yang diminati, dibutuhkan dan bernilai ekonomi tinggi di Indonesia, khususnya wilayah Bali. Jenis-jenis jeruk yang dibudidayakan di Indonesia diantaranya jeruk manis (*Citrus sinensis* L.), jeruk keprok (*C. reticulata* Blanco.), jeruk siam (*C. nobilis* Lour.), jeruk besar/pamelo (*C. maxima* Merr.), jeruk lemon (*C. limon* Linn.) dan jeruk nipis (*C. aurantifolia* Swingle.) (Andayani, 2016).

Pemuliaan tanaman adalah upaya pengembangan tanaman dengan memanipulasi sistem genetik tanaman untuk mendapatkan kultivar baru yang lebih unggul (Hallauer, 2011). Upaya pemuliaan tanaman seringkali menghasilkan biji yang bersifat inkompatibel, maka dari itu perlu dilakukan proses penyelamatan untuk mengurangi risiko gugurnya embrio. Perkecambahan embrio secara *in vitro* dilakukan pada embrio belum matang fisiologis, lemah, tanaman langka yang memiliki biji dalam jumlah yang terbatas, sulit ditemukan, dan biji yang sulit berkecambah (Kosmiatin *et al.*, 2005; Lestari, 2008; Sarasan

*et al.*, 2006). Penambahan asam giberelat merupakan salah satu cara untuk mematahkan dormansi biji yang belum matang sehingga sulit berkecambah. Asam giberelat dapat memicu aktivitas enzim hidrolitik untuk menyediakan nutrisi yang cukup untuk perkecambahan (Lestari *et al.*, 2016). Tujuan penelitian adalah untuk menentukan pemberian konsentrasi asam giberelat yang tepat terhadap perkecambahan embrio globular jeruk hasil fusi protoplas antara jeruk siam medan dengan jeruk mandarin satsuma.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB BIOGEN), Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian, Bogor pada bulan Maret 2019 – Mei 2019. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan konsentrasi asam giberelat sebesar 0, 1, 2, 3 ppm, masing-masing diulang sebanyak 7 kali dengan setiap ulangan terdiri dari 5 embrio jeruk FS 29 dan FS 89 berukuran rata-rata 3 mm yang diisolasi dari jeruk hasil fusi protoplas

antara jeruk siam medan dengan mandarin satsuma (FS 29 dan FS 89) berukuran 3-3,5 cm.

Buah jeruk FS 29 dan FS 89 dicuci dengan air mengalir dan deterjen, selanjutnya dalam *laminar airflow* (ESCO, PT Prolabmas Jakarta) buah jeruk disterilisasi dengan alkohol 96% dan dilewatkan pada api Bunsen sebanyak empat kali secara berulang. Buah selanjutnya dikupas di atas cawan Petri dengan menggunakan *scalpel* untuk mengambil bijinya. Biji jeruk terlebih dahulu ditanam dalam media VMW (MS modifikasi vitamin MW) untuk memudahkan proses isolasi embrio. Selanjutnya embrio biji diisolasi secara hati-hati dengan kondisi steril di dalam *laminar airflow* dan dikultur dalam media perlakuan. Kultur tersebut ditumbuhkan pada ruang kultur dengan suhu 22°C di bawah pencahayaan lampu TL (*tubular lamp*) 18 watt selama 24 jam (Husni *et al.*, 2010).

Pengamatan perkecambahan embrio secara *in vitro* dilakukan setiap hari selama empat minggu dengan variabel yang diamati diantaranya persentase embrio yang berkecambah, waktu berkecambah serta persentase tunas sempurna dan tidak sempurna (abnormal, hanya bagian akar atau bagian tunas yang berkembang). Data hasil pengamatan perkecambahan *in vitro* diolah dengan menggunakan uji Crosstab dengan *software* IBM SPSS Statistics 22.

## HASIL

Hasil pengamatan perkecambahan embrio globular jeruk galur FS 29 dan FS 89 selama 4 minggu (Tabel 1) menunjukkan persentase perkecambahan embrio jeruk FS 29 tertinggi sebesar 85,7% dengan waktu yang diperlukan untuk berkecambah tercepat selama 7 hari pada media VMW dengan penambahan asam giberelat sebanyak 2 dan 3 ppm. Persentase perkecambahan embrio jeruk FS 89 tertinggi sebesar 100% pada media VMW + 1 ppm asam giberelat, sedangkan waktu perkecambahan tercepat terjadi pada media VMW + 2 ppm asam giberelat yaitu selama 7,8 hari. Penambahan asam giberelat sebanyak 1, 2, 3 ppm mampu menghasilkan 100% kecambah sempurna pada jeruk FS 29, sedangkan pada

jeruk FS 89 persentase kecambah sempurna tertinggi mencapai 100% terdapat pada penambahan asam giberelat sebanyak 2 dan 3 ppm.

Tabel 1. Respon embrio jeruk terhadap media dengan konsentrasi asam giberelat yang berbeda pada 4 minggu setelah tanam (MST)

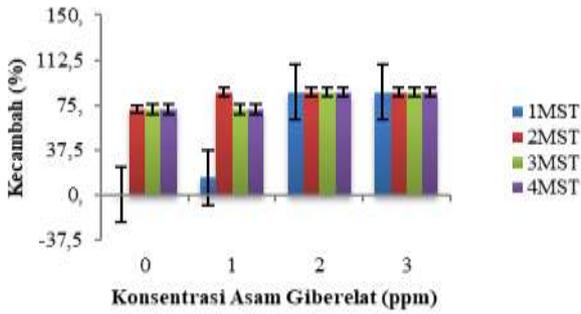
Galur jeruk	Asam giberelat (ppm)	Kecambah (%)	Waktu (hari)	KS (%) <sub>1)</sub>	KTS (%) <sub>2)</sub>
FS29	0	71,4	11,2	20	80
	1	71,4	9,3	100	0
	2	85,7	7	100	0
	3	85,7	7	100	0
FS89	0	28,6	19	0	100
	1	100	8,5	85,7	14,3
	2	57,1	7,8	100	0
	3	42,9	8	100	0

### Keterangan:

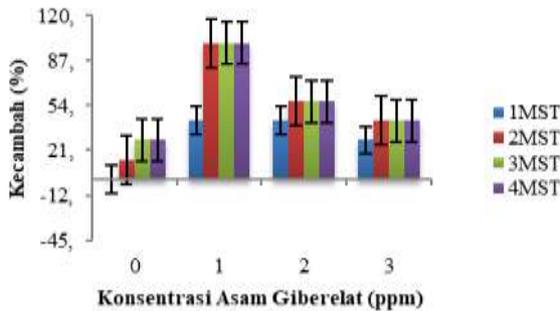
1) KS : kecambah sempurna

2) KTS : kecambah tidak sempurna

Persentase perkecambahan embrio jeruk FS 29 setiap minggunya relatif konstan, namun pada media VMW + 1 ppm asam giberelat terjadi penurunan persentase perkecambahan dari minggu ke-3 dikarenakan adanya kontaminasi yang disebabkan oleh jamur sebesar 14,28% (Gambar 1). Peningkatan persentase embrio FS 89 berkecambah terjadi pada 2 MST dan tidak mengalami peningkatan pada minggu selanjutnya kecuali pada media kontrol tanpa asam giberelat. Terdapat kontaminasi jamur sebesar 7,14% (Gambar 2).

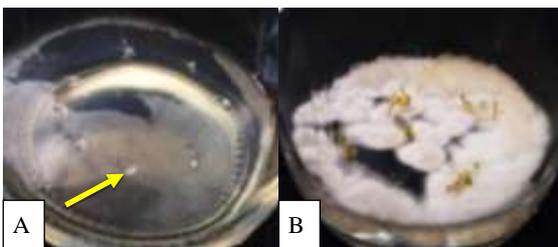


Gambar 1. Persentase perkecambahan embrio jeruk FS 29 setiap minggu



Gambar 2. Persentase perkecambahan embrio jeruk FS 89 setiap minggu

Hasil analisis statistik dengan Crosstab menunjukkan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara pemberian asam giberelat dengan persentase perkecambahan embrio jeruk FS29 ( $P = 0,838 > 0,05$ ), sedangkan pada perkecambahan embrio jeruk FS 89 menunjukkan hubungan yang signifikan antara pemberian asam giberelat dengan persentase perkecambahan embrio ( $P = 0,043 < 0,05$ ). Hasil pengamatan perkecambahan embrio jeruk (Gambar 3), gambar A menunjukkan embrio berwarna putih yang tidak berkecambah dan gambar B menunjukkan adanya kontaminasi jamur.



Gambar 3. Embrio tidak berkecambah, warna embrio putih (A), kontaminasi jamur (B)

Gambar 4 menunjukkan perkecambahan tidak sempurna embrio yang kotiledonnya telah terbuka namun tidak diikuti pertumbuhan akar (A), embrio dengan akar yang memanjang namun tidak diikuti pemanjangan tunas (B) dan kecambah sempurna dengan akar, batang serta daun (C).



Gambar 4. Kecambah tidak sempurna (A dan B), kecambah sempurna (C)

**PEMBAHASAN**

Perkecambahan didefinisikan sebagai munculnya radikel pada testa benih sebagai tanda awal pertumbuhan individu baru pada tanaman yang dipengaruhi oleh air sebagai aktivator enzim metabolisme (Agustrina, 2008). Penambahan asam giberelat pada perkecambahan embrio globular dapat berperan dalam merangsang perkecambahan dengan mengaktifkan enzim-enzim hidrolitik (enzim amilase, proteinase dan lipase) di lapisan aleuron yang akan mengubah cadangan makanan menjadi zat yang diperlukan dalam proses perkecambahan (Bareke, 2018). Keberadaan asam giberelat pada biji akan menghentikan kerja asam absisat sebagai penyebab dormansi dan akan merangsang terjadinya perkecambahan (Skubacz and Daszkowska-golec, 2017).

Perkecambahan embrio globular perlu dilakukan untuk mengurangi risiko terjadinya inkompatibilitas pada embrio hasil persilangan dari dua tetua yang berbeda. Pada fusi protoplas terjadi penggabungan dua genom tanaman sehingga peningkatan ploidi dapat menyebabkan abnormalitas yang mengakibatkan gugurnya embrio dewasa (Kosmiatin and Husni, 2018).

Pengaruh penambahan asam giberelat terhadap persentase perkecambahan embrio

jeruk FS 29 menunjukkan hasil tidak adanya hubungan yang signifikan antara perlakuan dengan hasil ( $P=0,838>0,05$ ). Pada perkecambahan embrio jeruk FS 89 diperoleh hubungan yang signifikan antara penambahan asam giberelat dengan persentase perkecambahan embrio ( $P=0,043 < 0,05$ ). Jeruk FS29 dan FS89 merupakan individu yang berbeda meskipun berasal dari fusi protoplas yang sama antara jeruk siam Medan dan jeruk mandarin Satsuma. Induksi fusi protoplas dilakukan dengan menggunakan polietilen glikol (PEG) yang menyebabkan penggabungannya bersifat acak (Husni, 2010). Jeruk hasil fusi protoplas memiliki sifat gabungan dari kedua tetua yang berbeda, sehingga mengakibatkan keragaman yang tinggi pada regenerasi hasil fusi dan terdapat kemungkinan perbedaan respon dari embrio jeruk yang diberikan perlakuan asam giberelat pada galur yang berbeda. Tanaman hasil fusi dapat memberikan respon yang berbeda dalam proses regenerasinya sesuai dengan langkah selanjutnya yang diambil dalam proses perkembangan tanaman (Kirti *et al.* 2003).

Respon tanaman terhadap penambahan ZPT eksogen dapat dipengaruhi oleh faktor genetik tanaman sesuai dengan pernyataan Faridan and Rohaeni (2019) yang menyatakan faktor eksternal (lingkungan) dan faktor internal (genetik) dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Selain itu rendahnya persentase perkecambahan embrio FS89 disebabkan oleh perubahan warna embrio dari hijau menjadi putih (*bleaching*) dan adanya kontaminasi bakteri dan jamur (Gambar 3). Perubahan warna pada embrio dapat disebabkan oleh teknis pengerjaan yang kurang baik sehingga terjadi perlukaan oleh *scalpel* atau pinset saat mengisolasi embrio dari biji jeruk.

Rata-rata waktu perkecambahan paling cepat adalah embrio jeruk FS 29 pada media VMW penambahan 2 dan 3 ppm asam giberelat selama 7 hari setelah tanam (HST), sedangkan waktu perkecambahan paling lama terdapat pada jeruk FS 89 yang ditanam di media kontrol VMW (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Khan *et al.* (2002), dimana pemberian asam giberelat

eksogen pada perkecambahan biji jeruk dapat memberikan keuntungan dalam mengurangi waktu yang diperlukan biji jeruk untuk berkecambah. Dormansi pada biji jeruk sangat jarang terjadi, namun tidak menutup kemungkinan bahwa dormansi bisa terjadi pada beberapa spesies jeruk.

Dormansi menurut Predente and Paiva (2018) pada umumnya berhubungan dengan faktor yang berkaitan dengan kondisi internal biji, seperti halnya integumen yang keras dan tidak permeabel terhadap air dan gas dan embrio yang belum matang. Penambahan asam giberelat diperlukan dalam perkecambahan embrio globular dikarenakan adanya kemungkinan dormansi pada embrio. Kombinasi media terbaik pada perkecambahan embrio globular jeruk dilihat dari persentase kecambah yang dihasilkan dan waktu berkecambah adalah media VMW + 2 ppm dan 3 ppm asam giberelat pada jeruk FS 29 serta media VMW + 1 ppm asam giberelat pada jeruk FS 89.

## KESIMPULAN

Penambahan asam giberelat pada media mempengaruhi waktu dan persentase kecambah yang dihasilkan dengan media perkecambahan terbaik pada jeruk FS 29 adalah VMW + 2 dan 3 ppm asam giberelat dengan persentase perkecambahan 85,7% dalam waktu 7 hari sedangkan media perkecambahan terbaik pada jeruk FS 89 adalah VMW + 1 ppm asam giberelat dengan persentase perkecambahan 100% dalam waktu 8,5 hari. Media yang baik digunakan untuk mendapatkan kecambah sempurna pada jeruk FS 29 adalah VMW + 1, 2, 3 ppm asam giberelat, sedangkan pada jeruk FS89 adalah VMW + 2 ppm dan 3 ppm asam giberelat dengan tingkat keberhasilan sebesar 100%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Kepala dan staf BB Biogen Bogor karena telah memberikan izin dan fasilitas selama kegiatan penelitian di BB Biogen. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian peningkatan kualitas jeruk yang

dilakukan dengan dana berasal dari DIPA BB BIOGEN TA 2019: 1798.201.054.A.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adelina, S.O., E. Adelina and Hasriyanty. 2017. Identifikasi Morfologi dan Anatomi Jeruk Lokal (*Citrus* sp.) di Desa Doda dan Desa Lempe Kecamatan Lore Tengah Kabupaten Poso. *E-Jurnal Agrotekbis*. 5(1): 58-65.
- Andayani, S. 2016. Tips Membedakan Jenis Jeruk. <http://balitjestro.litbang.pertanian.go.id/tips-membedakan-jenis-jeruk/>. diakses pada 10 Februari 2019.
- Agustrina, R. 2008. Perkecambahan dan Pertumbuhan Kecambah Leguminosae di Bawah Pengaruh Medan Magnet. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat*. Universitas Lampung.
- Bareke, T. 2018. Biology of Seed Development and Germination Physiology. *Advances in Plants & Agriculture Research*. 8(4): 336-346.
- Faridan and N. Rohaeni. 2019. Pengaruh Konsentrasi Hormon Asam giberelat terhadap Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Ziraa'ah*. 44(1): 1-8.
- Husni, A. 2010. Fusi Protoplas Interspesies antara Jeruk Siam Simadu (*Citrus nobilis* Lour.) dengan Mandarin Satsuma (*C. unshiu* Marc.). Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. (Disertasi). Tidak dipublikasikan.
- Husni, A., A. Purwito, I. Mariska and Sudarsono. 2010. Regenerasi Tanaman Jeruk Siam melalui Embryogenesis Somatik. *J. Agrobiogen*. 6:79-83.
- Hallauer, A.R. 2011. Evolution of Plant Breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 11: 197-206.
- Khan, M.M., M. Usman, R. Waseem and M.A. Ali. 2002. Role of Gibberellic Acid (GA<sub>3</sub>) on Citrus Seed Germination and Study of Some Morphological Characteristics. *Pak J. Agri.Sci*. 39(2): 113-118.
- Kirti, P.B., S. Prakash, S.R. Bhat and V.L. Chopra. 2003. Protoplast Fusion and Brassica Improvement. *Indian Journal of Biotechnology*. 2: 76-84
- Kosmiatin, M. and A. Husni. 2018. Perakitan Varietas Jeruk Tanpa Biji Melalui Pemuliaan Konvensional dan Nonkonvensional. *Jurnal Litbang Pertanian*. 37(2): 91-100.
- Kosmiatin, M., A. Husni and I. Mariska. 2005. Perkecambahan dan Perbanyak Gaharu secara *In Vitro*. *Jurnal AgroBiogen*. 1(2): 62-67.
- Lestari, E.G. 2008. *Kultur Jaringan: Cara Cepat Mendapatkan Bibit Unggul dan Perbanyakannya Secara Besar-besaran*. AkaDemiA. Bogor.
- Lestari, D., R. Linda and Mukarlina. 2016. Pematahan Dormansi dan Perkecambahan Biji Kopi Arabika (*Coffea arabika* L.) dengan Asam Sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dan Asam giberelat (GA<sub>3</sub>). *Protobiont*. 5(1): 8-13.
- Sarasan V., R. Cripps, M.M. Ramsey, C. Atherton, M. McMichen, G. Prendergast and J.K. Rowntree. 2006. Conservation *In Vitro* of Threatened Plants; Progress in The Past Decade. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 42: 206-214.
- Skubacz, A. and A. Daszkowska-Golec. 2017. Seed Dormancy: The Complex Process Regulated by Abscisic Acid, Gibberellins, and Other Phytohormones that Makes Seed Germination Work. *Phytohormones-Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses*. 4(6): 77-100.