



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

INDUKSI EMBRIO SOMATIK JERUK KEPROK (*Critus reticulata* B.) DENGAN PENAMBAHAN 2,4-D DAN KINETIN

SKRIPSI



**DEWI KURNIATI
05133044**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

**INDUKSI EMBRIO SOMATIK JERUK KEPROK (*Citrus reticulata* B.)
DENGAN PENAMBAHAN 2,4-D DAN KINETIN**

Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains bidang studi Biologi

Oleh:

DEWI KURNIATI

05133044

Padang, Juli 2011

Disetujui oleh:

Pembimbing




Drs. Suwirman, MS
NIP. 196304191989011001

Skripsi ini telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Biologi,

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang

pada hari Selasa tanggal 09 Agustus 2011

No	N a m a	Jabatan	Tanda Tangan
1	Dr. Zozy Anelof Noli	Ketua	
2	Drs. Suwirmen, MS	Anggota	
3	Prof. Dr. Syamsuardi, MSc	Anggota	
4	Retno Prihatini, Msi	Anggota	

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb

Puji dan syukur kehadirat Allah SWT yang dengan rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian sampai pada penulisan skripsi ini. Skripsi ini disusun berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dengan judul'' Induksi Embrio Somatik Jeruk Keprok (*Citrus reticulata* B.) dengan Penambahan 2,4-D dan Kinetin''. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan program Sarjana pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.

Dengan penuh rasa hormat, penulis menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan kepada Bapak Drs. Suwirmen, MS selaku pembimbing I dan Ibu Dra. Zuraida Dawair, M. Si selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktu dan pikirannya untuk penulis serta memberikan petunjuk, saran, bimbingan dan pengarahan sejak perencanaan penelitian sampai penulisan skripsi ini. Ucapan terima kasih dan penghargaan juga ditujukan kepada:

1. Bapak Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang
2. Bapak Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang
3. Ibu Dra. Netty Marusin, MS selaku Penasehat Akademik
4. Ibu Netty, WS; Ibu Dr. Zozy Aneloi Noli, MP; Bapak Prof. Dr. Syamsuardi, M. Sc selaku penguji dan dosen pengajar yang telah banyak membantu dalam perbaikan skripsi ini

5. Bapak dan Ibu staf pengajar serta karyawan-karyawati Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang
6. Kepala Laboratorium beserta Analis Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Kultur Jaringan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang
7. Rekan-rekan mahasiswa yang telah memberikan semangat dan dorongan kepada penulis dalam pelaksanaan penelitian dan penyelesaian penulisan skripsi ini
8. Semua pihak yang telah turut membantu dan berpartisipasi dalam penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi ini.

Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat dalam menambah informasi dibidang Fisiologi Tumbuhan dan Kultur Jaringan serta dapat menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya.

Padang, Agustus 2011

Penulis

ABSTRAK

Penelitian tentang pengaruh 2,4-D dan kinetin terhadap induksi embrio somatik jeruk keprok (*Citrus reticulata* B.) telah dilakukan dari bulan Maret sampai Oktober 2011 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Kultur Jaringan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang optimal untuk membentuk embrio somatik pada jeruk keprok. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam faktorial. Faktor pertama konsentrasi 2,4-D (1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm) dan faktor kedua konsentrasi kinetin (0 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 1,5 ppm; 2 ppm), dengan 2 ulangan. Data yang didapatkan dianalisa secara deskriptif dan statistik yang dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan New Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua perlakuan belum mampu menginduksi embrio somatik setelah 12 minggu masa kultur, namun beberapa telah mampu membentuk kalus yang embriogenik dan membentuk organ seperti tunas dan akar.

ABSTRACT

The study about the effect of 2,4-D and kinetin for induction somatic embryogenesis of Mandarin Orange (*Citrus reticulata* B.) had been done from March until October 2010 at Plant Physiology and Tissue Culture Laboratory Biology Department Faculty of Mathematic and Natural Science Andalas University Padang. The aim of this study was found the optimum concentration of 2,4-D and kinetin to induce somatic embryo of Mandarin Orange. This research used experimental method with Factorial Randomized Completely Design. The first factor is 2,4-D concentration (1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm) and the second factor is kinetin concentration (0 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 1,5 ppm; 2 ppm), with 2 replications. The data were analysed descriptively and statistically with continuing test Duncan New Multiple Range Test (DNMRT) at 5% stage. The result showed that all of treatments unable to induce somatic embryo after 12 weeks culture period, but some of them can produced embryogenic calli and organs like shoot and root.

DAFTAR ISI

Halaman Persetujuan Pembimbing.....	i
Halaman Persetujuan Tim Penguji.....	ii
Halaman Peruntukan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	x
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Lampiran.....	xii
I. Pendahuluan.....	1
II. Tinjauan Pustaka.....	5
2.1 Jeruk Keprok.....	5
2.2 Kultur Jaringan.....	7
2.3 Embriogenesis Somatik.....	9
2.4 Zat Pengatur Tumbuh.....	11
III. Pelaksanaan Penelitian.....	15
1.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
1.2 Metode Penelitian.....	15
1.3 Bahan dan Alat.....	16
1.4 Cara Kerja.....	16
3.4.1 Sterilisasi Alat.....	16
3.4.2 Pembuatan larutan stok MS.....	17
3.4.3 Pembuatan medium MS.....	17

3.4.4	Persiapan eksplan.....	18
3.4.5	Penanaman eksplan.....	18
3.4.5.1	Induksi embrio somatik.....	18
3.5	Pengamatan.....	19
3.6	Analisa data.....	20
IV.	Hasil dan Pembahasan.....	21
4.1	Persentase hidup eksplan.....	21
4.2	Struktur dan tekstur kalus.....	22
4.3	Berat basah eksplan.....	29
4.4	Persentase eksplan yang membentuk embrio somatik.....	32
4.5	Respon kalus embriogenik dan organ yang terbentuk.....	32
V.	Kesimpulan dan Saran.....	35
5.1	Kesimpulan.....	36
5.2	Saran.....	36
	Daftar Pustaka.....	37
	Lampiran.....	40

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Struktur dan tekstur kalus <i>Citrus reticulata</i> B. yang diberi perlakuan 2,4-D dan kinetin setelah 12 minggu.....	22
2. Berat basah kalus <i>Citrus reticulata</i> B. yang diberi perlakuan 2,4-D dan kinetin setelah 12 minggu.....	29
3. Respon kalus embriogenik dan organ yang terbentuk pada eksplan <i>Citrus reticulata</i> B. yang diberi perlakuan 2,4-D dan kinetin setelah 12 minggu.....	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hasil pengamatan kalus <i>Citrus reticulata</i> B. yang diberi perlakuan ZPT tunggal (2,4-D).....	41
2. Hasil pengamatan kalus <i>Citrus reticulata</i> B. yang diberi perlakuan 2,4-D 1 ppm dikombinasikan dengan kinetin.....	42
3. Hasil pengamatan kalus <i>Citrus reticulata</i> B. yang diberi perlakuan 2,4-D 2 ppm dikombinasikan dengan kinetin.....	43
4. Hasil pengamatan kalus <i>Citrus reticulata</i> B. yang diberi perlakuan 2,4-D 3 ppm dikombinasikan dengan kinetin.....	44
5. Hasil pengamatan kalus <i>Citrus reticulata</i> B. yang diberi perlakuan 2,4-D 4 ppm dikombinasikan dengan kinetin.....	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi dasar medium Murashige-Skoog (MS) C. I. Franklin dan R. A Dixon dalam R. A Dixon and R. A Gonzales (1994).....	40
2. Gambar hasil pengamatan kalus <i>Citrus reticulata</i> B. dengan penambahan beberapa konsentrasi 2,4-D dan kinetin.....	41
3. Data analisa statistik berat basah kalus <i>Citrus reticulata</i> B. yang diberi perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin.....	46

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Jeruk merupakan komoditi buah-buahan yang sangat penting dengan nilai ekonomi tinggi. Luas panen jeruk meningkat 40% dalam kurun waktu 5 tahun terakhir, namun dalam kurun waktu yang sama impor jeruk segar juga meningkat (Muryati, 2005). Tendensi permintaan buah-buahan internasional termasuk jeruk akan meningkat, diperkirakan permintaan pasar dalam negeri akan meningkat sebesar 10% per tahun. Konsumsi jeruk di Indonesia hanya 2,7 kg/orang/tahun, masih jauh dari konsumsi ideal sebesar 6,4 kg/orang/tahun. Dengan konsumsi ideal, diperlukan 1,3 juta ton jeruk/tahun, padahal produksi jeruk di tahun 1996 hanya 793.810 ton/tahun yang saat ini tidak bergerak banyak. Untuk itu masih diperlukan penambahan 50.129 ha kebun jeruk (Rahardi *et al*, 1999).

Dari seluruh spesies jeruk, jeruk keprok (*Citrus reticulata* B.) merupakan yang paling populer dan dibudidayakan secara komersil karena kualitasnya, kesegarannya bila dikonsumsi dan citarasa yang aromatik. Meskipun banyak dibudidayakan, dalam penanamannya terdapat beberapa kesulitan seperti pertumbuhan yang lambat dan masa juvenil yang lama, adanya hama dan penyakit, pendeknya masa penyimpanan (Mukhtar, Khan, Fatima, Abbas dan Shahid, 2005).

Menurut Jahja dan Sutoyo (1991) *cit* Hatimah (2000), jeruk keprok berpotensi untuk dikembangkan. Tanaman ini dapat hidup puluhan tahun. Namun penyebarannya menemui hambatan bahkan populasinya terancam punah akibat serangan CVPD (Citrus Vein Phloem Degeneration). Dari serangan penyakit ini masih ada tersisa tanaman jeruk yang masih hidup, tidak terserang penyakit dan dianggap sudah tahan terhadap penyakit ini.

Untuk itu diperlukan suatu upaya untuk penyediaan bibit buah jeruk keprok dalam waktu singkat dan jumlah yang besar, serta bebas dari penyakit, memiliki sifat

sama dengan induknya. Salah satu alternatif pemecahan masalah yaitu melalui teknik kultur jaringan atau teknik *in vitro* (Suryowinoto, 1996). Menurut Hendaryono (1994), selain memperoleh bibit yang seragam dan mirip dengan induknya melalui teknik kultur jaringan juga diperoleh tanaman yang bebas penyakit.

Kultur jaringan merupakan teknik menumbuhkembangkan bagian tanaman baik berupa sel, jaringan atau organ dalam kondisi aseptik secara *in vitro*. Teknik ini dicirikan oleh kondisi secara kultur yang aseptik, penggunaan kultur buatan dengan kandungan nutrisi lengkap dan ZPT (zat pengatur tumbuh) (Yusnita, 2003).

Biji jeruk bersifat poliembrioni. Artinya dalam satu biji terdapat lebih dari satu embrio (Chin dan Robert, 1980). Dalam keadaan alami embrio-embrio ini tidak mampu untuk tumbuh optimal namun melalui teknik kultur jaringan, embrio-embrio tersebut mampu untuk tumbuh. Menurut Wetherel (1982) dengan metoda kultur jaringan akan dihasilkan embrioid (bentuk serupa embrio) yang dapat digandakan dan tumbuh menjadi normal serta memiliki sifat yang sama dengan induknya.

• Perbanyakan *in vitro* tanaman dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan organogenesis (pembentukan tunas samping dan tunas adventif) dan embriogenesis somatik. Dibandingkan dengan teknik organogenesis, regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik memiliki beberapa keunggulan karena mampu menghasilkan embrio bipolar dari sel atau jaringan vegetatif (Litz dan Gray, 1995).

Embriogenesis somatik merupakan proses dimana sel-sel somatik (haploid maupun diploid) berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahapan perkembangan embrio tanpa melalui fusi gamet (William dan Maheswara 1986). Beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan embrio somatik adalah zat pengatur tumbuh, jenis eksplan, dan komposisi medium (Dixon dan Gonzales, 1993). Pola perkembangan eksplan melalui embriogenesis memerlukan zat pengatur tumbuh untuk merangsang potensi yang ada (Edy dan Pujisiswanto, 2008).

Beberapa zat pengatur tumbuh yang juga dapat berperan dalam induksi embrio somatik diantaranya adalah BAP, NAA dan 2,4-D. Penelitian Edy dan Pujisiswanto (2008) menunjukkan bahwa 2,4-D, picloram, dicamba dan NAA merupakan zat pengatur tumbuh yang efektif untuk menginduksi embrio somatik, sedangkan IBA, IAA, 4-CPA, dan 2,4,5-T diketahui tidak efektif dalam menginduksi embrio somatik pada tanaman kacang tanah (*Arachis hypogea*). Penelitian embriogenesis somatik pada tanaman lain sudah cukup maju diantaranya hasil penelitian Riyadi dan Tirtoboma (2004) mendapatkan induksi terbaik embrio somatik kopi arabika var. Kartika I secara langsung dari kultur daun muda diperoleh pada media MS standar yang diberi 4 mg/l 2,4-D dan dikombinasikan dengan 0,1 mg/l kinetin yang dapat menginduksi seluruh eksplan dalam waktu 4 minggu setelah kultur. Pada kelapa sawit pematangan embrio terbaik didapatkan pada medium DF dengan penambahan 2,4-D 0,01 mg/l, kinetin 0,5 mg/l, dan ABA 0,05 mg/l; (Sumaryono *et al*, 2007). Dari studi pustaka tersebut dapat disimpulkan bahwa faktor yang paling berpengaruh pada pembentukan biak embriogenik serta regenerasinya adalah zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin. Pustaka tersebut dapat dijadikan acuan dalam mengembangkan protokol embriogenesis somatik pada jeruk keprok.

Penelitian embriogenesis somatik tanaman jeruk atau yang sefamili telah banyak dilakukan diantaranya induksi embrio somatik Kinnow Mandarin yang dilakukan Praveen, dkk (2003) yang berhasil menginduksi embrio somatik pada medium MS pada konsentrasi 0,2 mg/l BAP dikombinasikan dengan 0,2 mg/l NAA. Penambahan 2,4-D 10^{-5} M 2,4-D dan 10^{-5} M kinetin pada eksplan jeruk kacang memberikan respon berupa kalus (Novializa, 2005). Namun, belum berhasil menemukan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat untuk membentuk embrio somatik pada jeruk keprok *Citrus reticulata* B. dengan penggunaan 2,4-D dan kinetin.

Dari uraian diatas, maka akan dilakukan penelitian dengan judul **Induksi Embrio Somatik Jeruk Keprok (*Citrus Reticulata* B.) dengan Penambahan 2,4-D dan Kinetin.**

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan tersebut maka dirumuskan masalah yaitu pada konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D (auksin sintetik) dan kinetin (sitokinin sintetik) berapakah yang efektif dalam menginduksi embrio somatik *Citrus reticulata* B.?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi optimal konsentrasi 2,4-D dengan kinetin untuk membentuk embrio somatik jeruk keprok *Citrus reticulata* B.. Adapun manfaat penelitian ini yakni untuk menambah khazanah ilmu pengetahuan dalam Kultur Jaringan dan khususnya memberikan informasi tentang embriogenesis somatik.

1.4 Hipotesis

Citrus reticulata dapat membentuk embrio somatik terbaik pada medium MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D pada konsentrasi 4 ppm dan kinetin 1 ppm dibandingkan dengan konsentrasi yang lainnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jeruk Keprok

Jeruk merupakan komoditas buah-buahan yang mempunyai nilai ekonomi penting dan nilai kesehatan yang berarti karena mengandung nilai gizi yang tinggi (Vitamin C dan A). Buah jeruk dapat dikonsumsi langsung sebagai buah segar atau jus dan dapat pula diolah menjadi sirup. Di beberapa negara telah diproduksi minyak dari kulit dan biji jeruk, gula tetes, alkohol dan pektin dari buah jeruk yang terbuang. Minyak kulit jeruk dipakai untuk membuat minyak wangi, sabun wangi, esens minuman dan untuk campuran kue (Rahardi, 1999).

Salah satu jenis jeruk lokal yang dibudidayakan di Indonesia adalah jeruk keprok (*Citrus reticulata* Blanco). Nama umum dari *Citrus reticulata* B.: jeruk mandarin, jeruk keprok (Indonesia), mandarin orange (Inggris), limau kupas, limau langkat (melayu).



Gambar 1. Jeruk Keprok (*Citrus reticulata* B.)

Klasifikasi *Citrus reticulata* B. menurut Backer dan Bakhhuizen (1965),

Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Subkelas	:	Rosidae
Ordo	:	Sapindales
Famili	:	Rutaceae
Genus	:	Citrus
Spesies	:	<i>Citrus reticulata</i> B.

Deskripsi Jeruk Keprok yaitu pohonnya berperawakan kecil, berduri, ranting-rantingnya ramping; daunnya berbentuk lanset lebar atau sempit, atau jorong, ujung dan pangkalnya lancip; bunganya muncul satu-satu atau beberapa membentuk satu rangkaian, berada di ketiak daun; buahnya bertipe buah buni, berbentuk bulat gepeng atau agak membulat, berkulit tipis dan mudah dikupas serta mudah dilepaskan dari segmen daging buahnya, jika matang betul berwarna jingga cerah sampai jingga-merah-marak (*scarlet*); bijinya kecil, lancip ke satu ujung, embrionya hijau (Verheij dan Coronel, 1991).

Jeruk merupakan tanaman asli melayu tetapi sekarang penyebarannya sangat luas hampir di semua daerah tropis dan subtropik didunia. Temperatur optimal antara 25-30°C namun ada yang masih dapat tumbuh normal pada 38°C. Jeruk keprok memerlukan temperatur 20°C. Semua jenis jeruk tidak menyukai tempat yang terlindung dari sinar matahari. Kelembaban optimum untuk pertumbuhan tanaman ini sekitar 70-80% (Rahardi, 1999).

Di Asia Tenggara, jeruk keprok merupakan tanaman jeruk yang paling penting. Di Thailand (561.000 ton dari lahan 44.800 ha pada tahun 1986/ 1987) dan Indonesia (480.000 ton pada tahun 1986) produksi jeruk keprok lebih dari 80% dari seluruh jeruk. Akan tetapi di Filipina jeruk keprok ini merupakan urutan ketiga setelah 'calamondin' dan jeruk bali. Ekspor jeruk keprok dari Asia Tenggara sedikit sekali jumlahnya atau hampir tidak ada, karena untuk memenuhi kebutuhan setempat saja belum cukup (Verheij dan Coronel, 1991).

Berkat kulitnya yang mudah dikupas dan rasanya yang khas, bervariasi dari asam melulu pada beberapa kultivar sampai sangat manis pada beberapa kultivar lain, sebagian besar jeruk keprok dimakan segar. Segmen-segmen buah dikalengkan dan sari buahnya diekstrak dari buah. Pektin dan minyak atsiri diambil dari kulit buah, yang di Indonesia dijadikan bahan rujak (Verheij dan Coronel, 1991).

Biji jeruk bersifat poliembrioni dimana dalam satu biji terdapat lebih dari satu embrio. Menurut Pierik (1981), poliembrioni pada *Citrus* sering terjadi dimana dalam satu biji terdapat embrio zigotik (muncul dari penyatuan gamet jantan dan betina) dan sejumlah embrio yang dibentuk secara vegetatif (sehingga dikatakan embrio adventif). Embrio adventif ini beregenerasi dari sel-sel dalam jaringan nuselus dan integumen. Sel-sel somatik tersebut mengalami pembelahan dan membentuk embrio tambahan (Bhojwani, 1983). George dan Sherrington (1984) menambahkan bahwa embrio tambahan tersebut akan menghasilkan anakan secara genetik identik dengan tanaman induknya.

2.2 Kultur Jaringan

Kultur jaringan merupakan salah satu cara perbanyakan tanaman secara vegetatif buatan. Melalui kultur jaringan, sedikit jaringan tumbuhan diambil lalu ditumbuhkan dalam media buatan dapat tumbuh menjadi tanaman sempurna (Rahardja, 1991). Kultur tanaman secara *in vitro* telah dimulai sejak tahun 1902, ketika Herbeland berteori bahwa sel-sel dapat dibiakan (Nasir, 2002).

Cara kerja kultur jaringan adalah berdasarkan prinsip totipotensi. Berdasarkan prinsip ini sebuah sel atau jaringan tumbuhan yang diambil dari bagian manapun akan dapat tumbuh menjadi tumbuhan sempurna, kalau diletakan dalam media yang cocok. Perbanyakan dengan sistem kultur jaringan harus dilakukan dalam keadaan steril (Widarto, 1996).

Keberhasilan metode kultur jaringan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu unsur hara, zat pengatur tumbuh, faktor fisik dan eksplan. Eksplan adalah bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan untuk inisiasi suatu kultur (George dan Sherrington, 1984). Organ yang biasa digunakan sebagai eksplan pada kultur organ antara lain tunas pucuk, tunas ketiak, akar mata tunas, daun, embrio dan bakal biji.

Tingkat keberhasilan dari jenis organ tersebut tidak sama untuk setiap jenis tanaman. Eksplan yang baik memiliki syarat berupa bebas dari organisme lain, memiliki potensi generasi dan pertumbuhan yang tinggi (Neliyati, 1996).

Penggunaan eksplan dari jaringan muda lebih sering berhasil karena sel-selnya aktif membelah, dinding sel tipis karena belum terjadi penebalan lignin dan selulose yang menyebabkan kekakuan pada sel. Menurut Wattimena (1992) perbedaan dari bagian tanaman yang digunakan akan menghasilkan pola pertumbuhan yang berbeda. Eksplan tanaman yang masih muda menghasilkan tunas maupun akar adventif lebih cepat bila dibandingkan dengan bagian yang tua. Gunawan (1995) menyatakan bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai eksplan adalah pucuk muda, batang muda, daun muda, kotiledon dan hipokotil.

Keberhasilan dalam penggunaan kultur jaringan sangat tergantung pada media yang digunakan. Ada banyak macam formulasi media tanam yang dapat digunakan dalam kultur jaringan. Bahan pokok media kultur jaringan adalah beberapa garam mineral sumber unsur hara makro dan mikro, gula, protein, vitamin dan hormon. Jenis dan formulasi media untuk setiap spesies tanaman berbeda-beda, demikian juga dengan tahap pertumbuhannya juga memerlukan media khusus (Widarto, 1996).

Berdasarkan kepadatannya media kultur jaringan dikenal ada tiga jenis yaitu medium padat, semi padat dan cair. Dalam kultur jaringan untuk mendapatkan medium padat sering ditambahkan bahan pemadat yaitu agar, suatu polisakarida dengan berat molekul yang tinggi sebagai pemadat (George dan Sherrington, 1984). Kelebihan dari agar ini adalah mampu membeku pada suhu dibawah 45°C dan cair pada suhu 100°C sehingga pada kisaran suhu kultur agar akan berada dalam keadaan beku stabil, tidak dicerna oleh enzim tanaman dan tidak bereaksi dengan senyawa-senyawa penyusun media (Gunawan, 1988).

Media yang digunakan disesuaikan dengan jenis tanaman. Medium MS (Murashige & Skoog) digunakan untuk hampir semua tanaman terutama tanaman herbaceous (Hendaryono, 2000). Tanaman hortikultura juga baik dikultur pada medium MS, tanaman keras biasanya paling sesuai jika dikulturkan pada media WPM (Woody Plant Medium), dan tanaman anggrek berdasarkan percobaan yang berulang kali baik dikulturkan pada medium VW (Vacin dan Went) (Sandra, 2003).

Medium MS memiliki konsentrasi garam mineral yang tinggi, terutama NH_4^+ , NO_3^- Ca^{+2} . Walaupun unsur-unsur makro dalam media MS dibuat untuk kultur kalus tembakau, tetapi komposisi MS ini pada umumnya juga mendukung kultur jaringan tanaman lain (Gunawan, 1987).

2.3 Embriogenesis Somatik

Embriogenesis Somatik (ES) adalah proses dimana sel somatik yang ditumbuhkan dalam kondisi yang terkontrol berkembang menjadi sel embriogenetik yang selanjutnya setelah melewati serangkaian perubahan morfologi dan biokimia dapat menyebabkan pembentukan embrio somatik. Berbeda dengan embrio zigotik (hasil persilangan tanaman), perkembangan embrio somatik sangat mudah diamati, kondisi kultur sangat terkontrol dan dapat diperoleh embrio somatik dalam jumlah besar. ES memainkan peranan penting pada perbanyakan klonal, karena secara genetik bersifat klonal dan secara morfologi bersifat normal (Nuryadin, 2009).

Embrio aseksual atau embrio somatik adalah embrio yang terbentuk bukan dari penyatuan sel-sel gamet jantan dan betina atau dengan kata lain embrio yang terbentuk dari jaringan vegetatif/ somatik. Embrio ini dapat terbentuk dari jaringan tanaman yang dikulturkan tanpa melalui proses yang dikenal dengan nama somatik embriogenesis. Jika proses ini terbentuk langsung pada eksplan tanpa melalui proses

pembentukan kalus terlebih dahulu, maka prosesnya disebut embriogenesis somatik langsung (Nuryadin, 2009).

Regenerasi melalui embriogenesis somatik memberikan banyak keuntungan, antara lain: (1) waktu perbanyakan lebih cepat; (2) pencapaian hasil dalam mendukung program perbaikan tanaman lebih cepat; dan (3) jumlah bibit yang dihasilkan tidak terbatas jumlahnya (Mariska 1996). Di samping itu, dengan strukturnya yang bipolar dan kondisi fisiologis yang menyerupai embrio zigotik maka perbanyakan melalui pembentukan embrio somatik lebih menguntungkan daripada pembentukan tunas adventif yang unipolar.

Eksplan yang biasa digunakan dalam induksi embrio somatik adalah embrio zigotik yang belum matang, petioles dan hipokotil dari biji yang masih muda (Dixon dan Gonzales, 1993). Keberhasilan regenerasi melalui embrio somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain formulasi media, yang berbeda pada setiap tahap perkembangan embrio somatik serta jenis eksplan yang digunakan (Sukmadjaja, 2005).

Pada umumnya kalus embriogenik ditandai dengan tekstur yang kompak dan memiliki struktur yang teratur, sedangkan kalus non-embriogenik bertekstur remah, pertumbuhan cepat dan strukturnya tidak teratur. Beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan embrio somatik adalah jenis eksplan, medium dan zat pengatur tumbuh. Saat ini embriogenesis somatik mendapat perhatian besar di bidang bioteknologi tanaman, yaitu untuk regenerasi tanaman transgenik dimana sel hasil hibridisasi somatik akan diregenerasikan melalui teknik ini (Utami *et al*, 2007).

Beberapa jenis tanaman hortikultura (misalnya jeruk) dapat secara alamiah membentuk embrio aseksual ini. Dalam kondisi alamiah, embrio aseksual ini terdapat terutama pada tanaman-tanaman yang bisa menghasilkan lebih dari satu embrio pada bijinya misalnya pada jeruk, atau tanaman yang menghasilkan biji-biji

vegetatif (apomixis) misalnya pada manggis. Selain itu, embrio aseksual ini dapat juga terbentuk dari jaringan-jaringan tanaman seperti ovule, jaringan nukleus (nucellar embryoni), jaringan integumen pada ovule (misalnya pada pepaya), jaringan pembungkus biji/mesocaps pada wortel. Tanaman-tanaman tersebut dapat juga membentuk embrio aseksual ini secara *in vitro* (Rahardi, 1999).

Dalam kondisi *in vitro*, embrio aseksual ini dapat terbentuk secara langsung dari eksplan-eksplan embrio (seksual/zigotik) dari golongan monokotil dan dikotil, dari kecambah muda (hipokotil dan kotiledon), dan bagian eksplan juvenil lainnya. Embrio aseksual ini dapat digunakan sebagai salah satu cara perbanyakan tanaman secara *in vitro*. Embrio yang telah terbentuk dapat dimultiplikasi, selanjutnya melalui beberapa proses perkembangan sampai masak dan dapat berkecambah membentuk tanaman utuh. Tanaman ini selanjutnya diaklimatisasi dan ditanam pada kondisi alamiahnya. Teknik ini digunakan untuk perbanyakan beberapa tanaman hortikultura terutama anggrek dimana embrio aseksual (berupa protocorm like body, plb) terbentuk dari meristem, daun, dll (Rahardi, 1999).

2.4 Zat Pengatur Tumbuh

Untuk merangsang dan memacu perkembangan sel jaringan tanaman yang dikulturkan maka perlu adanya penambahan zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh adalah senyawa organik bukan nutrisi, dalam konsentrasi rendah dapat mendorong, menghambat atau secara kualitatif mampu mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Wattimena, 1988).

Menurut Wattimena (1992) auksin sintetik perlu ditambahkan karena auksin yang terbentuk secara alami sering tidak mencukupi untuk pertumbuhan jaringan eksplan. Auksin mempunyai peranan terhadap pertumbuhan sel, dominasi apikal dan pembentukan kalus. Kisaran konsentrasi auksin yang biasa digunakan adalah 0,01 –

10 ppm. Zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik yang bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung (promote), menghambat dan merubah proses fisiologi tumbuhan (Abidin, 1995). Auksin dan sitokinin adalah zat pengatur tumbuh yang sering ditambahkan dalam media tanam karena mempengaruhi pertumbuhan dan organogenesis dalam kultur jaringan dan organ.

Zat pengatur tumbuh berperan dalam menentukan arah pertumbuhan suatu kultur. Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik, yang biasanya digunakan dalam konsentrasi rendah. Selain auksin, zat pengatur tumbuh sitokinin juga berpengaruh terhadap diferensiasi sel dalam proses embriogenesis somatik (Wattimena, 1988 *cit.* Oktavia, Siswanto, Budiani, Sudarsono, 2003).

Zat pengatur tumbuh ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan dan organ. Penambahan auksin atau sitokinin eksogen mengubah level zat pengatur tumbuh endogen sel (Gunawan, 1987). Zat pengatur tumbuh dapat dibagi menjadi beberapa golongan, yaitu golongan auksin, sitokinin, giberelin dan inhibitor. Zat pengatur tumbuh yang tergolong auksin adalah 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D), Naftalen Asam Asetat (NAA), Indol Asam Asetat (IAA), dan Indol Asam Butirat (IBA). Zat pengatur tumbuh yang tergolong sitokinin adalah kinetin, zeatin, ribosil, Benzil Aminopurin (BAP). Zat pengatur tumbuh yang tergolong giberelin adalah GA1, GA2, GA3 dan GA4. Sedangkan zat yang tergolong inhibitor antara lain adalah fenolik dan asam absisat (Daisy, 1994).

Gunawan (1987) menyatakan interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur. Menurut Salisbury dan Ross (1992), konsentrasi sitokinin yang relatif tinggi akan menginduksi pembentukan pucuk dan

menghambat pengakaran, sedangkan konsentrasi auksin yang tinggi merangsang pembentukan akar dan menghambat pembentukan pucuk.

Zat pengatur tumbuh 2,4-D dan NAA merupakan golongan auksin sintetik yang mempunyai sifat lebih stabil daripada IAA, karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh tanaman atau oleh pemanasan pada proses sterilisasi (Gamborg, Wetter *cit* Daisy, 1994). Level auksin dalam eksplan tergantung pada bagian tanaman yang diambil dan jenis tanamannya. Oleh karena itu sulit untuk menentukan suatu formula terbaik pada setiap penggunaan. Auksin dalam kultur jaringan berperan dalam pembentukan kalus, klorofil, morfogenesis akar dan tunas serta embriogenesis (Fauza, Sepriyanto, Nurdin, 2004).

Sitokinin adalah kelompok senyawa organik yang menyebabkan pembelahan sel yang dikenal dengan proses sitokinesis. Efek fisiologis sitokinin meliputi menstimulasi pembelahan sel, berperan dalam sintesis DNA, mitosis, sitokinesis, memberikan pengaruh terhadap pelebaran daun tanaman, merangsang pertumbuhan tunas dan mematahkan dormansi, proliferasi tunas ketiak, penghambatan pertumbuhan akar dan induksi umbi mikro pada kentang (Devlin, 1975) dan Wiendi *et al*, (1991).

Salah satu golongan sitokinin adalah kinetin. Kinetin merupakan N₆ Furfuril adenin, suatu turunan dari basa adenin. Kinetin belum pernah diisolasi dari jaringan tanaman tapi dari hasil kromatografi ekstrak tanaman, diduga kinetin juga terdapat pada tanaman pada konsentrasi rendah. Kinetin sering dimasukkan ke dalam media kultur untuk induksi kalus dan suspensi sel serta untuk induksi morfogenesis (1-20) μ M. Konsentrasi yang lebih tinggi (20-50) μ M bisa digunakan untuk mendorong percepatan multiplikasi tunas, pucuk aksilar dan pucuk adventif serta meristem (Wattimena *et al*, 1991). Umumnya pemakaian (1-2) mg/L sitokinin sudah

mencukupi untuk multiplikasi tunas. Tingkat yang lebih tinggi cenderung mendorong pembentukan pucuk adventif (Dixon and Gonzales, 1994).

Zat pengatur tumbuh yang paling efektif dan kombinasinya yang tepat juga tergantung pada jenis kombinasi medium yang dipilih (Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, 1991). Setiap jaringan mempunyai respon yang berbeda dalam penyerapan zat pengatur tumbuh dalam medium dan memiliki kandungan zat pengatur tumbuh endogen yang berbeda. Oleh karena itu dalam embriogenesis somatik kadang-kadang hanya dibutuhkan auksin, sitokinin secara sendiri-sendiri atau campuran auksin dan sitokinin (Oktavia dkk, 2003).

III. PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret s/d Oktober 2010 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Kultur Jaringan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas, Padang.

3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen dengan pengamatan secara deskriptif dan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial.

Perlakuan terdiri dari kombinasi 2 zat pengatur tumbuh yaitu:

A. 2,4-D dengan konsentrasi

- 1 ppm (a_0)
- 2 ppm (a_1)
- 3 ppm (a_2)
- 4 ppm (a_3)

B. Kinetin dengan konsentrasi

- 0 ppm (b_0)
- 0,5 ppm (b_1)
- 1 ppm (b_2)
- 1,5 ppm (b_3)
- 2 ppm (b_4)

Masing-masing perlakuan dibuat sebanyak 2 ulangan dengan variasi konsentrasi sebagai berikut:

2,4-D kinetin	a_0	a_1	a_2	a_3
b_0	$a_0 b_0$	$a_1 b_0$	$a_2 b_0$	$a_3 b_0$
b_1	$a_0 b_1$	$a_1 b_1$	$a_2 b_1$	$a_3 b_1$
b_2	$a_0 b_2$	$a_1 b_2$	$a_2 b_2$	$a_3 b_2$
b_3	$a_0 b_3$	$a_1 b_3$	$a_2 b_3$	$a_3 b_3$
b_4	$a_0 b_4$	$a_1 b_4$	$a_2 b_4$	$a_3 b_4$

Total unit perlakuan adalah 20 (perlakuan) x 2 (ulangan) = 40 unit

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Laminar Air Flow Cabinet (LAFB), autoklaf, stoma, oven, hot plate, neraca analitik, lampu Ultra Violet (UV), mikroskop CETI dan mikroskop binokuler, magnetik stirrer, gelas piala, gelas ukur, cawan petri, pipet ukur, pipet hisap, botol kultur, botol aquadest, scalpel, pisau, spatula, lampu spritus, kaca objek, cover glass, pH-meter, kertas saring, gunting, pinset, kertas, kertas tisu, karet gelang, selotip besar dan kecil, plastik kaca dan aluminium foil.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah biji *Citrus reticulata* B., bahan-bahan untuk pembuatan medium MS (lampiran 1), zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin, aquades, bayclean, mamalime, spritus, HCl 0,1 N, NaOH 0,1 N dan alkohol 70%.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan pada semua alat yang digunakan. Botol kultur dicuci bersih dengan detergen lalu dibilas sampai bersih, kemudian direndam dalam larutan desinfektan selama 24 jam lalu dikeringkan. Botol kultur yang telah kering lalu dibungkus dengan plastik kaca dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Kertas saring, tissue, kertas dan aluminium foil hanya disterilisasi dengan merk Stoma. Pisau scalpel, pinset, petridish, becker glass, pipet ukur dan gelas ukur dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan kemudian dibungkus dengan kertas dan disterilisasi dengan merk Stoma.

3.4.2 Pembuatan larutan stok medium MS (Murashige & Skoog)

Semua zat-zat penyusun komposisi medium MS ditimbang sesuai komposisi dan dilarutkan menurut kelompoknya. Masing-masing larutan medium dikelompokkan atas larutan stok I (hara makro), stok II (hara mikro), stok III (Fe.NaEDTA) dan stok IV (vitamin) (dapat dilihat pada lampiran). Larutan stok I dilarutkan dalam 250 mL aquades steril (5 x kelarutan) dan stok II, III, dan IV dilarutkan dalam 250 ml aquades steril (untuk 50 x kelarutan) dan stok V dilarutkan dalam 200 ml aquades steril (untuk 20 x kelarutan). Larutan ini disimpan dalam lemari pendingin sampai saat penggunaan.

3.4.3 Pembuatan Medium MS

Untuk pembuatan 1 liter medium MS dosis penuh dalam gelas piala dimasukan aquades steril sebanyak 200 ml, ditambahkan stok I sebanyak 50 ml, stok II, stok III, stok IV sebanyak 5 ml dan stok V sebanyak 10 ml. Dihomogenkan dengan magnetic stirer. Kemudian ditambahkan sukrosa sebanyak 30 gr serta agar 7 gr dan dihomogenkan. Zat pengatur tumbuh dimasukan sesuai perlakuan kemudian volume dicukupkan dengan aquades steril menjadi 1 liter. Diatur pH antara 5,8 sampai 6 dengan penambahan 0,1 M HCl atau 0,1 M NaOH. Dipanaskan sampai mendidih sambil dihomogenkan menggunakan magnetik stirer. Medium yang telah mendidih dimasukan kedalam botol kultur yang telah disterilkan. Botol kultur yang telah berisi medium ditutup rapat dengan aluminium foil dan kertas penutup lalu diikat dengan karet gelang. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121⁰C dengan tekanan 15 lbs selama 10 menit. Setelah disterilkan medium diinkubasi selama 1 minggu sebelum digunakan untuk melihat apakah medium terkontaminasi atau tidak,

bila terdapat medium yang terkontaminasi segera dipisahkan dan dikeluarkan dari ruangan inkubasi.

3.4.4 Persiapan Eksplan *Citrus reticulata* B.

Eksplan yang digunakan adalah hipokotil dari kecambah biji *Citrus reticulata* B. yang berasal dari Nagari Kacang, Danau Singkarak, Kabupaten Solok. Biji dimasukan kedalam larutan bayclean 5% yang telah dicampur dengan mamalime selama 10-15 menit sambil diaduk. Setelah itu dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali. Selanjutnya proses dilakukan didalam LAFC, biji dimasukan kedalam alkohol 70% selama satu menit dan dibilas kembali dengan aquades steril. Lalu dimasukan kedalam larutan bayclean 30% selama satu menit, dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan kertas tisu steril. Setelah biji steril, kulit biji dilepas lalu ditempatkan pada cawan petri steril dan siap untuk ditanam dalam medium MS 0 untuk membuat kecambah. Bagian hipokotil dari kecambah dijadikan eksplan untuk ditanam ke medium perlakuan.

3.4.5 Penanaman Eksplan

Sebelum memulai penanaman terlebih dahulu dilakukan sterilisasi ruang tanam atau LAFC dengan menyemprot alkohol 70%. Alat-alat transfer seperti pinset, scalpel beserta gagangnya, cawan petri, serbet, tissue gulung, selotip besar, selotip kecil, gunting, aquades steril dan alkohol 70% di UV selama 1 jam.

3.4.5.1 Induksi Embrio Somatik

Epikotil dari kecambah *Citrus reticulata* B. dipotong 2 mm lalu ditanam kedalam botol kultur yang telah berisi medium MS dengan penambahan konsentrasi 2,4-D dan kinetin sesuai perlakuan dengan menggunakan pinset secara aseptis. Kemudian

diletakkan pada ruang kultur dengan pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Setelah 1 mst bagian ujung eksplan seharusnya mulai membentuk kalus dan terus mengalami proliferasi setiap minggu. Untuk mempermudah pengamatan tahap-tahap perkembangan embrio, kalus yang terbentuk dari semua perlakuan masing-masingnya diambil 1 ulangan, disubkultur 2 kali pada medium MS 0 cair pada minggu ke-4 dan minggu ke-8. 2 ulangan lain dari masing-masing perlakuan disubkultur 2 kali pada medium MS 0 padat. 12 minggu setelah masa tanam dilakukan pengamatan embrio somatik yang terbentuk pada setiap perlakuan dengan menggunakan mikroskop CETI dan mikroskop binokuler.

3.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan 12 minggu setelah tanam (mst) di medium perlakuan.

Parameter yang akan diamati dalam percobaan ini adalah:

a. Persentase hidup eksplan

Pengamatan dilakukan setelah eksplan berumur 12 mst pada masing-masing perlakuan, dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Persentase hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang hidup}}{\text{Jumlah ulangan}} \times 100\%$$

Kriteria eksplan yang tumbuh adalah eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mati

b. Struktur dan tekstur kalus

Pengamatan dilakukan setelah eksplan berumur 12 minggu. Diamati secara visual dengan mengamati tekstur (remah atau kompak) dan warna kalus yang terbentuk pada eksplan

c. Berat basah eksplan

Pengamatan dilakukan pada kalus setelah eksplan berumur 12 minggu dengan menggunakan timbangan analitik

- d. Persentase eksplan yang membentuk embrio somatik

Pengamatan dilakukan setelah eksplan berumur 12 minggu dengan memperhatikan ciri-ciri eksplan yang membentuk embrio somatik. Cara penghitungan sbb:

Persentase embrio somatik yang terbentuk

$$= \frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk embrio somatik}}{\text{Jumlah ulangan}} \times 100\%$$

- e. Respon kalus embriogenik dan organ yang terbentuk

Dilakukan pengamatan kalus yang membentuk kalus embriogenik/ non-embriogenik atau membentuk organ.

3.6 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini, yaitu berupa persentase hidup eksplan, struktur dan tekstur kalus, jumlah embrio somatik yang terbentuk dan respon kalus embriogenik dan organ yang terbentuk pada masing-masing perlakuan disajikan secara deskriptif. Sedangkan untuk parameter berat basah eksplan dilakukan analisa statistik menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial. Bila hasil yang didapat berbeda nyata pada taraf 5% maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DNMRT (Duncan New Multiple Range Test) pada taraf 5%.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian yang telah dilakukan mengenai induksi embrio somatik jeruk keprok (*Citrus reticulata* B.) dengan penambahan 2,4-D dan kinetin, didapatkan hasil sebagai berikut:

4.1 Persentase hidup eksplan

Hasil pengamatan terhadap eksplan *Citrus reticulata* B. sampai 12 mst (akhir pengamatan) menunjukkan persentase hidup yang tinggi yaitu mencapai 100% pada semua perlakuan. Hal ini menunjukkan semua faktor yang mempengaruhi hidup eksplan dapat terpenuhi diantaranya medium yang digunakan, zat pengatur tumbuh dan jenis eksplan.

Pada penelitian ini digunakan medium MS. Menurut Gunawan (1987), medium MS merupakan medium dasar yang dapat digunakan pada hampir semua jenis kultur karena mengandung hara organik yang memenuhi kebutuhan banyak sel dalam kultur. Persentase hidup eksplan yang tinggi ini dikarenakan nutrisi yang tersedia didalam medium MS yang digunakan sudah mampu untuk memenuhi kebutuhan eksplan *Citrus reticulata* B. untuk hidup dan tumbuh.

Diperkirakan juga kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin yang diberikan masih dalam batas kemampuan eksplan untuk bisa bertahan hidup sampai akhir pengamatan. Menurut Collin dan Edwards (1998), level zat pengatur tumbuh merupakan faktor yang sangat menentukan keberhasilan pertumbuhan kalus/ suspensi sel dan diferensiasi.

Jenis, umur dan ukuran eksplan yang digunakan juga sangat menentukan keberhasilan kultur. Eksplan yang digunakan adalah hipokotil dari kecambah *Citrus reticulata* B. yang merupakan salah satu jaringan meristematis. Menurut Khrisnamoorthy (1981), daerah meristematik relatif mengandung auksin, giberelin

dan sitokinin yang tinggi dan digunakan sebagai sumber eksplan karena sel yang membentuknya aktif membelah.

4.2 Struktur dan tekstur kalus

Pengamatan terhadap struktur dan tekstur kalus yang diamati pada 12 mst (akhir pengamatan) disajikan pada Tabel 1 berikut:

Tabel 1. Struktur dan tekstur kalus *Citrus reticulata* B. yang diberi perlakuan 2,4-D dan kinetin setelah 12 minggu

Perlakuan	Struktur dan Tekstur
a0b0 (1 ppm 2,4-D)	Remah, cokelat
a1b0 (2 ppm 2,4-D)	Kompak, kuning keputihan, ada bagian berwarna hijau
a2b0 (3 ppm 2,4-D)	Kompak, cokelat
a3b0 (4 ppm 2,4-D)	Sedikit remah, kuning kehijauan
a0b1 (1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)	Kompak, bernodul, kuning kehijauan
a0b2 (1 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)	Pembengkakan kiri-kanan, tidak terbentuk dari kalus, hijau
a0b3 (1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)	Kalus kompak, bernodul, kuning kecokelatan, terbentuk tunas
a0b4 (1 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)	Kompak, kuning keputihan
a1b1 (2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)	Kompak, sedikit bernodul, cokelat kekuningan
a1b2 (2 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)	Kompak, sedikit bernodul, cokelat kekuningan
a1b3 (2 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)	Kompak, sedikit bernodul, cokelat kekuningan
a1b4 (2 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)	Kompak, bernodul, cokelat kekuningan, ada yang seperti akar
a2b1 (3 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)	Kompak, cokelat kuning keputihan
a2b2 (3 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)	Kompak, bernodul, kuning keputihan
a2b3 (3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)	Kompak, bernodul, cokelat kekuningan
a2b4 (3 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)	Kompak, bernodul, cokelat kekuningan
a3b1 (4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)	Kompak, cokelat kekuningan
a3b2 (4 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)	Kompak, cokelat
a3b3 (4 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)	Kompak, bernodul, cokelat kehijauan
a3b4 (4 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)	Kompak, bernodul, cokelat keputihan

Dari Tabel 1 dapat dilihat struktur dan tekstur kalus yang didapatkan cukup bervariasi. Hal ini disebabkan pemberian kombinasi 2,4-D dan kinetin yang ditambahkan kedalam medium juga bervariasi. Beberapa perlakuan memperlihatkan struktur dan tekstur kalus yang kompak dan remah; bernodul dan tidak bernodul; ada yang membentuk akar dan/ tunas. Menurut Thomas dan Davey (1975), kalus yang dihasilkan dari proliferasi sel sangat bervariasi baik dalam kecepatan tumbuh, warna maupun teksturnya, ada yang bersifat remah dan kompak.

Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik, yang biasanya digunakan dalam konsentrasi rendah (Wattimena, 1988). Namun dari pengamatan yang dilakukan tidak terdapat satu perlakuan pun yang mampu menginduksi embrio somatik pada eksplan *Citrus reticulata* B. selama masa kultur 12 minggu. Diduga formula ZPT yang ditambahkan belum memadai untuk membentuk embrio somatik tapi telah mampu menginduksi kalus yang embriogenik. Kalus embriogenik merupakan kalus yang memiliki kemampuan untuk membentuk embrio somatik yang merupakan tujuan dari penelitian ini.

Pada perlakuan yang menggunakan zat pengatur tumbuh tunggal (2,4-D saja) (**Lamp. 2 Gamb. 1**) diperoleh kalus remah, kecokelatan pada perlakuan a0b0 (1 ppm 2,4-D). Pada perlakuan a1b0 (2 ppm 2,4-D) diperoleh kalus kompak, berwarna kekuningan dengan sdt bagian berwarna hijau. Diduga bagian berwarna hijau ini merupakan bakal organ yang sampai batas akhir pengamatan belum diketahui orientasinya. Pada perlakuan a2b0 (3 ppm 2,4-D) didapatkan kalus kompak, kecokelatan dan tidak bernodul. Perlakuan dengan 4 ppm 2,4-D (a3b0) memperlihatkan respon eksplan berwarna hijau diselimuti kalus remah kekuningan.

Dari gambar terlihat tidak ada perlakuan yang menunjukkan terbentuknya kalus embriogenik bila disesuaikan dengan pendapat Gunawan *et al* (1991) bahwa

secara visual kalus embriogenik itu bertekstur kompak dan bernodul. Diduga penggunaan auksin tunggal tanpa penambahan zat pengatur tumbuh lain seperti sitokinin menyebabkan tidak terbentuknya kalus embriogenik.

Penggunaan 2,4-D dalam suatu kultur mendorong sel untuk membentuk kalus (Dixon,1994). Hasil yang didapatkan hampir semua perlakuan mampu menghasilkan kalus. Namun perlakuan-perlakuan yang hanya menggunakan ZPT 2,4-D saja pada konsentrasi 1-4 ppm memperlihatkan respon kalus yang sama sekali berbeda satu sama lain, tidak menunjukkan peningkatan atau penurunan tingkat keremahan dan warna kalus sehingga sulit untuk memastikan pengaruh dari pemberian konsentrasi 2,4-D yang semakin meningkat.

Menurut George dan Sherrington (1984), secara teoritis kultur dapat dimulai dari setiap sel hidup, namun pada kenyataannya inisiasi dan aktifitas pertumbuhan dari jaringan yang mempunyai potensi untuk tumbuh aktif menjadi individu baru sangat bervariasi antara bagian yang satu dengan bagian yang lainnya dari suatu jaringan tersebut. Dalam hal ini faktor dalam dari tanaman tersebut mempunyai peranan yang besar.

Pada perlakuan yang menggunakan zat pengatur tumbuh kombinasi 1 ppm 2,4-D dan kinetin (**Lamp. 2 Gamb. 2**) seperti pada perlakuan a0b1(1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin) didapatkan struktur kalus kompak, sangat bernodul dan berwarna kuning kehijauan. Ciri ini sesuai dengan ciri kalus yang embriogenik. Diduga penambahan 1 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin (sitokinin endogen = 0,5 ppm lebih banyak dibanding auksin endogen) menyebabkan auksin dan sitokinin endogen dalam kondisi seimbang. Kemungkinan konsentrasi sitokinin endogen eksplan cukup besar karena eksplan yang digunakan berasal dari biji jeruk yang bersifat poliembrioni (dalam 1 biji terdapat lebih dari satu embrio). Embrio merupakan salah satu tempat dihasilkannya sitokinin alami selain akar dan buah.

Auksin dan sitokinin bekerjasama dalam proses embriogenesis somatik sehingga dalam kondisi intermediet mampu untuk membentuk kalus embriogenik. Sesuai pendapat Wattimena (1988), selain auksin, sitokinin juga berpengaruh terhadap diferensiasi sel dalam proses embriogenesis somatik.

Pada perlakuan a0b2 (1 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin) didapatkan kalus berbentuk gelondongan batang yang diawali pembengkakan kiri-kanan pada awal perkembangan eksplan. Setelah mengalami pembengkakan eksplan kemudian membentuk kalus di beberapa bagian. Menilik pendapat George dan Sherrington (1984), seharusnya dalam kondisi auksin dan sitokinin seimbang didapatkan kalus. Namun pada perlakuan ini tidak didapatkan kalus. Hal ini diduga pemberian auksin dan sitokinin yang seimbang pada konsentrasi 1 ppm justru meningkatkan sitokinin endogen sehingga berdiferensiasi membentuk primordiar batang. Menurut Hendaryono (1994), pemberian sitokinin dengan kadar yang relatif tinggi diferensiasi akan cenderung kearah pembentukan primordiar batang/ tunas.

Pada perlakuan a0b3 (1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin) sebagian membentuk kalus dan sebagian membentuk tunas. Tunas ini terbentuk dan berkembang dari kalus. Kalus dikatakan beregenerasi apabila kalus telah menumbuhkan tunas dan membentuk daun (Sutjahjo, Kadir dan Mariska, 2007). Diduga tingginya konsentrasi kinetin yang diberikan daripada konsentrasi 2,4-D memacu pembentukan tunas. Pernyataan Sudamaji (2003), bila konsentrasi sitokinin lebih besar daripada auksin maka tunas akan tumbuh. Umumnya pemakaian 1-2 mg/l sitokinin sudah mencukupi untuk multiplikasi tunas. Tingkat yang lebih tinggi cenderung mendorong pembentukan pucuk adventif (Dixon dan Gonzales, 1994).

Pada perlakuan a0b4 (1 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin) didapatkan kalus kompak, sedikit bernodul, berwarna kuning keputihan. Secara visual kalus pada perlakuan ini bisa digolongkan sebagai kalus embriogenik. Konsentrasi sitokinin

eksogen yang lebih besar pada perlakuan ini ternyata tidak memacu diferensiasi kearah pembentukan organ. Penambahan 2 ppm kinetin seharusnya mendorong terbentuknya pucuk adventif. Diperkirakan pembentukan pucuk adventif terjadi secara tidak langsung yaitu melalui pembentukan kalus yang akhirnya berdiferensiasi membentuk pucuk adventif. Pembentukan kalus ini dapat ditekan dengan mengatur zat pengatur tumbuh dalam medium (Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, 1991).

Semua perlakuan 1 ppm 2,4-D yang dikombinasikan dengan **kinetin (Lamp. 2 Gamb. 3)** menunjukkan respon kalus yang sama kecuali perlakuan a1b4 (2 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin) yang membentuk organ seperti akar berwarna kehijauan yang berkembang dari kalus disekitarnya. Padahal penambahan auksin dan sitokinin eksogen dalam kondisi intermediet pada eksplan yang diduga memiliki konsentrasi sitokinin endogen tinggi seharusnya memberikan respon hidup berupa tunas. Menurut Purnamaningsih (2008), kalus yang membentuk akar lebih cepat daripada tunas disebut kalus rhizogenik, yang kurang menguntungkan daripada tunas yang diperlukan tanaman untuk melakukan fotosintesis.

Meskipun auksin dan sitokinin eksogen yang ditambahkan dalam kondisi intermediet, namun belum tentu sama dengan ZPT endogen eksplan. Akar yang terbentuk dari perlakuan ini menunjukkan tingginya nisbah 2,4-D terhadap kinetin. Konsentrasi auksin yang tinggi akan merangsang pembentukan akar (Salisbury dan Ross, 1992). Diduga sel-sel kalus yang mula terbentuk pada eksplan memiliki kemampuan membentuk sendiri auksin alami sehingga meski 2,4-D dan kinetin yang diberikan dalam kondisi intermediet, kalus justru berdiferensiasi membentuk akar.

Sering terjadi bahwa walaupun kalus itu berasal dari eksplan yang sama ada sekelompok sel yang dapat menghasilkan auksin endogen yang cukup untuk sel itu sendiri atau auksin didalam media itu dapat mendorong sel-sel tersebut untuk

memproduksi auksin (IAA) itu sendiri. Kemampuan sel-sel itu untuk memproduksi auksin IAA secara otonom disebut dengan istilah auksin habituasi (Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, 1991).

Pada perlakuan a1b1 (2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin), a1b2 (2 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin) dan a1b3 (2 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin) didapatkan struktur kalus embriogenik dengan tekstur kalus kompak, bernodul, berwarna coklat kekuningan. Diduga konsentrasi auksin eksogen yang lebih tinggi daripada sitokinin eksogen menyeimbangkan ZPT endogen eksplan sehingga mampu membentuk kalus yang embriogenik. Menurut Pierik (1987), ZPT eksogen mempengaruhi kerja ZPT endogen sehingga pada tingkat tertentu mampu memicu pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

Pembentukan kalus dari tanaman dikotil tetap memerlukan sitokinin disamping auksin yang tinggi. Pada tanaman monokotil pembentukan kalus hanya membutuhkan auksin yang tinggi tanpa sitokinin (Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, 1991).

Pada perlakuan 3 ppm 2,4-D yang dikombinasikan dengan kinetin (**Lamp. 2 Gamb. 4**), pada kombinasi dengan 0,5 ppm (a2b1) didapatkan struktur kalus non-embriogenik dengan tekstur kalus kompak, berwarna coklat kuning keputihan. Pada perlakuan a2b2 (3 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin), a2b3 (3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin) dan a2b4 (3 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin) didapatkan struktur kalus embriogenik dengan tekstur kalus kompak, bernodul berwarna coklat kekuningan.

Perlakuan 4 ppm 2,4-D yang dikombinasikan dengan kinetin (**Lamp. 2 Gamb. 5**) pada konsentrasi 0,5 ppm kinetin (a3b1) dan 1 ppm kinetin (a3b2) didapatkan struktur kalus non-embriogenik dengan tekstur kalus kompak berwarna coklat kekuningan dan coklat. Pada perlakuan a3b3 (4 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin) dan a3b4 (4 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin) didapatkan struktur kalus

embriogenik dengan tekstur kalus kompak, bernodul berwarna coklat kehijauan dan coklat kekuningan.

Dari kedua kelompok perlakuan 3 ppm 2,4-D dan 4 ppm 2,4-D yang dikombinasikan dengan beberapa tingkatan konsentrasi kinetin didapatkan respon tumbuh berupa kalus yang secara visual mirip. Diduga penambahan konsentrasi 3-4 ppm 2,4-D masih dalam batas yang seimbang saat dikombinasikan dengan konsentrasi yang rendah dari kinetin. Walaupun auksin berperan utama dalam menginduksi kalus, tapi pada beberapa tanaman sitokinin sangat dibutuhkan untuk proliferasi kalus (Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, 1991).

Umumnya kalus yang didapatkan berstruktur kompak, berwarna kecoklatan, ada yang bernodul dan tidak. Secara teoritis ketiga ciri ini menentukan embriogenik atau tidaknya kalus tersebut. Hasil yang didapatkan memperlihatkan adanya pengaruh ZPT eksogen yang ditambahkan terhadap sifat embriogenik dari kalus. Karena semakin tinggi konsentrasi kinetin yang diberikan, kalus yang dihasilkan semakin embriogenik. Menurut Sukmadjaja (2005), induksi embrio somatik pada medium padat dengan penambahan sitokinin dapat meningkatkan proliferasi kalus embriogenik. Hal ini membuktikan kombinasi auksin dan sitokinin dalam jumlah yang tepat dapat menginduksi kalus embriogenik pada eksplan *Citrus reticulata* B.

Keberhasilan kalus untuk bersifat embriogenik ditentukan oleh kemampuan morfogenetik eksplan yang dikulturkan. Sel atau jaringan yang mempunyai kemampuan (kompeten) untuk menjadi sel embriogenik akan mampu membentuk kalus embriogenik. Ekspresi dari sel kompeten ini bergantung pada kesesuaian medium yang digunakan, jenis zat pengatur tumbuh maupun konsentrasinya yang tepat (Gunawan *et al.*, 1991).

4.3 Berat basah Eksplan

Hasil penghitungan rata-rata berat basah eksplan dari setiap perlakuan setelah 12 mst disajikan pada Tabel 2 berikut:

Tabel 2. Rata-rata berat basah eksplan *Citrus reticulata* B. yang diberi perlakuan 2,4-D dan kinetin setelah 12 minggu

Perlakuan	a ₀	a ₁	a ₂	a ₃	Rata-rata
b ₀	0,64 ^f	0,67 ^e	0,62 ^g	0,64 ^f	0,64 ⁱⁱ
b ₁	0,95 ^b	0,68 ^e	0,63 ^g	0,59 ^h	0,71 ⁱⁱ
b ₂	0,64 ^f	0,67 ^e	0,67 ^e	0,67 ^e	0,66 ⁱⁱ
b ₃	0,97 ^a	0,7 ^e	0,8 ^d	0,83 ^d	0,83 ⁱ
b ₄	0,98 ^a	0,89 ^c	0,87 ^c	0,62 ^g	0,84 ⁱ
Rata-rata	0,84 ^A	0,72 ^B	0,72 ^B	0,67 ^B	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji DNMRT taraf 5%

Dari tabel diatas dapat dilihat rata-rata berat basah eksplan tertinggi didapatkan pada perlakuan a0b4 (1 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin) yaitu 0,98 g dan rata-rata berat basah eksplan terendah diperoleh pada perlakuan a3b1 (4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin) yaitu 0,59 g. Untuk mengetahui faktor mana diantara kedua ZPT yang ditambahkan dalam medium yang mempengaruhi tinggi rendahnya berat basah eksplan dilakukan uji statistik untuk akurasi data dan mempermudah mengambil kesimpulan.

Hasil uji analisis terhadap parameter berat basah eksplan *Citrus reticulata* B. (Lampiran 3) menunjukkan adanya pengaruh tunggal dan pengaruh interaksi dari 2,4-D dan kinetin terhadap rata-rata berat basah eksplan yang didapatkan. Diduga kisaran tingkatan konsentrasi yang diberikan cukup besar menyebabkan berat basah kalus yang didapatkan berbeda pada semua faktor. Uji lanjut DNMRT taraf 5% dilakukan untuk mengetahui perlakuan mana yang rata-ratanya berbeda satu sama lain.

Dari tabel diatas dapat dilihat adanya penurunan rata-rata berat basah eksplan saat konsentrasi dari 2,4-D dinaikan dari 1 ppm (a0) menjadi 2 ppm (a1). Ketika

konsentrasi 2,4-D ditingkatkan menjadi 3 ppm (a2) dan 4 ppm (a3) tidak didapatkan efek berat basah eksplan terus menurun. Diduga penambahan 2,4-D kedalam medium sampai konsentrasi 2 ppm menurunkan rata-rata berat basah kalus namun tidak memberikan efek yang sama ketika konsentrasi 2,4-D ditingkatkan menjadi 3 ppm dan 4 ppm.

Husen, Wardiyati dan Sitompul (2000) menyatakan bahwa penggunaan 2,4-D dalam medium berpengaruh negatif terhadap proliferasi kalus. Dalam penelitian ini parameter yang dihitung adalah berat basah eksplan keseluruhan sehingga pernyataan diatas tidak sepenuhnya tepat diterapkan untuk membuktikan efek tunggal 2,4-D terhadap rata-rata berat basah eksplan. Umumnya auksin digunakan untuk menginduksi kalus dari suatu eksplan dikombinasikan dengan sitokinin, namun bila nisbah auksin terhadap sitokinin lebih tinggi/ lebih rendah eksplan akan membentuk organ akar/ tunas. Biasanya bila ditimbang berat basah eksplan berupa akar/ tunas lebih tinggi daripada kalus sehingga sesuai dengan hasil yang didapat berat basah eksplan tertinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi 2,4-D rendah (a0) dan berat basah eksplan terendah didapatkan pada perlakuan konsentrasi 2,4-D tinggi (a3).

Dari tabel juga dapat dilihat peningkatan rata-rata berat basah eksplan berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi kinetin. Semakin tinggi konsentrasi kinetin yang diberikan, rata-rata berat basah eksplan juga semakin tinggi. Rata-rata berat basah eksplan terendah didapatkan pada perlakuan dengan pemberian kinetin 1 ppm (b2) yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan 0,5 ppm (b1) dan 0 ppm (b0). Saat konsentrasi kinetin dinaikan sampai konsentrasi kinetin 1,5 ppm (b3) yang tidak berbeda nyata dengan pemberian kinetin 2 ppm (b4), rata-rata berat basah eksplan bertambah. Jadi dapat disimpulkan peningkatan konsentrasi kinetin yang diberikan meningkatkan rata-rata berat basah eksplan karena sitokinin dalam konsentrasi lebih

kecil dikombinasikan dengan 2,4-D akan memacu proliferasi kalus. Menurut Hendaryono (1994), pengaruh sitokinin terutama dalam pembelahan sel.

Dari tabel juga dapat dilihat efek bersama 2,4-D dan kinetin terhadap rata-rata berat basah eksplan *Citrus reticulata* B.. Rata-rata berat basah eksplan tertinggi didapatkan pada perlakuan a0b4 (1 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin) yang tidak berbeda nyata dengan a0b3 (1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin). Berturut-turut diikuti perlakuan a0b1 (1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin) yang berbeda nyata dengan a1b4 (2 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin). a1b4 tidak berbeda nyata dengan a2b4 (3 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin) namun berbeda nyata dengan a3b3 (4 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin) dan a2b3 (3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin). Berikutnya perlakuan a1b3 (2 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin) yang tidak berbeda nyata dengan a1b1 (2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin), a1b0 (2 ppm 2,4-D), a1b2 (2 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin), a2b2 (3 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin) dan a3b2 (4 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin) namun berbeda nyata dengan a3b0 (4 ppm 2,4-D), a0b2 (1 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin) dan a0b0 (1 ppm 2,4-D). Selanjutnya perlakuan a2b1 (3 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin) tidak berbeda nyata dengan a2b1 (3 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin), a3b4 (4 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin), a2b0 (3 ppm 2,4-D) yang berbeda nyata dengan a3b1 (4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin) yang merupakan rata-rata berat basah eksplan terendah.

Dari hasil yang didapat terlihat pengaruh interaksi kedua faktor terhadap rata-rata berat basah eksplan mempertegas pengaruh tunggal masing-masing faktor. Rata-rata berat basah eksplan tertinggi didapatkan pada perlakuan dengan penambahan 2,4-D konsentrasi rendah dan kinetin dengan konsentrasi tinggi. Sebaliknya rata-rata berat basah eksplan terendah didapatkan pada perlakuan dengan penambahan 2,4-D konsentrasi tinggi dan kinetin dengan konsentrasi rendah. Pada perlakuan dengan hanya menggunakan ZPT tunggal 2,4-D juga didapatkan rata-rata berat basah eksplan yang rendah.

4.4 Persentase eksplan yang membentuk embrio somatik

Dari hasil yang didapatkan dapat dilihat bahwa tidak ada eksplan hasil penelitian ini yang membentuk embrio somatik. Diduga penggunaan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan belum mampu membentuk embrio somatik. Hal lain yang mungkin menyebabkannya ialah karena saat subkultur pertama eksplan langsung dipindahkan kedalam medium tanpa penambahan 2,4-D dan kinetin (MS 0) sehingga diduga pemberian ZPT eksogen belum maksimal.

Menurut Bhozwani dan Razdan (1983), keberhasilan pembentukan embriogenesis somatik sangat dipengaruhi oleh media tumbuh dan konsentrasi zat pengatur tumbuh. Oktavia dkk (2003) menyatakan, setiap jaringan mempunyai respon yang berbeda dalam penyerapan ZPT dalam medium dan memiliki kandungan ZPT endogen yang berbeda. Oleh karena itu dalam embriogenesis somatik kadang-kadang hanya dibutuhkan auksin, sitokinin secara sendiri-sendiri atau campuran auksin dan sitokinin.

4.5 Respon kalus embriogenik dan organ yang terbentuk

Respon kalus embriogenik dan organ yang terbentuk pada setiap perlakuan yang diamati setelah 12 mst disajikan pada Tabel 3 berikut:

Tabel 3. Respon kalus embriogenik dan organ yang terbentuk pada eksplan *Citrus reticulata* B. yang diberi perlakuan 2,4-D dan kinetin setelah 12 minggu

Perlakuan	Respon kalus dan organ yang terbentuk
a0b0 (1 ppm 2,4-D)	Kalus non-embriogenik
a1b0 (2 ppm 2,4-D)	Kalus non-embriogenik
a2b0 (3 ppm 2,4-D)	Kalus non-embriogenik
a3b0 (4 ppm 2,4-D)	Kalus non-embriogenik
a0b1 (1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)	Kalus embriogenik

a0b2 (1 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)	Primordiar batang
a0b3 (1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)	Kalus + tunas
a0b4 (1 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)	Kalus embriogenik
a1b1 (2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)	Kalus embriogenik
a1b2 (2 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)	Kalus embriogenik
a1b3 (2 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)	Kalus embriogenik
a1b4 (2 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)	Kalus + akar
a2b1 (3 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)	Kalus non-embriogenik
a2b2 (3 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)	Kalus embriogenik
a2b3 (3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)	Kalus embriogenik
a2b4 (3 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)	Kalus embriogenik
a3b1 (4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)	Kalus non-embriogenik
a3b2 (4 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin) *	Kalus non-embriogenik
a3b3 (4 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)	Kalus embriogenik
a3b4 (4 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)	Kalus embriogenik

Dari tabel diatas dapat dilihat variasi hasil yang didapatkan dengan bervariasinya perlakuan yang diberikan. Menurut Yelnitis dan Barwawie (2000), 2,4-D merupakan salah satu auksin yang aktif yang sering digunakan untuk induksi kalus dari berbagai jaringan tanaman dan juga efektif dalam menginduksi kalus embriogenik dibanding NAA dan IBA atau auksin lainnya. Namun berdasarkan Tabel 3 diatas terlihat bahwa pada perlakuan dengan penambahan konsentrasi 2,4-D tunggal belum dapat menginduksi baik embrio somatik maupun kalus embriogenik.

Pada perlakuan dengan kombinasi 2,4-D dan kinetin dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi kinetin yang diberikan pada setiap konsentrasi 2,4-D, semakin besar kemungkinan terbentuk kalus yang embriogenik. Hal ini berarti terjadi perimbangan antara ZPT eksogen dan ZPT endogen sehingga sampai batas

konsentrasi 4 ppm 2,4-D dan 2 ppm kinetin telah cukup untuk mendapatkan kalus yang embriogenik, meskipun belum cukup untuk membentuk embrio somatik.

Dalam rentang konsentrasi tersebut kadang-kadang juga didapatkan organ seperti akar dan tunas. Hal ini sangat dipengaruhi oleh konsentrasi ZPT yang diberikan dan ZPT endogen pada eksplan. Sesuai pernyataan Wattimena (1992), pertumbuhan dan organogenesis secara *in-vitro* sangat tergantung pada interaksi antara ZPT endogenous dengan ZPT yang sama yang ditumbuhkan kedalam medium. ZPT yang paling efektif dan kombinasinya yang tepat juga tergantung pada medium yang dipilih.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan tentang induksi embrio somatik dari *Citrus reticulata* B. dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dapat diambil kesimpulan bahwa penambahan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh sampai batas 4 ppm 2,4-D dan 2 ppm kinetin pada 12 mst belum berhasil menginduksi embrio somatik pada *Citrus reticulata* B., namun mampu menghasilkan kalus embriogenik dan pembentukan organ.

5.2 Saran

Untuk mendapatkan embrio somatik pada tanaman *Citrus reticulata* B. pada penelitian selanjutnya disarankan agar konsentrasi kombinasi 2,4-D dan kinetin ditingkatkan dan masa kultur diperpanjang.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1995. *Dasar-Dasar Pengetahuan tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Angkasa Bandung
- Backer, C.A. and Bakhhuizen v.d. Brink, R.C. (1965). *Flora of Java, Vol. II*. N.V.P, Noordhoff, Groningen
- Bakti, C. GA Wattimena dan Witjaksono. 2005. *Embriogenesis Somatik Jahe pada Berbagai Zat Pengatur Tumbuh (Zingiber officinale Rosc.)*. Puslit LIPI. Bogor
- Bhojwani, S. S and M. K Razdan. 1983. *Plant Tissue Culture Theory and Practices*. Elvisier Science Publishing Company Inc. New York
- Chin, H. F and E. H Robert. 1980. *Recalcitrant Crop Seed*. Tropical Press. Kuala Lumpur
- Collin, H. A. dan S. Edwards. 1998. *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers Ltd. Guildford, UK
- Daisy, P., S. Hendaryono, A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Kanisius. Yogyakarta
- Devlin, R. M. 1975. *Plant Physiology 3rd Edition*. D. Van Nostran Company. New York
- Dixon, R. A. and R. A. Gonzales. 1994. *Plant Cell Culture A Practical Approach 2th ed.* Oxford University Press. New York
- Edy, Akari dan Pujisiswanto, Hidayat. 2008. *Pengaruh 2,4-D terhadap Induksi Embrio Somatik Eksplan Leaflet Pada Beberapa Varietas Kacang Tanah (Arachis hipogea) Secara In Vitro*. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi II 2008 Universitas Lampung, 17-18 November 2008
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Handbook and Directory of Commercial Laboratories
- Gunawan, L. W. 1987. *Teknik Kultur Jaringan*. IPB. Bogor
- Gunawan, L. W, N. A Mattjik, E. Sjamsudin, N.M.A Wiendi dan A. Ernawati. 1991. *Bioteknologi Tanaman*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB. Bogor
- Gunawan, L.W. 1995. *Teknik Kultur In vitro dalam Holtikultura*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Hatimah, W. 2002. *Pertumbuhan Nuselus Jeruk Kacang (Citrus nobilis L.) pada beberapa konsentrasi NAA dan BAP*. Jurnal Stigma. VIII (1) ; 8 – 11
- Hendaryono, D.P.S dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan. Perbanyakan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman secara Vegetatif*. Kanisius. Yogyakarta
- Hendaryono, D. 2000. *Pembibitan tanaman Anggrek dalam Botol*. Kanisius. Jakarta

- Husen, S.T, S.M Wardiyati dan Sitompul, 2000. *Induksi Embriogenesis Somatik pada Eksplan Kotiledon Mangga (Mangifera indica L.)*. Jurnal Stigma and Agricultural Science Vol. 8 No. 1 Januari-Maret 2004
- Ibrahim, M.S.D, N.N Kristina dan N. Bermawie. 2004. *Studi Pendahuluan: Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Daun Echinaceae purpurea*, Buletin TRO Vol. XV No. 2, 2004
- Imron R. dan Tirtoboma. 2004. *Pengaruh 2,4-D terhadap induksi embrio somatik kopi arabika* Buletin Plasma Nutfah Vol. 10 No. 2 Th. 2004. Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia: Bogor
- Krishnamoorthy. 1981. *Plant Growth Substances*. Application dan Agriculture. Tata MC. Graw Hill Book Co. New York
- Lima, E. C., R. Paiva, R. C. Nogueira, F. P. Soares, E. B. Emrich, A. A. N. Silva. 2008. *Callus Induction in Leaf Segments of Croton Urucurana Baill* Cienc. Agrotec Lavras. 32 (1) : 17-22
- Litz, R.E. dan D.J. Gray. 1995. *Somatic Embryogenesis for Agricultural Improvement*. World Journal Microbiology and Biotechnology. 11:416-425.
- Mariska, I. 1996. *Embriogenesis somatik tanaman kehutanan*. Prosiding Kursus Bioteknologi, 4-9 November 1996. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Serpong. 13 hlm.
- Mukhtar R., Khan M.M., Fatima B., Abbas M., dan Shahid A. 2005. *In Vitro Regeneration and Multiple Shoots Induction in Citrus reticulata (Blanco)* International Journal Of Agriculture & Biology 1560-8530/2005/07-3-414-416 <http://www.ijab.org>. Institute of Horticultural Sciences, University of Agriculture. Faisalabad
- Muryati. 2005. *Pengelolaan Terpadu Kebun Jeruk Sehat*. Buku Panduan Teknis. Balai Penelitian Tanaman Buah, Solok. 34 hlm
- Novializa. 2005. *Kultur Biji Jeruk Kacang (Citrus reticulata B.) secara in-vitro pada Medium MS dengan Penambahan IAA, 2,4-D dan Kinetin*. Universitas Andalas. Padang
- Nasir, M. 2002. *Bioteknologi Potensi dan Keberhasilan dalam Bidang Pertanian*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta
- Neliyati. 1996. *Perbanyak secara In Vitro Anggrek Phalaenopsis Hibrida Menggunakan eksplan Ruas Tangkai Bunga dan Daun*. Tesis Pasca Sarjana IPB
- Neuenschwander, B. and T. W. Baumann. 1992. *A novel type of somatic embryogenesis in Coffea Arabica*. Plant Cell Rep. 10:608-612
- Nuryadin, Andi. 2009. *Mengenal Teknologi Somatik Embriogenesis pada Kakao*. Puslit-Koka. Jember

- Oktavia, F., A. V dan I. Roostika. 2008. *Prospek Pengembangan Benih Sintetik di Indonesia*. Buletin Agribio. Jurnal Tinjauan Ilmiah Riset Biologi dan Bioteknologi Pertanian. Vol. 6 No. 2, 2004
- Pierik, R. L. M. 1987. *In-vitro Culture of Higher Plants*. Martius Nijhoff Publisher, Dordrecht
- Purbiati, T. Arry Supriyanto dan Yati. 2001. *Kompatibilitas Batang Atas dan Batang Bawah pada Penyambungan Tunas Pucuk (ptp) Jeruk (Citrus sp.) Secara in vitro*. IPPTP Tlekung Batu Malang
- Purnamaningsih, R. 2008. *Regenerasi Tanaman Sedap Malam melalui Organogenesis dan Embriogenesis Somatik*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian
- Rahardi., Yovita H. Indriani & Haryono. 1999. *Agribisnis Tanaman Buah*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Rahardja, P. C. 1991. *Kultur Jaringan Teknik Perbanyakan Tanaman secara modern*. Penebar Swadaya Anggota IKAPI. Jakarta
- Salisbury F. B. dan C. W. Ross. 1992. *Fisiologi Tumbuhan jilid III*. ITB. Bandung
- Sandra, E. 2003. *Kultur Jaringan Anggrek Skala Rumah Tangga*. Agromedia Pustaka. Bandung
- Sitinjak, R.R., O. Rostiana, Karyono dan T. Supriatun. 2006. Pengaruh 2,4-D dan BA terhadap Induksi Kalus Embriogenik pada Kultur Meristem Jahe (*Zingiber officinale* Rose). Jurnal Ilmiah Nasional Berita Biologi Vol. 8, No. 2, Agustus 2006
- Sudarmadji. 2003. *Penggunaan Benzil Amino Purine pada Pertumbuhan Kalus Kapas secara in-vitro*. Buletin Teknik Pertanian Vol. 8 No. 1
- Sukmadjaja, D. 2005. *Embriogenesis Somatik Langsung pada Tanaman Cendana*. Jurnal Bioteknologi Pertanian Vol. 10 No. 1
- Sumaryono., Imron Riyadi, Pauline D. Kasi & Gale Ginting. 2007. *Pertumbuhan dan Perkembangan Kalus Embriogenik dan Embrio Somatik Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.) pada Sistem Perendaman Sesaat* Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia. Bogor
- Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan Tanaman Secara In Vitro*. Kanisius. Yogyakarta.
- Sutjahjo, S., A. Kadir, I. Mariska. 2007. *Efektivitas PEG sebagai Bahan Penyeleksi Kalus Nilam yang di Radiasi Sinar Gamma untuk Toleransi terhadap Cekaman Kekeringan*. Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia. 9 (1) : 48-57
- Thomas, E. and M. R. Davey. 1975. *From Single Cell to Plants*. Wykeham Publication. London
- Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. 1991. *Bioteknologi Tanaman*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor

- Utami, E. S. W., I. Sumardi, Taryono, E. Semiarti. 2007. *Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan (Phalaenopsis amabilis L.)* bl: Struktur dan Pola Perkembangan. Berk. Penel. Hayati: 13 (33-38), 2007
- Verheij, E. W. M and Coronel, R. E (editor). 1997. *Sumber Daya Nabati Asia Tenggara 2: Buah-buahan yang dapat dimakan*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Wattimena, G. A. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh*. PAU IPB. Bogor
- Wattimena, G. A., L. W. Mantjik, T. Samsudin, N. M. A Wiendi dan Ernawati. 1991. *Bioteknologi Tanaman*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor
- Wattimena, G. A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan IPB. Bogor
- Wetherel. 1982. *Pengantar Propagasi Tanaman secara In-vitro*. IKIP Semarang Press
- Widarto, L. 1996. *Perbanyakan Tanaman dengan Biji, Stek, Cangkok, Ovulasi dan Kultur Jaringan*. Kanisius. Yogyakarta
- Wiendi, N. M. A, Wattimena, G. A dan Gunawan L. W. 1991. *Bioteknologi Tanaman : Perbanyakan Tanaman*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor
- Williams, E.G. and Maheswara. 1986. *Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cells as on embryogenic group*. Ann. Bot. 57: 443-462.
- Wulandari, S. Wan Syafii dan Yossilia. 2004. *Respon Eksplan Daun Tanaman Jeruk Manis (Citrus Sinensis L.) secara In Vitro akibat Pemberian NAA dan BA*. *Jurnal Biogenesis* Vol. 1(1):21-25, 2004 © Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Riau
- Yelnitis dan N. Barwawie. 2000. *Perbanyakan Tanaman Tangguh (Pettiveria alliacea) melalui Embriogenesis Somatik*. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Pengembangan Bioteknologi III. Cibinong. 429-434
- Yusnita, 2003. *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Agromedia Pustaka. Jakarta

LAMPIRAN

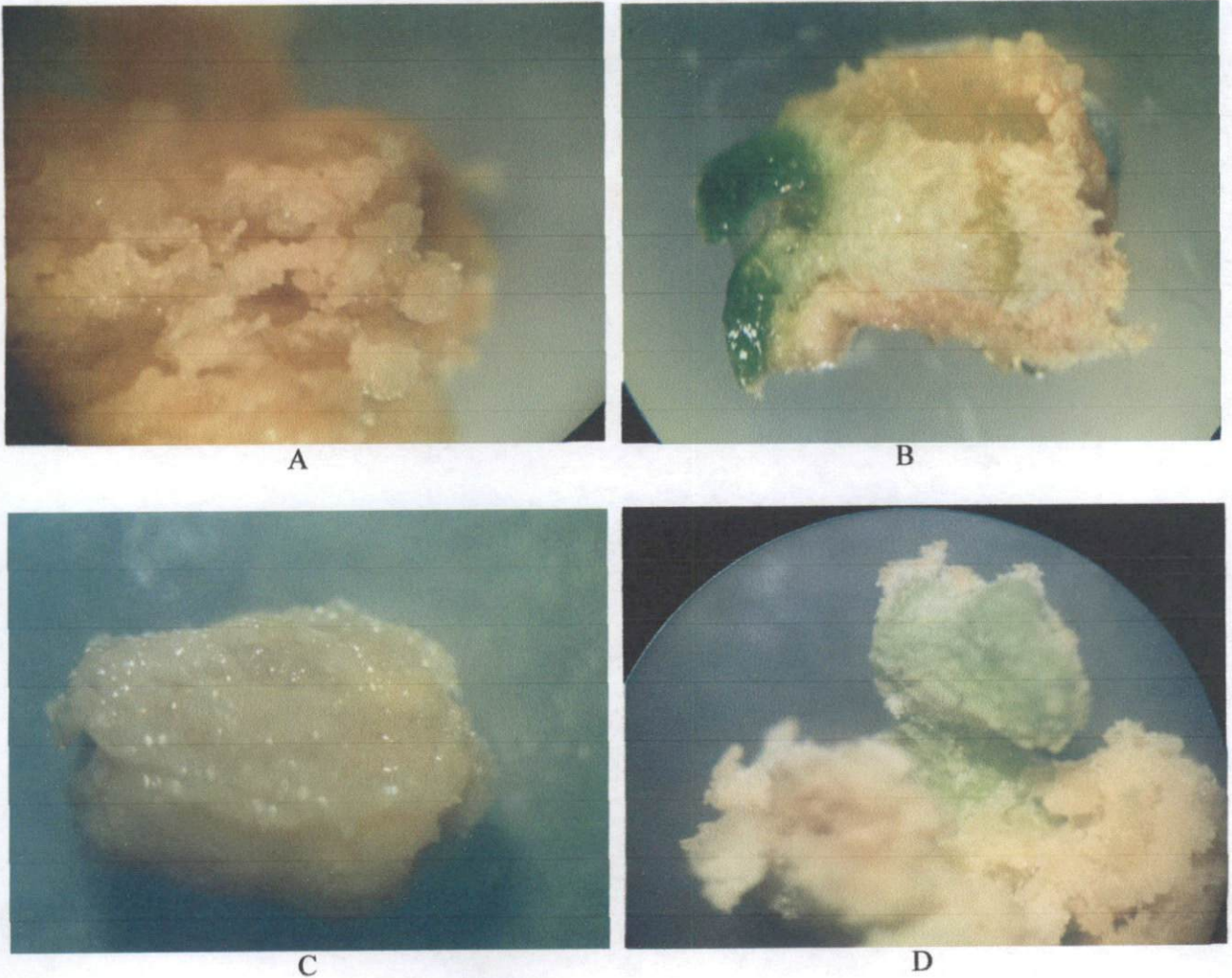
Lampiran 1. Komposisi dasar medium Murashige-Skoog (MS) C. I. Franklin dan R. A Dixon dalam R. A Dixon and R. A Gonzales (1994)

No.	Komponen	Jumlah (mg/l)
1	Larutan stok I (hara makro)	
	NH ₄ NO ₃	1650,00
	KNO ₃	1900,00
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00
	KH ₂ PO ₄	170,00
2	Larutan stok II (hara mikro)	
	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
3	Larutan stok III (FeNa-EDTA)	
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30
4	Larutan stok IV (vitamin)	
	Nicotinic acid	0,50
	Pyridoksin HCl	0,50
	Thiamin HCl	0,10
	Glycic	2,00
5	Myo-inositol	100,00
6	Sukrosa	30 gr
7	Agar	7 gr
8	Ph	5,5 - 6,0

Lampiran 2. Gambar hasil pengamatan kalus *Citrus reticulata* B. dengan penambahan beberapa konsentrasi 2,4-D dan kinetin

GAMBAR 1

Hasil pengamatan kalus *Citrus reticulata* B. yang diberi perlakuan ZPT tunggal (2,4-D)



Keterangan : A. Kalus pada perlakuan a0b0 (1 ppm 2,4-D)

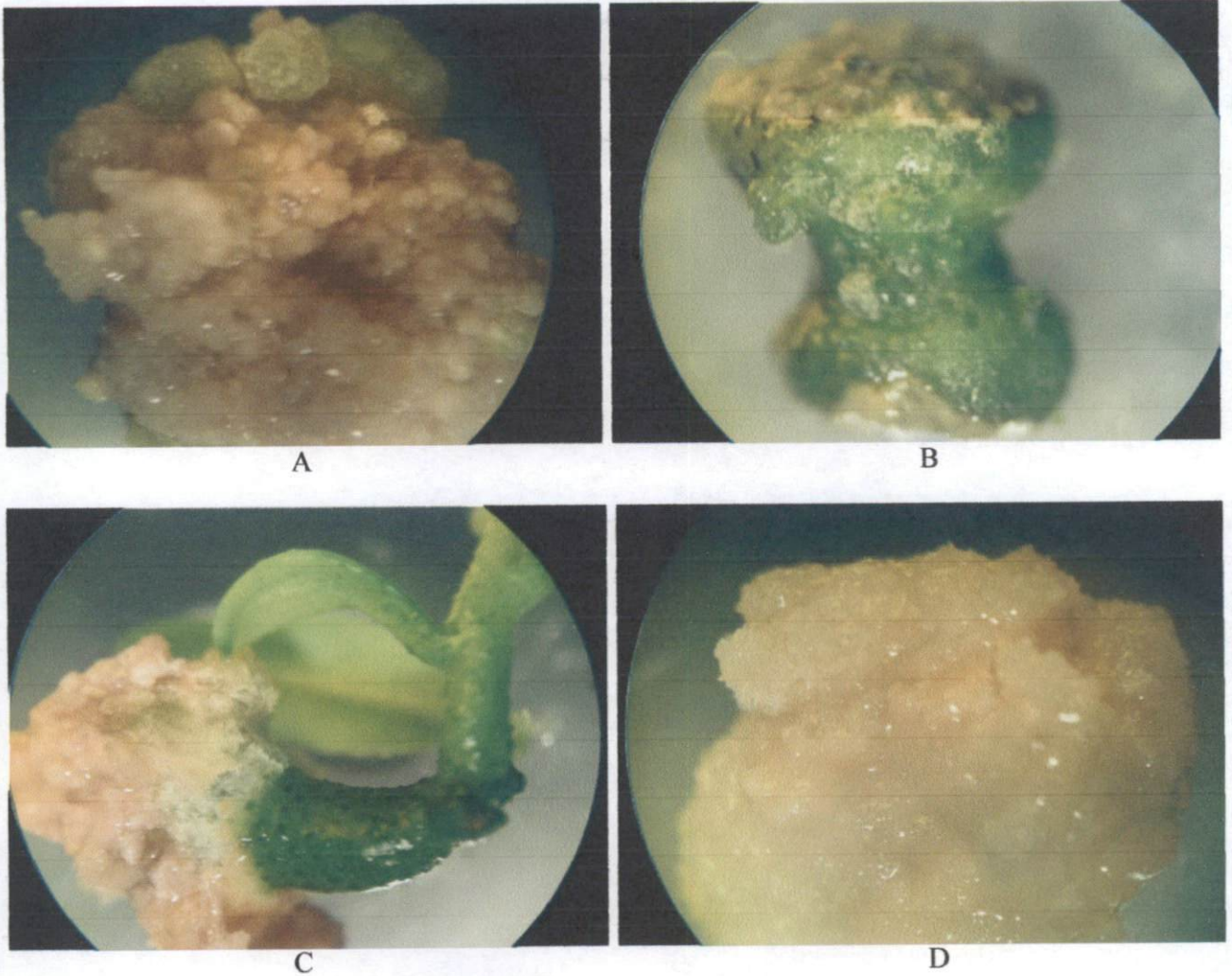
B. Kalus pada perlakuan a1b0 (2 ppm 2,4-D)

C. Kalus pada perlakuan a2b0 (3 ppm 2,4-D)

D. Kalus pada perlakuan a3b0 (4 ppm 2,4-D)

GAMBAR 2

Hasil pengamatan kalus *Citrus reticulata* B. yang diberi perlakuan 1 ppm 2,4-D dikombinasikan dengan kinetin



Keterangan : A. Kalus pada perlakuan a0b1 (1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)

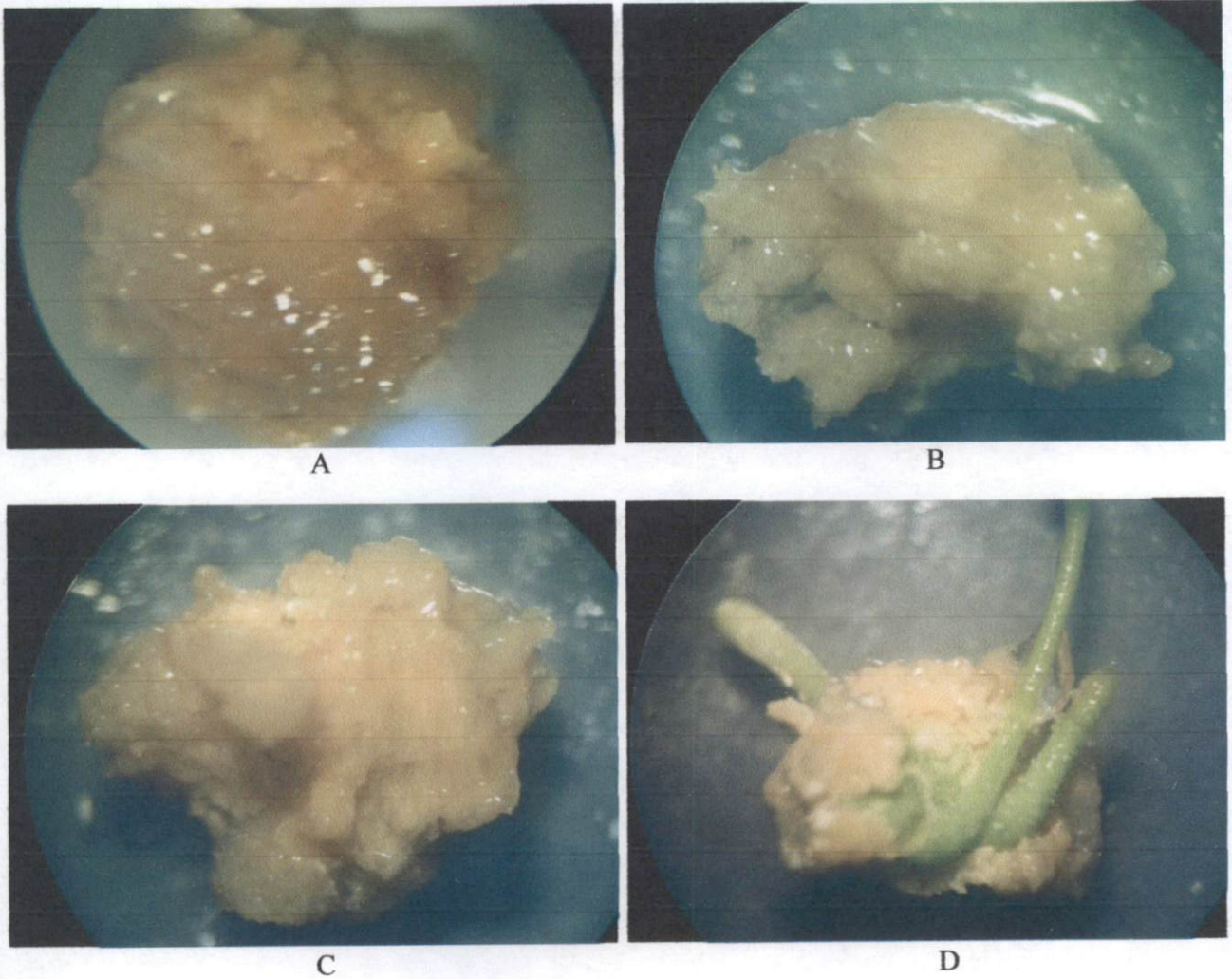
B. Kalus pada perlakuan a0b2 (1 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)

C. Kalus pada perlakuan a0b3 (1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)

D. Kalus pada perlakuan a0b4 (1 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)

GAMBAR 3

Hasil pengamatan kalus *Citrus reticulata* B. yang diberi perlakuan 2 ppm 2,4-D dikombinasikan dengan kinetin



Keterangan : A. Kalus pada perlakuan a1b1 (2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)

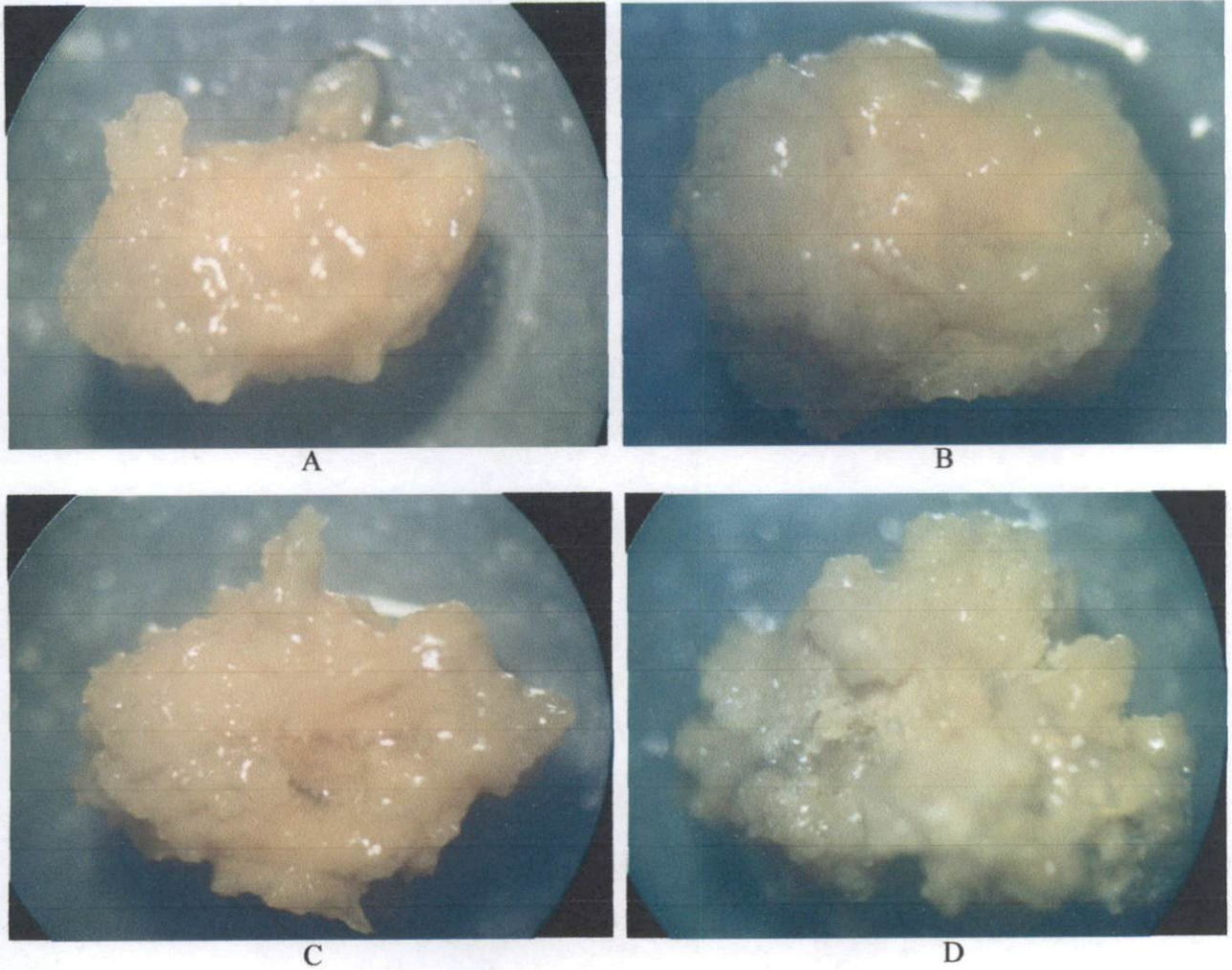
B. Kalus pada perlakuan a1b2 (2 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)

C. Kalus pada perlakuan a1b3 (2 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)

D. Kalus pada perlakuan a1b4 (2 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)

GAMBAR 4

Hasil pengamatan kalus *Citrus reticulata* B. yang diberi perlakuan 3 ppm 2,4-D dikombinasikan dengan kinetin



Keterangan : A. Kalus pada perlakuan a2b1 (3 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)

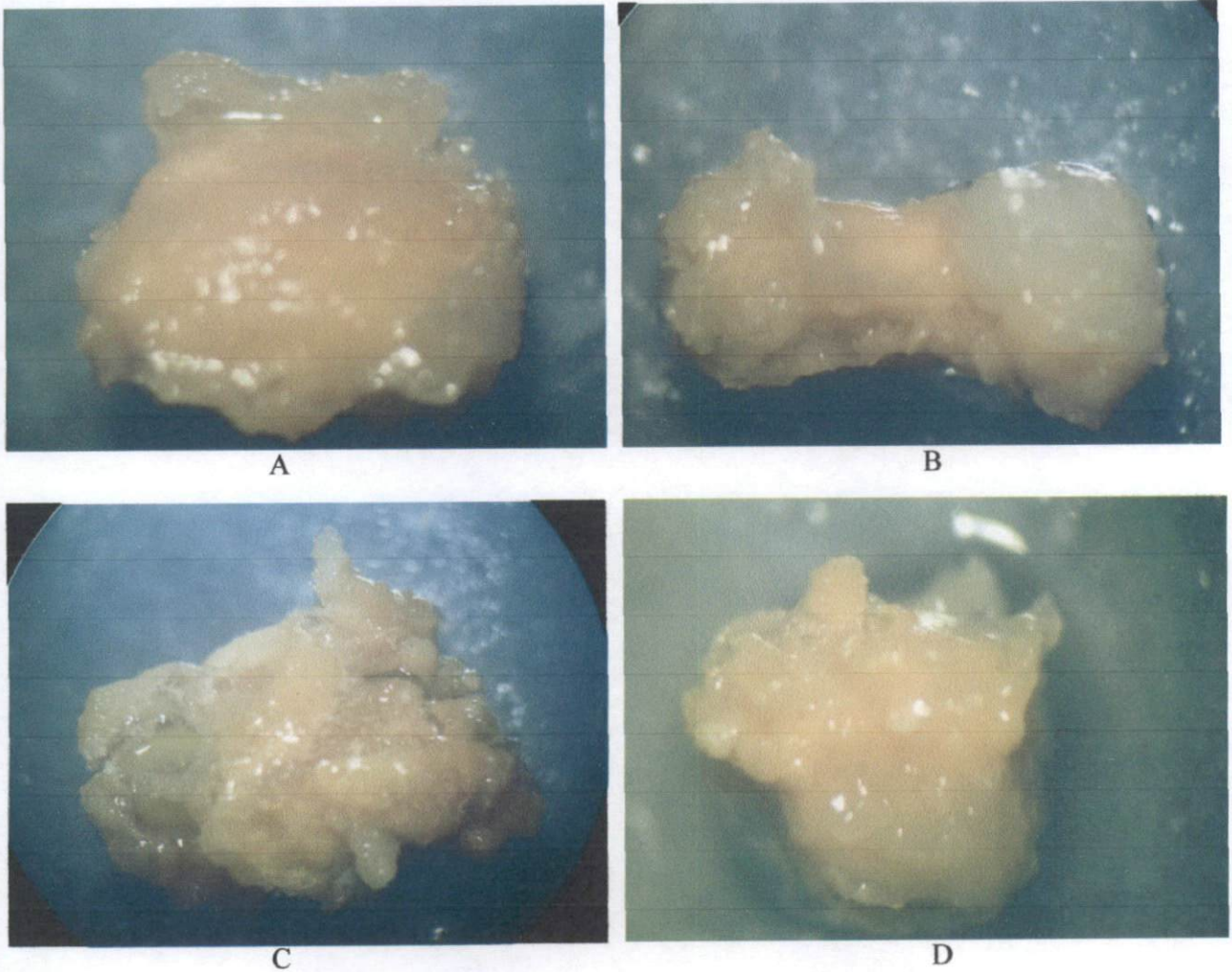
B. Kalus pada perlakuan a2b2 (3 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)

C. Kalus pada perlakuan a2b3(3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)

D. Kalus pada perlakuan a2b4 (3 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)

GAMBAR 5

Hasil pengamatan kalus *Citrus reticulata* B. yang diberi perlakuan 4 ppm 2,4-D dikombinasikan dengan kinetin



Keterangan : A. Kalus pada perlakuan a3b1(4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin)

B. Kalus pada perlakuan a3b2 (4 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin)

C. Kalus pada perlakuan a3b3(4 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin)

D. Kalus pada perlakuan a3b4 (4 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin)

Lampiran 3. Data analisa statistik berat basah kalus *Citrus reticulata* B.yang diberi perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin

a. Analisis statistik berat basah kalus *Citrus reticulata* B.yang diberi perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin sebelum transformasi

Perlakuan	2,4-D			
Kinetin	a0	a1	a2	a3
b0 1	0,021	0,0162	0,011	0,0376
2	0,018	0,0455	0,0186	0,0088
X	0,0195	0,0309	0,0148	0,0232
b1 1	0,2	0,0342	0,0136	0,007
2	0,192	0,0287	0,021	0,0086
X	0,196	0,03145	0,0173	0,0078
b2 1	0,0214	0,0333	0,023	0,0422
2	0,0145	0,0266	0,0357	0,0144
X	0,01795	0,02995	0,02935	0,0283
b3 1	0,357	0,056	0,1618	0,0936
2	0,1123	0,0235	0,0346	0,1155
X	0,23645	0,03975	0,0982	0,10455
b4 1	0,2364	0,1137	0,1742	0,0172
2	0,2215	0,1844	0,0948	0,0097
X	0,22895	0,14905	0,1345	0,01345

Analisis statistik berat basah kalus *Citrus reticulata* B.yang diberi perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin setelah transformasi dengan $x + 0,5$

Perlakuan	2,4-D				Total
Kinetin	a0	a1	a2	a3	
b0 1	0,64	0,63	0,6	0,69	
2	0,63	0,71	0,64	0,59	

Σx	1,27	1,34	1,24	1,28	5,13
X	0,64	0,67	0,62	0,64	0,64
b1 1	0,95	0,68	0,62	0,58	
2	0,94	0,67	0,64	0,59	
Σx	1,89	1,35	1,26	1,17	5,67
X	0,95	0,68	0,63	0,59	0,71
b2 1	0,65	0,68	0,65	0,71	
2	0,62	0,66	0,69	0,62	
Σx	1,27	1,34	1,34	1,33	5,28
X	0,64	0,67	0,67	0,67	0,66
b3 1	1,1	0,74	0,9	0,81	
2	0,84	0,65	0,69	0,84	
Σx	1,94	1,39	1,59	1,65	6,57
X	0,97	0,7	0,8	0,83	0,83
b4 1	0,99	0,84	0,92	0,63	
2	0,97	0,93	0,81	0,6	
Σx	1,96	1,77	1,73	1,23	6,69
X	0,98	0,89	0,87	0,62	0,84
Total	8,33	7,19	7,16	6,66	29,34

Analisis sidik ragam

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{(\Sigma y_{ij})^2}{a \cdot b \cdot r} \\ &= \frac{29,34^2}{4 \cdot 5 \cdot 2} = \frac{860,84}{40} = 21,52 \end{aligned}$$

Total

$$\begin{aligned} \text{Jumlah Kuadrat (JK)} &= (\Sigma y_{ij})^2 - \text{FK} \\ &= (0,64^2 + 0,63^2 + \dots + 0,6^2) - 21,52 \\ &= 22,27 - 21,52 = 0,75 \end{aligned}$$

$$\text{Derajat Bebas (DB)} = t \cdot r - 1 = 20 \cdot 2 - 1 = 39$$

Perlakuan

$$\begin{aligned}
 \text{Jumlah Kuadrat (JK)} &= \frac{(\sum Y_{ij})^2}{r} - FK \\
 &= \frac{1,27^2 + 1,34^2 + \dots + 1,23^2}{2} - 21,52 \\
 &= 44,33/2 - 21,52 = 22,17 - 21,52 = 0,65
 \end{aligned}$$

$$\text{Derajat Bebas (DB)} = t-1 = 20-1 = 19$$

$$\text{KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{db perlakuan}} = \frac{0,65}{19} = 0,03$$

Faktor a

$$\begin{aligned}
 \text{JK a} &= \frac{(\sum a_j)^2}{r \cdot b} - FK \\
 &= \frac{(8,33^2 + 7,19^2 + 7,16^2 + 6,66^2)}{2,5} - 21,52 \\
 &= \frac{69,39 + 51,7 + 51,27 + 44,36}{10} - 21,52 = 21,67 - 21,52 = 0,15
 \end{aligned}$$

$$\text{Derajat Bebas (DB)} = a-1 = 4-1 = 3$$

$$\text{KT a} = \frac{\text{JK a}}{\text{db a}} = \frac{0,15}{3} = 0,05$$

Faktor b

$$\begin{aligned}
 \text{JK b} &= \frac{(\sum a_j)^2}{r \cdot a} - FK \\
 &= \frac{5,13 + 5,67^2 + 5,28^2 + 6,57^2 + 6,69^2}{2,4} - 21,52 \\
 &= \frac{174,27}{8} - 21,52 = 0,26
 \end{aligned}$$

$$\text{Derajat Bebas} = b-1 = 5-1 = 4$$

$$\text{KT b} = \frac{\text{JK b}}{\text{db b}} = \frac{0,26}{4} = 0,07$$

Interaksi

$$JK\ ab = JKP - JKa - JKb$$

$$= 0,65 - 0,15 - 0,26 = 0,24$$

$$\text{Derajat Bebas} = (a-1)(b-1) = (4-1)(5-1) = 3 \times 4 = 12$$

$$KT\ ab = \frac{JK\ ab}{db\ ab} = \frac{0,24}{12} = 0,02$$

Galat

$$JK\ Galat\ (JKG) = JK\ Total - JK\ Perlakuan$$

$$= 0,75 - 0,65 = 0,1$$

$$\text{Derajat Bebas (DB)} = t(r-1) = 20(2-1) = 20$$

$$KT\ galat = \frac{JKG}{db\ galat} = \frac{0,1}{20} = 0,005$$

F hitung

$$F\ hitung\ a = \frac{KT\ a}{KTG} = \frac{0,05}{0,005} = 10$$

$$F\ hitung\ b = \frac{KT\ b}{KTG} = \frac{0,07}{0,005} = 14$$

$$F\ hitung\ ab = \frac{KT\ ab}{KTG} = \frac{0,02}{0,005} = 4$$

Daftar Sidik Ragam Berat Basah Kalus *Citrus reticulata* B. pada masing-masing perlakuan

Sumber	db	JK	KT	F hitung	F Tabel 5%
Perlakuan	19	0,65	0,03		
A	3	0,15	0,05	10*	3,1
B	4	0,26	0,07	14*	2,87
Ab	12	0,24	0,02	4*	2,28
Galat	20	0,1	0,005		
Total	39				

Ket: * = berbeda nyata pada taraf 5%

Uji lanjut Duncan New Multiple Range (DNMRT) pada taraf 5%

Daftar Uji Lanjut

Perlakuan	a0	a1	a2	a3	Total	Rata-rata
b0	0,64	0,67	0,62	0,64	2,57	0,64
b1	0,95	0,68	0,63	0,59	2,85	0,71
b2	0,64	0,67	0,67	0,67	2,65	0,66
b3	0,97	0,7	0,8	0,83	3,3	0,83
b4	0,98	0,89	0,87	0,62	3,36	0,84
Total	4,18	3,61	3,59	3,35		
Rata-rata	0,84	0,72	0,72	0,67		

1. Faktor a

$$S_y a = \sqrt{(KTG/b.r)}$$

$$= \sqrt{\left(\frac{0,005}{5.2}\right)} = 0,02$$

$$LSR = S_y a \times SSR$$

Daftar nilai SSR dan LSR untuk faktor a

SSR 20	2	3	4
	2,95	3,1	3,18
LSR 5% = $S_y a \times SSR$ 5%	0,059	0,062	0,064

Tabel daftar Uji Lanjut untuk faktor a pada taraf 5%

Perlakuan	Rata-rata	a0	a1	a2	a3	LSR	Notasi
a0	0,64	-				-	A
a1	0,56	0,12*	-			0,059	B
a2	0,56	0,12*	0 ^{ns}	-		0,062	B
a3	0,54	0,17*	0,05 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-	0,064	B

2. Faktor b

$$S_y b = \sqrt{(KTG/a.r)}$$

$$= \sqrt{\left(\frac{0,005}{4.2}\right)} = 0,03$$

$$LSR = S_y b \times SSR$$

Daftar nilai SSR dan LSR untuk faktor b

SSR 20	2	3	4	5
	2,95	3,10	3,18	3,25
LSR 5% = $S_y b \times SSR$ 5%	0,09	0,09	0,1	0,1

Tabel daftar Uji Lanjut untuk faktor b pada taraf 5%

Perlakuan	Rata-rata	b4	b3	b1	b2	b0	LSR	Notasi
b4	0,84	-					-	i
b3	0,83	0,01 ^{ns}	-				0,09	i
b1	0,71	0,13 [*]	0,12 [*]	-			0,09	ii
b2	0,66	0,18 [*]	0,17 [*]	0,05 ^{ns}	-		0,1	ii
b0	0,64	0,2 [*]	0,19 [*]	0,07 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-	0,1	ii

3. Faktor ab

$$S_y ab = \sqrt{(KTG/abr)}$$

$$= \sqrt{\frac{0,005}{4.5.2}} = 0,01$$

$$LSR = S_y ab \times SSR$$

SSR 20	2,95	3,1	3,18	3,25	3,3	3,34	3,36	3,38	3,4	3,42	3,43	3,44	3,44	3,45	3,46	3,46	3,46	3,47	3,47
LSR 5%	0,03	0,031	0,032	0,033	0,033	0,033	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035

Daftar uji lanjut Duncan's terhadap faktor ab

Perlakuan	Rata-rata	a0b4	a0b3	a0b1	a1b4	a2b4	a3b3	a2b3	a1b3	a1b1	a1b0	a1b2	a2b2	a3b2	a3b0	a0b2	a0b0	a2b1	a3b4	a2b0	a3b1	LSR 5%	Nota:
a0b4	0,98	-																					a
a0b3	0,97	0,01 ^{ns}	-																			0,03	a
a0b1	0,95	0,03*	0,02 ^{ns}	-																		0,031	b
a1b4	0,89	0,09*	0,08*	0,06*	-																	0,032	c
a2b4	0,87	0,11*	0,1*	0,08*	0,02 ^{ns}	-																0,033	c
a3b3	0,83	0,15*	0,14*	0,12*	0,06*	0,04*	-															0,033	d
a2b3	0,8	0,18*	0,17*	0,15*	0,09*	0,07*	0,03 ^{ns}	-														0,033	d
a1b3	0,7	0,28*	0,27*	0,25*	0,19*	0,17*	0,13*	0,1*	-													0,034	e
a1b1	0,68	0,3*	0,29*	0,27*	0,21*	0,19*	0,15*	0,12*	0,02 ^{ns}	-												0,034	e
a1b0	0,67	0,31*	0,3*	0,28*	0,22*	0,2*	0,16*	0,13*	0,03 ^{ns}	0,01 ^{ns}	-											0,034	e
a1b2	0,67	0,31*	0,3*	0,28*	0,22*	0,2*	0,16*	0,13*	0,03 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0 ^{ns}	-										0,034	e
a2b2	0,67	0,31*	0,3*	0,28*	0,22*	0,2*	0,16*	0,13*	0,03 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	-									0,034	e
a3b2	0,67	0,31*	0,3*	0,28*	0,22*	0,2*	0,16*	0,13*	0,03 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	-								0,034	e
a3b0	0,64	0,34*	0,33*	0,31*	0,25*	0,23*	0,19*	0,16*	0,06*	0,04*	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-							0,034	f
a0b2	0,64	0,34*	0,33*	0,31*	0,25*	0,23*	0,19*	0,16*	0,06*	0,04*	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0 ^{ns}	-						0,035	f
a0b0	0,64	0,34*	0,33*	0,31*	0,25*	0,23*	0,19*	0,16*	0,06*	0,04*	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	-					0,035	f
a2b1	0,63	0,35*	0,34*	0,32*	0,26*	0,24*	0,2*	0,17*	0,07*	0,05*	0,04*	0,04*	0,04*	0,04*	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	-				0,035	g
a3b4	0,62	0,36*	0,35*	0,33*	0,27*	0,25*	0,21*	0,18*	0,08*	0,06*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,02 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,01 ^{ns}	-			0,035	g
a2b0	0,62	0,36*	0,35*	0,33*	0,27*	0,25*	0,21*	0,18*	0,08*	0,06*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,02 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0 ^{ns}	-		0,035	g
a3b1	0,59	0,39*	0,38*	0,36*	0,3*	0,28*	0,24*	0,21*	0,11*	0,09*	0,08*	0,08*	0,08*	0,08*	0,05*	0,05*	0,05*	0,04*	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-	0,035	h