



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.

**PERKEMBANGAN EKSPLAN JERUK KACANG (*Citrus nobilis* L.)
PADA BEBERAPA KONSENTRASI NAA DAN BAP SECARA IN
VITRO**

SKRIPSI



**SITI NURAINI LUBIS
07112048**

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2012**

**PERKEMBANGAN EKSPLAN JERUK KACANG (*Citrus nobilis*L.) PADA
BEBERAPA KONSENTRASI NAA DAN BAP SECARA *IN VITRO***

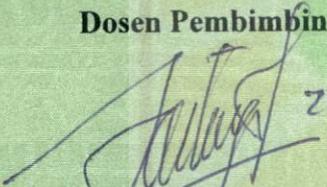
Oleh :

SITI NURAINI LUBIS

07 112 048

MENYETUJUI :

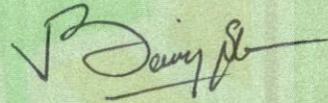
Dosen Pembimbing I,



Ir. Sutoyo, MS

NIP. 19590902 198403 1 002

Dosen Pembimbing II,



Dr. Ir. Benni Satria, MP

NIP. 19650930 199512 1 001

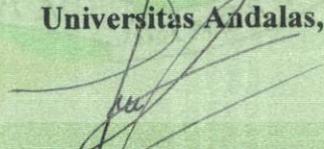
**Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Andalas,**



Prof. Ir. H. Ardi, MSc

NIP. 19531216 198003 1 004

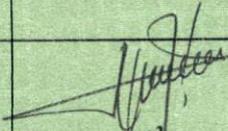
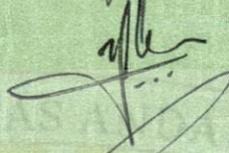
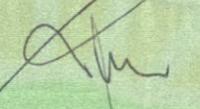
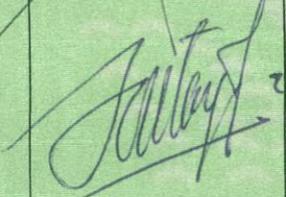
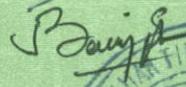
**Ketua Jurusan
Budidaya Pertanian
Fakultas Pertanian
Universitas Andalas,**



Ir. Fevi Frizia, MS

NIP. 19630315 198712 2 001

Skripsi ini telah diuji dan dipertahankan di depan Sidang Panitia Ujian Sarjana
Fakultas Pertanian Universitas Andalas, pada tanggal 20 Juli 2012.

No	Nama	Tandatangan	Jabatan
1.	Dra. Netti Herawati, MSc		Ketua
2.	Dr. Yusniwati, SP, MP		Sekretaris
3.	Dr. Aprizal Zainal, SP, MSi		Anggota
4.	Ir. Sutoyo, MS		Anggota
5.	Dr. Ir. Benni Satria, MP		Anggota



"Pelajari olehmu akan ilmu, sebab mempelajari ilmu itu memberikan rasa takut kepada Allah. Menuntut ilmu merupakan ibadah, mengulanginya merupakan tasbih, pembahasannya merupakan jihad, mengajarkan kepada orang yang belum mengetahui merupakan sedekah dan menyerahkan pada ahlinya merupakan pendekatan diri pada Allah s.w.t (H.R, Ibnu Abdil Barr)"

Patah . . tumbuh . . . hilang . . berganti . . .

Kelelahan hanyalah bagian dari siklus yang harus dilalui . .

Saat memutuskan berhenti jangan lupa 'ntuk memulai kembali . .

Karena semua harus dijalani dan musti dilewati . . .

"Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai dari suatu urusan, kerjakanlah dengan sungguh-sungguh urusan yang lain. Dan hanya kepada Tuhanmu-lah hendaknya kamu berharap (Al Insyirah 6-8)"

Dari lubuk hati yang paling dalam . .

ku persembahkan sebuah karya kecil ini teruntuk . .

Ayahanda M. Sulaiman Lubis dan Ibunda Aisyah Nst tercinta . .

Bersama Do'a, ku melangkah penuh keyakinan, Cita-cita Ayah & Ibunda adalah pelita dalam hidup ku. Serta Drs. M. Nuh Lubis, MM (Alm) dan keluarga besar di panyabungan, Lubuk Pakam, Binjai dan di Medan, yang selalu waspada dan siaga dengan segala dukungan, pengorbanan, motivasi, serta perhatian ntuk mengiringi langkah kecil ku menapaki kehidupan . .

Serta terimakasih kepada . .

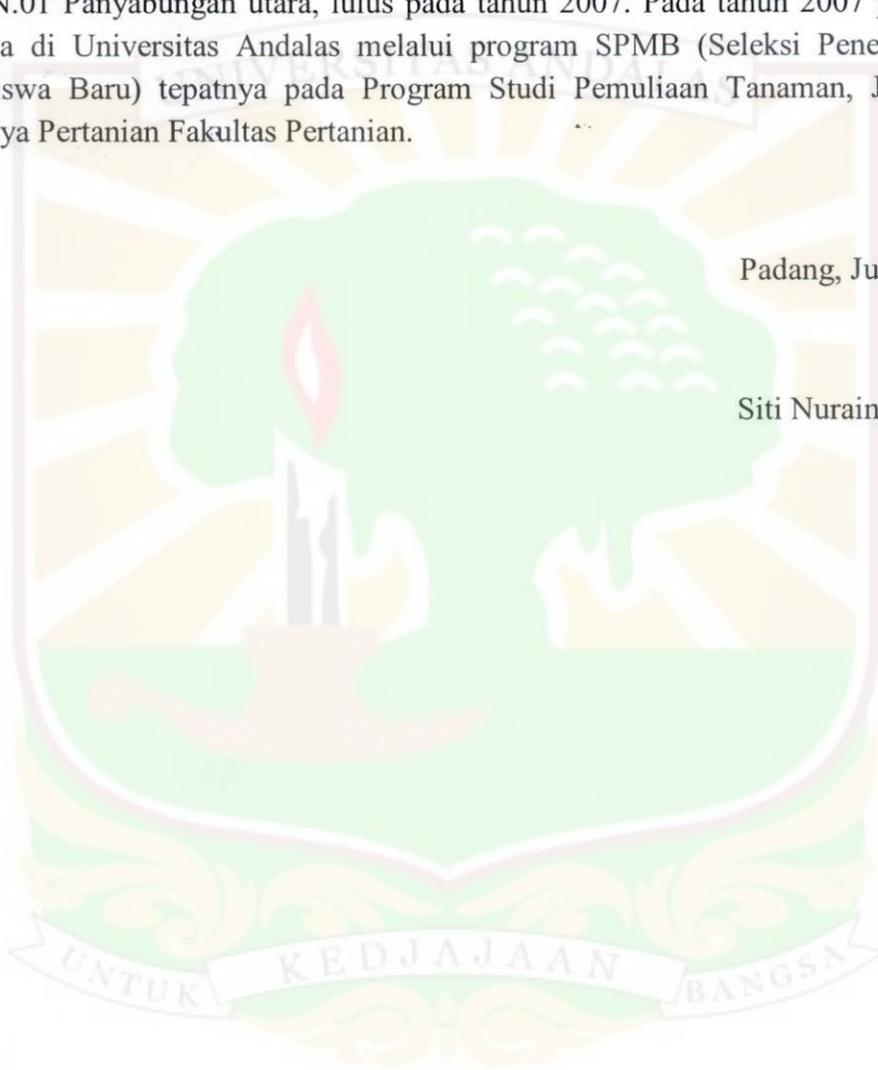
- ❖ Bapak Ir. Sutoyo, MS dan Bapak Dr. Ir. Benni Satria, MP atas segala arahan, bimbingan dan pelajaran berharganya, untuk bekal menapaki masa depan . .*
- ❖ Keluarga besar Fakultas Pertanian, khususnya jurusan BDP & Lab's member yang telah mengajarkan arti sebuah perjuangan terutama Bu Ais,Bu yen, Uni Yet, teristimewa untuk saudara-saudara last generatoin BDP'07 atas kebersamaan yang telah kita lalui, Atika, Fitri Kurnia, Mera, Rika, Kusnadi, Budi, Lismarahayu, vita dan spesial untuk teman sepembimbing atas "nasehat & motivasinya"*
- ❖ Kakakku tercinta Asmiah Sari R. telah menjadi kakak yang paling baik dikehidupannku, terimakasih untuk bantuan, semangat & supportnya, serta abangku Idris R. dan Mhd. Raiz Qayum. Dan Adek-adek ku M. Iqbal, Sisi, Tina, Fakhurrozi, Zia. Fatimah, usup, aim, Halimatussya'diah (Semoga kita menjadi Orang Sukses dan dapat membanggakan Keluarga kita nantinya) Amin.*
- ❖ Abangku Wahyu indra Prayogo Sp. atas perhatian, semangat dan waktu yang diberikan kepadaku, yang telah mengajarku Arti kemudahan dibalik kesusahan, dan indah dibalik kegagalan ,, dan telah mengulurkan tanganmu ketika ku terjatuh dan berdiri disampingku ketika ku menghadapi permasalahan yang sulit kupecahkan sendiri.*

BIODATA

Penulis dilahirkan di Bandar Jaya (Lampung), pada tanggal 16 Agustus 1990 sebagai anak pertama dari lima bersaudara dari pasangan M. Sulaiman Lubis dan Aisyah Nst. Pendidikan Taman Kanak-Kanak (TK) ditempuh di TK Bayangkari tahun 1994-1995. Dilanjutkan Sekolah Dasar (SD) di SD N. 03 Panyabungan dari tahun 1995 sampai 2001. Sekolah Lanjutan Tingkat Pertama (SLTP) ditempuh di SMP N. 01 Panyabungan, lulus tahun 2004. Sekolah Lanjutan Tingkat Atas (SLTA) ditempuh di SMA Dharma Pancasila Medan dan SMA N.01 Panyabungan utara, lulus pada tahun 2007. Pada tahun 2007 penulis diterima di Universitas Andalas melalui program SPMB (Seleksi Penerimaan Mahasiswa Baru) tepatnya pada Program Studi Pemuliaan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian.

Padang, Juli 2012

Siti Nuraini Lubis



KATA PENGANTAR

السلام عليكم ورحمة الله.....

الحمد لله رب العالمين, penulis mengucapkan kehadiran Allah SWT atas semua rahmat dan karuniaNya, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Salawat dan salam juga senantiasa penulis kirimkan kepada junjungan kita nabi besar Muhammad SAW yang menjadi tauladan dalam perjuangan hidup yang tiada akhir ini.

Skripsi ini berjudul “**Perkembangan Eksplan Jeruk Kacang (*Citrus nobilis* L.) Pada Beberapa Konsentrasi NAA dan BAP secara *in vitro***”, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pertanian. Penelitian ini merupakan suatu tinjauan dari mata kuliah Kultur Jaringan Tanaman pada Program Studi Pemuliaan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Andalas.

Penulis ingin menyampaikan rasa terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada **Bapak Ir. Sutoyo, MS** dan **Bapak Dr.Ir. Benni Satria, MP** selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan nasehat, tuntunan, saran, arahan dan bimbingan, mulai dari perencanaan hingga penulisan skripsi ini. Ucapan yang sama juga penulis sampaikan kepada seluruh dosen dan karyawan Fakultas Pertanian Universitas Andalas khususnya Jurusan dan Laboratorium Budidaya Pertanian.

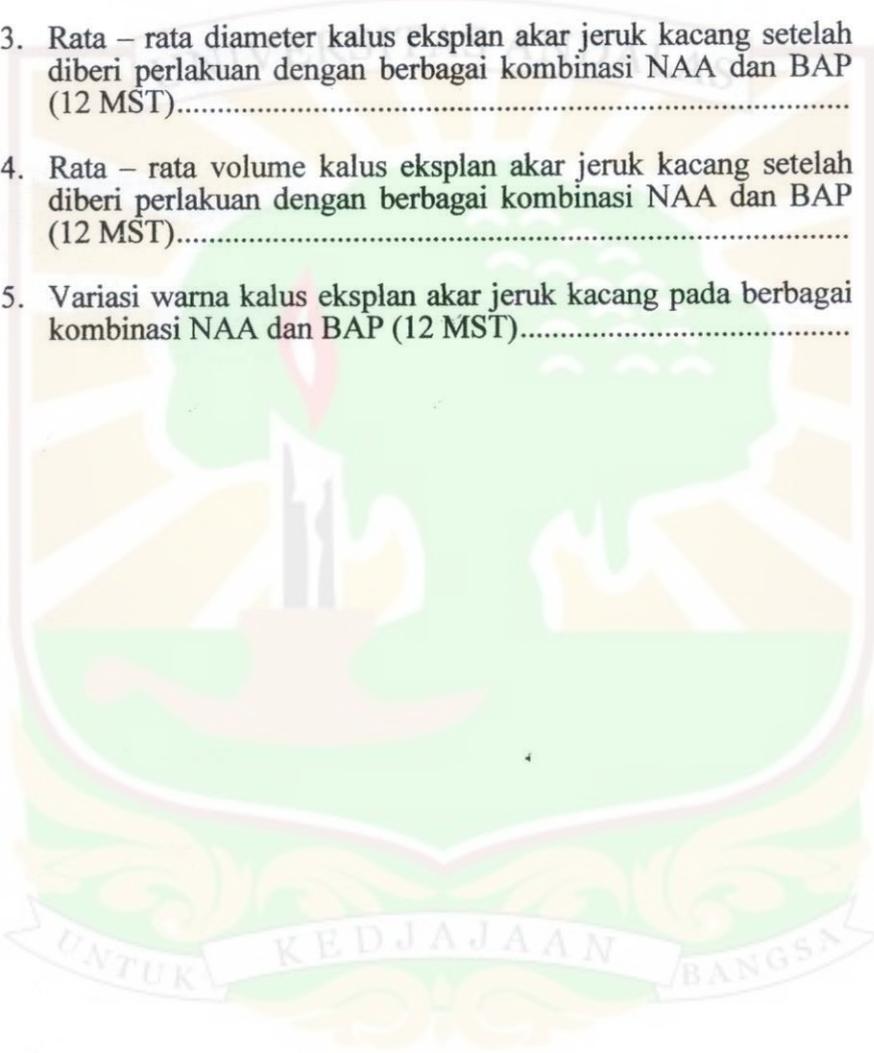
Penulis menyadari bahwa materi dan semua yang terangkum dalam skripsi ini masih banyak kekurangan, karena bagaimanapun kehidupan adalah sebuah proses pembelajaran yang tiada henti. Namun besar harapan penulis, semoga skripsi ini kelak dapat bermanfaat serta berguna bagi kemajuan ilmu pengetahuan khususnya bidang pertanian.

Padang, Juli 2012

S. N. A

DAFTAR TABEL

<u>Tabel</u>	<u>Halaman</u>
1. Persentase eksplan akar jeruk kacang yang hidup (12 MST)	31
2. Persentase eksplan akar jeruk kacang yang membentuk kalus (12 MST).....	33
3. Rata – rata diameter kalus eksplan akar jeruk kacang setelah diberi perlakuan dengan berbagai kombinasi NAA dan BAP (12 MST).....	35
4. Rata – rata volume kalus eksplan akar jeruk kacang setelah diberi perlakuan dengan berbagai kombinasi NAA dan BAP (12 MST).....	36
5. Variasi warna kalus eksplan akar jeruk kacang pada berbagai kombinasi NAA dan BAP (12 MST).....	40



DAFTAR GAMBAR

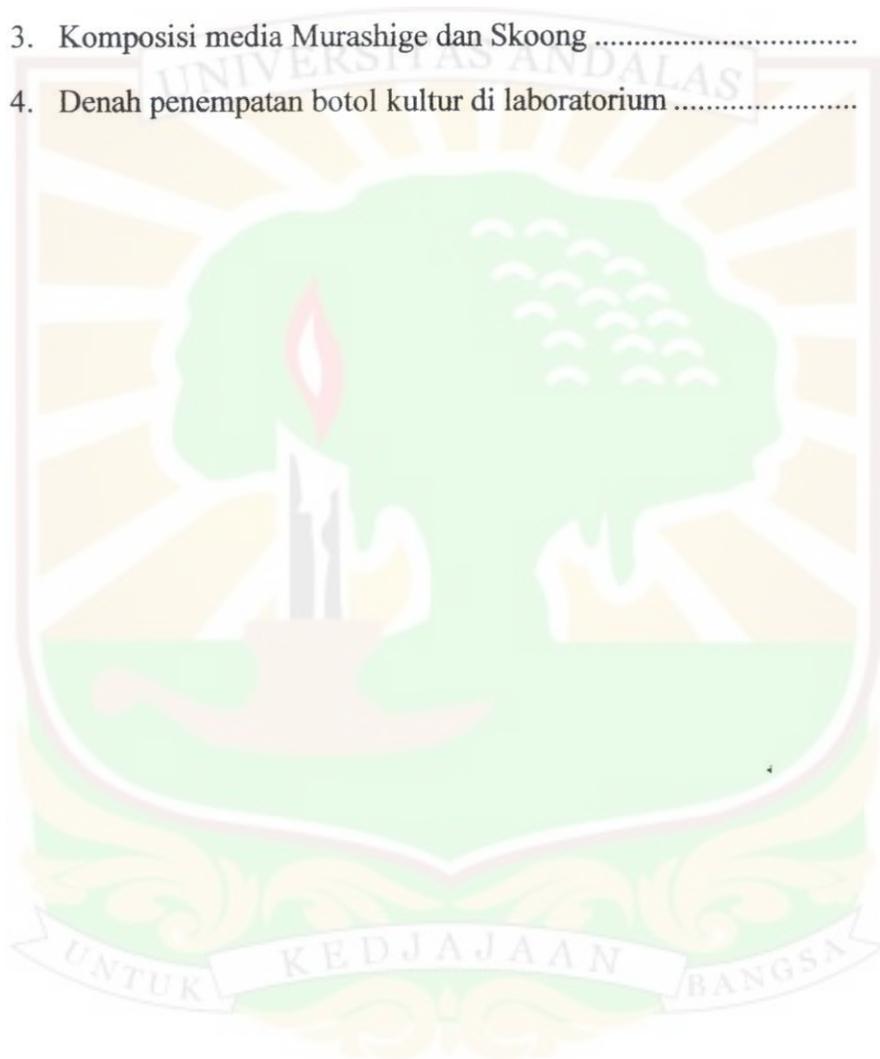
<u>Gambar</u>	<u>Halaman</u>
1. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (1 mg NAA + 1 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST	21
2. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (1 mg NAA + 2 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST	22
3. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (1 mg NAA + 3 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST	23
4. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (2 mg NAA + 1 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST	24
5. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (2 mg NAA + 2 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST	25
6. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (2 mg NAA + 3 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST	26
7. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (3 mg NAA + 1 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST	27
8. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (3 mg NAA + 2 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST	28
9. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (3 mg NAA + 3 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST	29
10. Perbandingan eksplan akar hingga akhir pengamatan, pada kombinasi (2 mg NAA + 3 mg BAP)/l	32
11. Perbandingan eksplan hidup dengan eksplan yang telah mati...	32

12. Perkembangan kalus	34
13. Tekstur kalus eksplan akar jeruk kacang secara umum hasil mikroskop (10 kali pembesaran) pada umur 12 MST	38



DAFTAR LAMPIRAN

<u>Lampiran</u>	<u>Halaman</u>
1. Deskripsi tanaman jeruk kacang	50
2. Jadwal pelaksanaan penelitian dari awal Bulan Maret sampai Mei 2012	51
3. Komposisi media Murashige dan Skoong	52
4. Denah penempatan botol kultur di laboratorium	53

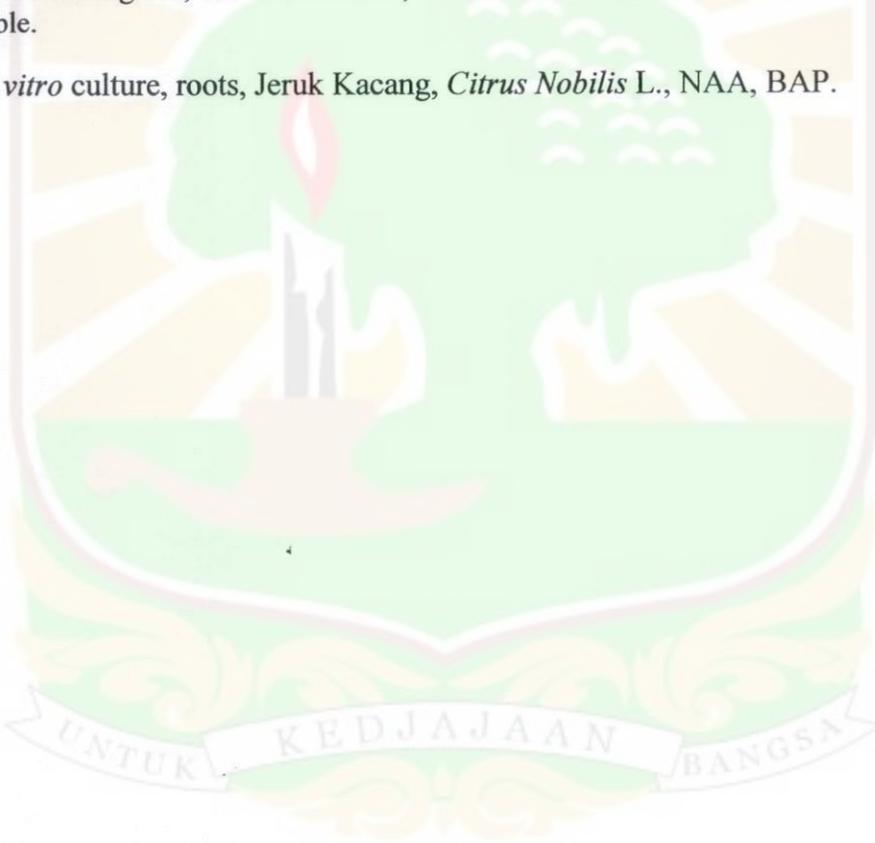


DEVELOPMENT OF JERUK KACANG EXPLANT (*Citrus nobilis* L.) IN SOME CONCENTRATION NAA AND BAP *IN VITRO*

ABSTRACT

Explants were taken from the results of tissue culture *plantlets* using jeruk kacang root, have been conducted in the Laboratory of Plant Tissue Culture, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, University of Andalas Padang from month March to May 2012. This research aims to obtain the best of combinations of NAA and BAP to promote *in vitro* callus development of jeruk kacang explant. Treatment comprise on two factors: factor A consist the concentration of NAA that are made up of three standards (1.0 , 2.0 and 3.0 mg NAA)/l and factor B consist the concentration of BAP that are made up of three standards (1.0 , 2.0 and 3.0 mg BAP)/l, with nine treatment combinations. Medium treatment used was Murashige & Skoog (MS) with used descriptive method. The result show the best combination was found in combination (3.0 mg NAA + 2.0 mg BAP)/l, all treatment combinations of NAA + BAP have been able to push an jeruk kacang root explants lives to 100% , and form callus with a percentage of 85%. The callus colour are green, whitish green, brownish green, brown and white, and brown. Where as callus texture that formed is solid and freeable.

Keywords: *in vitro* culture, roots, Jeruk Kacang, *Citrus Nobilis* L., NAA, BAP.



I. PENDAHULUAN

Sejak beberapa tahun silam permintaan akan jeruk keprok terus meningkat, ditandai dengan masih tingginya angka impor jeruk keprok yaitu sebesar 68.535 ton pada tahun 2006, sebagian besar berasal dari China disamping negara Pakistan. Tingginya permintaan lebih dikarenakan penampilan dan cita rasa jeruk keprok lebih disukai dari pada jeruk siam. Di sisi lain ketersediaan jeruk keprok Indonesia masih sangat sedikit menyebabkan pemenuhan kebutuhan jeruk keprok berasal dari impor (Ditjen Hortikultura, 2008).

Indonesia memiliki beragam jenis jeruk keprok berkualitas baik dan berpotensi mengisi permintaan dalam negeri. Sarwono (1990) melaporkan jeruk keprok yang tumbuh di Indonesia tercatat sebanyak 70 kultivar yang telah dikoleksi Kebun Percobaan Sub Balai Penelitian Hortikultura Tlekung di Batu (Jawa Timur), tetapi hanya beberapa saja yang dikenal luas dan punya nilai komersial yang baik, diantaranya adalah: keprok siem pontianak, keprok tejakula, keprok siem garut, keprok batu, keprok kacang, keprok tawamangu, keprok pulung.

Soeroyo (1991) melaporkan untuk daerah Sumatera Barat genotipe jeruk keprok lokal utama adalah keprok kacang (*Citrus nobilis* L.) dengan wilayah pengembangannya meliputi Solok, Tanah Datar, Lima Puluh Kota, Pesisir Selatan serta Pasaman. Jahja dan Sutoyo (1991) menambahkan, jeruk keprok yang diberi nama sesuai daerah asalnya di Kenagarian Kacang (Kabupaten Solok) ini, diperkirakan sudah dikenal masyarakat setempat sejak ratusan tahun silam, dan merupakan salah satu jenis buah unggulan dari Sumatera Barat yang berpotensi untuk dikembangkan, karena mempunyai aroma khas, rasa yang manis segar, berukuran cukup besar, serta memiliki ukuran batang yang cukup tinggi hingga dapat hidup puluhan tahun. Untuk lebih jelasnya deskripsi jeruk kacang dapat dilihat pada (Lampiran 1).

Masalah utama yang dihadapi pada penyebarluasan jeruk kacang saat ini adalah sulitnya mendapatkan tanaman induk sebagai bahan tanam yang sehat dan berproduksi cepat. Di Sumatera Barat sendiri hampir semua sentra produksi

terserang CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) sejak tahun 1981, sehingga produksi jeruk kacang mengalami kemunduran, bahkan salah satu plasma nutfah penting Ranah Minang ini terancam punah (Jahja dan Sutoyo 1991).

Berbagai usaha untuk menanggulangi penyakit CVPD pada jeruk kacang sudah dilakukan, antara lain dengan menginjeksikan cairan antibiotik *oxytetracycline* pada pohonnya. Akan tetapi, hasilnya masih jauh dari harapan, bahkan boleh dibilang sia-sia (Jahja dan Sutoyo, 1991). Sejak tahun 1983/1984 upaya pengendalian CVPD telah dijadikan program nasional, dengan melakukan tindakan-tindakan pengendalian CVPD melalui infus dengan antibiotika pada tanaman yang sakit ringan sampai sedang, pengendalian vektor, penyebaran bibit jeruk bebas penyakit dan pemupukan (Ronald, 1994).

Untuk menyelamatkan dan mempertahankan keberadaan tanaman jeruk kacang perlu dilakukan pelestarian. Pelestarian tersebut dapat dilakukan secara *in situ* (pelestarian pada habitat) dan pelestarian *ex situ* (di luar habitat) berupa kebun raya, kebun koleksi, penyimpanan benih, dan pelestarian *in vitro* (Wattimena dan Mattjik, 1992). Selain untuk pelestarian plasma nutfah, teknik kultur *in vitro* dapat pula dimanfaatkan hasilnya untuk perbanyakan. Tumbuhan memiliki sifat yang penting yaitu totipotensi sel yang didefinisikan sebagai kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang menjadi individu yang sempurna jika ditempatkan pada suatu lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhannya. Setiap sel tumbuhan mengandung semua DNA yang diperlukan untuk menentukan semua yang dibutuhkan, dengan hanya mengambil sebagian jaringan (Pusposendojo, 1991).

Untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* ditentukan oleh media, lingkungan tumbuh, dan zat pengatur tumbuh. (Murashige, 1974) menjelaskan ada 4 hal yang perlu diperhatikan dalam pelaksanaan kultur jaringan tanaman, yaitu : karakteristik eksplan, komposisi media, kondisi fisik media, dan lingkungan tumbuh kultur. Selanjutnya untuk mengatur pertumbuhan dan perkembangan bahan tanaman yang dikulturkan, ke dalam media sering ditambahkan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin dan sitokinin dalam jumlah / konsentrasi tertentu.

Pada tahun 1962, Thosio Murashige dan Folk Skoog mempublikasikan formulasi media MS (Murashige dan Skoong) yang sampai sekarang terbukti

cocok untuk kultur jaringan bagi tanaman. Kemampuan yang dicapai dalam meregenerasikan tanaman secara *In vitro*, dari sel atau bagian tanaman ternyata berdampak luas bagi kemajuan bidang pertanian (Yusniwati, 2003). Media MS biasanya dapat digunakan hampir untuk semua tanaman. Media ini mempunyai konsentrasi garam-garam mineral yang tinggi dan senyawa N dalam bentuk NO_3^- dan NH_4^+ .

Penelitian Rahmi (2011) telah berhasil mengkulturkan jeruk kacang secara *in vitro* pada berbagai media basal, dengan menggunakan media MS didapatkan plantlet jeruk kacang yang bagus. Tanaman hasil kultur *in vitro* belum dapat beradaptasi secara langsung dengan lingkungan tetapi masih ada suatu tahap yang sangat menentukan keberhasilannya yaitu perbanyakan. Perbanyakan merupakan proses yang penting dalam aplikasi metode kultur jaringan dengan penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk dapat mendorong terbentuknya kalus.

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan kultur jaringan adalah zat pengatur tumbuh. *Naphtalen Acetic Acid* (NAA) memiliki sifat yang lebih baik dari pada *Indole Acetic Acid* (IAA) karena sifat kimianya lebih stabil, mobilitasnya rendah, memiliki pengaruh yang lama, hormon ini tetap berada didekat tempat yang diberikan dan tidak menyebar kebagian lain yang dapat mempengaruhi bagian lain tersebut. Sifat inilah yang menyebabkan pemakaiannya lebih berhasil, sedangkan IAA dapat tersebar ketunas-tunas lain dan menghalangi perkembangan dan pertumbuhan tunas tersebut (Yusniwati, 2003).

Benzil Amino purin (BAP) adalah zat pengatur tumbuh golongan sitokinin yang jika dikombinasikan dengan *Naphtalen Acetic Acid* (NAA) dari golongan auksin akan mendorong pembelahan sel dan pembentukan morfogenesis tanaman. Sedangkan dalam keadaan seimbang dapat mendorong pembentukan kalus (Wattimena, 1992).

Pada saat ini penelitian tentang kultur jaringan *Citrus nobilis* L. masih jarang ditemukan dan belum banyak informasi penggunaan berbagai macam ZPT untuk tujuan perbanyakan dengan sistem *in vitro*, sedangkan pada kultur jaringan salah satu yang menentukan keberhasilannya adalah zat pengatur tumbuh (ZPT). Sehingga dibutuhkannya penelitian tentang penggunaan beberapa konsentrasi

ZPT terhadap pertumbuhan dan perkembangan kultur jaringan *Citrus nobilis* L. tersebut.

Dalam melakukan penelitian kultur jaringan ada 4 kelompok komponen yang penting dalam media nutrisi, yaitu gula, garam – garam makro, auksin dan sitokinin. Untuk mengetahui berapa banyak kebutuhan senyawa tersebut, maka keempat kelompok media nutrisi tersebut dipilih menjadi tiga berdasarkan tingkat konsentrasi standar (rendah, sedang, tinggi). Dimana gula 1-2-4%, garam makro 0, 25-0, 5-1, auksin 0,0-0, 2-0 ppm, sitokinin 0,0-1, 0-3 ppm. Dan apabila dari kombinasi 4 kelas komponen tersebut didapat konsentrasi yang optimal, selanjutnya sangat perlu dilakukan percobaan yang lebih kritis. Sebagai contoh 0,6 ppm adalah konsentrasi auksin yang optimal, maka perlu diuji lagi dalam konsentrasi yang lebih kecil, yaitu 0,4 – 0,2 – 0,0 ppm pada penelitian selanjutnya.

Berdasarkan permasalahan yang dihadapi jeruk kacang ini, maka penulis melakukan penelitian dengan judul **“Perkembangan Eksplan Jeruk Kacang (*Citrus nobilis* L.) Pada Beberapa Konsentrasi NAA dan BAP Secara *In Vitro*”** yang bertujuan untuk mendapatkan kombinasi NAA dan BAP yang terbaik untuk mendorong eksplan jeruk kacang membentuk kalus secara *in vitro*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

Tanaman jeruk kacang (*Citrus nobilis* L.) merupakan anggota dari genus *Citrus* yang termasuk pada famili Rutaceae, sub famili Aurantiodeae, ordo Sapindales, serta kelas Magnoliopsida. Jeruk kacang merupakan jenis jeruk keprok endemik Sumatera Barat, yang hanya hidup pada habitat spesifik dengan penyebaran terbatas. Selain ditanam dan dikembangkan di daerah sekitar danau Singkarak, jeruk kacang juga banyak dijumpai di daerah lain misalnya: Panyangkalan dan Saniangbaka di Kabupaten Solok, Sumatera Barat serta Pulau Tengah di Kabupaten Kerinci, Jambi (Jahja dan Sutoyo, 1991).

Jeruk kacang memiliki habitus berupa pohon dengan tinggi 6 - 8 m. Batang tegak, bulat, percabangan simpodial yang membentuk sudut kecil terhadap garis vertikal (tidak melebar sepertihalnya jeruk siam) (Jahja dan Sutoyo, 1991). Kulit buah jeruk kacang yang dipetik matang penuh berwarna kuning keoranyean, memiliki kulit tebal tetapi tidak sulit untuk dikupas (Syariefa, 2004). Jeruk kacang memiliki rasa yang istimewa dengan perpaduan manis dan segar yang khas, ukuran buah lebih besar dan termasuk ke dalam kelas A, dalam satu kilo hanya berisi 5 - 6 buah.

Tanaman jeruk berbunga sepanjang tahun karena bunganya tidak mengenal musim maka dapat berbuah setiap saat. Umur tanaman jeruk yang dibudidayakan dengan baik maksimum dapat mencapai 10-15 tahun. Setelah mencapai umur tersebut dapat melakukan peremajaan kembali, tanaman jeruk bahkan dapat dipelihara sampai ratusan tahun (AAK, 1994). Menurut Pracaya (2001), tanaman jeruk yang berasal dari biji mulai berbunga setelah berumur 6 - 8 tahun dari okulasi mulai berbuah 2 atau 3 tahun sejak tanam. Tanaman jeruk ini termasuk tanaman menyerbuk sendiri (Poespodarsono, 1988).

Akar tanaman jeruk kacang berupa akar tunggang panjang dan akar serabut (bercabang pendek kecil) serta akar-akar rambut. Bila akar tunggang mencapai tanah yang keras atau tanah yang terendam air, maka pertumbuhannya akan berhenti, tetapi bila tanahnya gembur panjang akar tunggang bisa mencapai 6 - 7 meter. Perakaran tanaman jeruk kacang tergantung pada banyaknya unsur hara didalam tanah dan umumnya dikedalaman 0,15 - 0,50 meter (Sarwono, 1990).

Soeroyo (1991) melaporkan bahwa wilayah pengembangan keprok kacang di Sumatera Barat meliputi kabupaen Solok, Tanah Datar, Lima Puluh Kota, Pesisir Selatan dan Pasaman. Jeruk kacang yang ditanam ditepi danau Singkarak pada umumnya berasal dari buah terpilih yang masak dipohon dari batang terpilih pula (Jahja dan Sutoyo, 1991).

Jahja dan Sutoyo (1991) mengemukakan bahwa masalah utama dalam pengembangan tanaman jeruk kacang saat ini adalah sulitnya mendapatkan tanaman yang sehat. Hal ini disebabkan oleh banyaknya sentra produksi tanaman jeruk yang terserang CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) yang mengakibatkan tanaman jeruk menjadi sakit dan mati. Hal ini juga terjadi pada sentra-sentra produksi jeruk kacang yang secara tidak langsung membuat tanaman jeruk kacang terancam musnah dan produksi buah jeruk kacang menjadi langka.

Infeksi CVPD dapat terjadi sejak pembibitan, sehingga ada pohon jeruk yang seharusnya sudah berbuah tidak dapat menghasilkan sama sekali. Hal ini terjadi karena sebelum berbuah tanaman tersebut sudah terkena CVPD. Pada tanaman jeruk yang sudah parah, buah menjadi jauh lebih kecil dibandingkan dengan ukuran jeruk tanaman asal yang sehat. Pada tahap selanjutnya tanaman tidak akan mampu berproduksi, walaupun tanaman tersebut masih hidup (Roesmiyanto dan Dwiastuti, 1986).

Keadaan jeruk kacang yang mulai langka ini selain merugikan dari segi ekonomis karena menurunkan pendapatan petani jeruk kacang, juga menjadi ancaman bagi terjadinya erosi genetik jeruk keprok endemik Sumatera Barat ini. Suliansyah (2004) melaporkan bahwa, berdasarkan analisis penanda RAPD (*Random amplified Polymorphism DNA*) pada lima genotipe jeruk indigenous Sumatera Barat (keprok kacang, lunggo, kambing, besar pasaman dan kanci) yang diuji, genotipe jeruk kanci dan pasaman mempunyai tingkat kesamaan genotipe yang tertinggi, sedangkan jeruk kacang mempunyai tingkat kesamaan genetik yang paling rendah, sehingga ancaman kepunahan jeruk kacang yang memiliki gen spesifik (karena tingkat kemiripan yang rendah dengan lima jeruk indigenous Sumbar lain) akan sangat merugikan, terutama bagi koleksi plasma nutfah jeruk.

Untuk menyelamatkan dan mempertahankan keberadaannya, tanaman jeruk kacang perlu dilestarikan. Perkembangan dan kemajuan teknologi dapat

dimanfaatkan untuk pelestarian secara *ex-situ* dengan menempatkan biji-bijian di ruang pendingin, atau juga penyimpanan bagian vegetatif dengan alat khusus, yakni dengan mengatur lingkungan dan penggunaan bahan-bahan kimia tertentu (Plantus, 2010).

Teknik mengisolasi tanaman seperti sel, protoplasma, jaringan dan organ tanaman lainnya yang ditumbuhkan secara tersendiri di dalam media tertentu dan dipacu untuk memperbanyak diri. Bagian tanaman tersebut dapat beregenerasi menjadi tanaman baru yang lengkap dalam suatu kondisi lingkungan yang aseptik dan terkendali, cara ini dikenal dengan kultur jaringan atau kultur *in vitro* karena bagian tanaman tersebut dikulturkan atau ditumbuhkan di dalam wadah gelas yang aseptik di luar lingkungan tumbuh aslinya (Thorpe, 1981; Kyte, 1990 *cit* Lestari, 1999).

Secara teoritis, semua sel hidup dalam tanaman dapat diregenerasikan berdasarkan prinsip bahwa tanaman semula berasal satu sel zigot dalam ovarium, walaupun kemudian sel tersebut berdiferensiasi menjadi daun, batang, akar, bunga, buah dan biji tetapi masing-masing organ tersebut tetap mempunyai informasi genetik yang sama dengan zigotnya (George dan Sherington, 1984).

Kultur jaringan adalah salah satu metode untuk menumbuhkan bagian – bagian tanaman secara aseptik dalam media buatan yang kaya nutrisi dan mengandung zat tumbuh sehingga membentuk tanaman lengkap kembali dalam suatu wadah tertutup yang tembus cahaya. Prinsip dasar kultur jaringan adalah konsep totipotensi dimana setiap sel dari organisme dianggap mempunyai kemampuan untuk tumbuh, berkembang seperti zigot. Konsep totipotensi ini didasarkan atas teori sel yang ditemukan oleh Schleiden dan Schwann (Hussey tahun 1981 *cit* Hayati, 2001).

Cara kultur jaringan sangat menguntungkan sekali untuk mendapatkan tanaman baru dari tanaman yang mempunyai nilai ekonomis yang tinggi dan sukar memperoleh bibitnya, disamping keuntungan lainnya juga dapat mengisolasi tanaman baru sehingga bebas virus. Perbanyak dengan teknik kultur *in vitro* ditujukan antara lain untuk jenis tanaman yang menghadapi masalah seperti : daya berkecambah benihnya yang rendah, tanaman dengan

pertumbuhan yang lambat, dan tanaman yang akan dieksploitasi secara massal. (Wiendi, Wattimena, dan Gunawan, 1991).

Pertumbuhan eksplan pada teknik kultur jaringan *in vitro* menjadi kalus atau organ, pertama dipengaruhi oleh genotipe sumber jaringan organ atau bahan yang digunakan sebagai eksplan. Media dan kondisi fisik lingkungan kultur yang dibutuhkan seringkali berbeda antara satu bagian dengan bagian yang lain dari suatu tanaman, tidak jarang terjadi antara varietas yang memiliki sifat yang dekat sekalipun, kebutuhan akan lingkungan dan mediana sangat berbeda pula (George dan Sherington, 1984).

Suryadi(1982) bagian dari tanaman jeruk yang telah berhasil ditumbuhkan dengan cara kultur jaringan antara lain adalah tunas batang, nuselus (Button dan Kochba, 1977), kultur ujung tunas (Kitto dan Young, 1981), serta buku tunas (Witjaksono, 1992). Tanaman jeruk mempunyai sifat poliembrional dimana satu biji jeruk yang ditanam dapat tumbuh menjadi beberapa tanaman jeruk, yang dihasilkan dari 1 - 4 embrio dalam kantong embrio (Rismunandar, 1977). Tanaman-tanaman yang dihasilkan tersebut dapat berasal dari zigot hasil perkawinan (generatif), dapat pula berasal dari nuselus (vegetatif) (Button, 1977). Menurut Fahn (1991), nuselus merupakan bakal biji atau ovul yang dikelilingi oleh satu atau dua integumen, dan nuselus melekat pada plasenta dengan suatu tangkai yaitu funiculus. Salah satu sel nuselus, biasanya berada di bawah lapisan terluar dari ujung mikropil.

Melalui kultur *in vitro*, tanaman dapat diperbanyak setiap waktu sesuai kebutuhan, karena kecepatan perbanyakan yang tinggi (Mariska dan Purnamangsih, 2001). Selanjutnya Camacho – Bustos (1983) *cit* Ferita. Dkk, (2000) menyatakan bahwa perbanyakan generatif berupa biji akan menyebabkan terganggunya stabilitas genetik tanaman, sehingga akan menghasilkan tanaman yang memiliki sifat genetik yang tidak sama dengan induknya dan persentase bibit yang hidup dan perbanyakan generatif tersebut relatif rendah, hanya sekitar 35%.

Menurut Gunawan (1987) embrio atau organ yang berasal dari biji biasanya sering digunakan untuk eksplan dalam kultur jaringan inisiasi kalus, tapi dalam kultur nuselus seperti halnya embrio, bukan menumbuhkan kalus yang dimaksud dari nuselus yang dikulturkan, sebaliknya nuselus diharapkan tetap

(Gamborg dan Shyluk, 1981), untuk tanaman jeruk digunakan sukrosa pada konsentrasi 3% (Giladi, Altman, dan Goren, 1977), dalam kultur kalus dan pucuk konsentrasinya 2% - 4% namun dalam kultur embrio konsentrasi gula dapat mencapai 12% (Gunawan, 1987).

Bahan pematat yang paling banyak digunakan adalah agar, yaitu suatu polisakarida dengan berat molekul yang tinggi dan mempunyai kemampuan sebagai pematat (George dan Sherington, 1984). Kelebihan dari agar adalah: a) agar membeku pada temperatur kecil dari 45°C dan cair pada temperatur 100°C, sehingga agar dalam keadaan beku yang stabil pada temperatur kultur, b) tidak dicerna oleh enzim, c) tidak bereaksi dengan persenyawaan penyusun media. Agar juga mengandung kontaminan organik dan inorganik, seperti calsium, barium, sulfat, nitrogen, besi dan lainnya, sehingga untuk penelitian kultur jaringan yang memerlukan ketelitian tinggi seringkali digunakan agar *pa* (*pro analysis*), sedangkan untuk tujuan mikropropagasi dapat digunakan agar komersial yang harganya relatif lebih murah (Suliansyah, 2009).

Vitamin yang digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah: tiamin (vitamin B1), asam nikotinat, piridoksin (vitamin B6) yang dapat menyokong pertumbuhan (Dodds dan Roberts, 1982). Beberapa vitamin mempunyai manfaat seperti thiamin, dengan pemberian sampai beberapa mg/l media kultur ternyata merangsang pertumbuhan eksplan dan dapat mempertinggi pertumbuhan akar dalam fase-fase akhir. Asam nikotinat, pyrodoxine dan 5 macam vitamin B kompleks yang lain, juga bisa ditambahkan pada media (Wetherell, 1982).

Di dalam tubuh tanaman terdapat hormon tumbuh, yaitu senyawa yang jumlahnya sedikit dan mampu menghambat berbagai proses fisiologi tanaman. Konsentrasi yang diperlukan dari masing-masing zat pengatur tumbuh (auksin dan sitokinin) tergantung dari jenis eksplan, genotip, kondisi kultur, serta jenis sitokinin dan auksin yang diperlukan (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Zat pengatur tumbuh golongan auksin dan sitokinin dalam keseimbangannya merupakan faktor yang menentukan keberhasilan penggunaan kultur jaringan tanaman. Sitokinin sebagai senyawa organik yang dikombinasikan dengan auksin akan mendorong pembelahan sel dan menentukan arah differensiasi sel tanaman (Wattimena, 1988).

Sitokinin adalah sekelompok senyawa yang menyebabkan pembelahan sel yang dikenal dengan sitokinesis. Sitokinesis ini dapat berada dalam keadaan konjugasi dengan gula maupun gula fosfat. Disamping itu juga terhadap asam amino terutama alanin (Wattimena *et al*, 1992).

Golongan sitokinin merupakan turunan dari adenine (aminopurin) yang berperan penting pada proses diferensiasi dan regenerasi pada hampir semua jenis tanaman. Sitokinin mendorong inisiasi tunas lateral dan mengurangi dominasi apical, mendorong pembentukan kloroplas (Wattimena dan Mattjik, 1992).

Menurut (Lakitan, 1996) sitokinin berperan dalam merangsang proses sitokinesis (pembelahan sel pada jaringan secara *in vitro*). Sitokinin merupakan senyawa yang merangsang pembelahan sel jika dikombinasikan dengan auksin yang terkandung dalam konsentrasi optimal dan ditumbuhkan pada medium yang optimal untuk pertanaman.

Sitokinin yang sering digunakan pada kultur jaringan adalah zeatin, kinetin, dan Benzyl Amino Purin (BAP). BAP dan kinetin merupakan sitokinin sintetik sedangkan zeatin merupakan sitokinin alami. Zeatin tidak stabil bila terkena cahaya dan harus disimpan dalam kondisi gelap, sedangkan BAP lebih stabil dalam cahaya (Wetherell, 1991).

Interaksi dan perimbangan antara auksin dan sitokinin yang ada pada media dan diproduksi sendiri oleh jaringan eksplan secara endogen, menentukan arah perkembangan suatu kultur. Penambahan zat pengatur tumbuh eksogen yang sesuai, maka inilah yang merupakan faktor pendorong untuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan tersebut. Pengaturan guna menetapkan jumlah dan perbandingan inilah yang sulit untuk mendapatkan suatu formula yang terbaik bagi setiap penggunaannya (Gunawan, 1988).

Sitokinin berinteraksi dengan auksin sehingga pemakaian yang bersama harus dipertimbangkan konsentrasi dari masing – masingnya. Interaksi pertimbangan antara auksin dan sitokinin yang ada pada media dan diproduksi oleh tanaman secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur (Wetherell, 1991).

Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan bahwa, media cair dan padat digunakan untuk memperoleh kalus, kemudian dengan media differensiasi dapat ditumbuhkan akar serta tunas, sehingga kalus dapat tumbuh menjadi plantlet.

George dan Sherrington (1984) mengemukakan bahwa salah satu permasalahan pada kebanyakan kultur jaringan adalah sering terjadi browning (pencoklatan) pada eksplan yang baru ditanam sehingga dapat menghambat pertumbuhan bahkan dapat menyebabkan kematian. Akan tetapi, penggunaan jaringan muda akan dapat mengurangi terjadinya browning atau pencoklatan, dibandingkan dengan penggunaan jaringan tua. Selain penggunaan zat pengatur tumbuh eksogen, terutama pada konsentrasi yang tidak berimbang dapat memacu terjadinya peningkatan eksplan yang mengalami pencoklatan.

Untuk dapat mengatasi masalah ini dapat dilakukan berbagai cara antara lain; (1) menghilangkan senyawa fenolik yang terbentuk dengan absorpsi arang aktif, pencucian dengan air mengalir, dan pemindahan eksplan dengan sub kultur, (2) menurunkan redoks potensial dan (3) mereduksi fenolase dan menciptakan kondisi yang tidak sesuai dengan penurunan pH dan penggelapan. (George dan Sherrington, 1984).

Faktor lingkungan yang utama dalam kultur jaringan adalah suhu dan cahaya. Kekuatan penyinaran lampu TL yang baik terhadap pertumbuhan *Asparagus*, *Garbera*, dan *Saxifraga* pada media kultur adalah 1000-4000 lux selama 16 jam. Kelebihan dari lampu TL adalah kemampuan mengubah energi listrik menjadi cahaya tiga kali lebih besar dari lampu pijar dan panas yang dihasilkannya merata (Wetherall, 1982).

Aktifitas enzim poliphenoloksidase akan meningkat dengan adanya cahaya, oleh karena browning pada jaringan eksplan dapat dikurangi atau dicegah jika jaringan eksplan yang baru diisolasi ditempatkan pada ruangan gelap selama 14 hari, sebelum dipindahkan ke ruangan yang diberikan cahaya renadah (500-1000 lux) (Zairani, 1997).

Pada teknik *in vitro* cahaya paling dominan pengaruhnya adalah intensitas, foto periodesitas, dan kualitas cahaya. Intensitas yang dibutuhkan berkisar antara 600 – 1000 lux, dapat diperoleh dengan menggunakan lampu neon 20 watt. Intensitas yang tinggi dapat menghambat pembentukan pucuk dan kalus (Gunawan, 1988). Foto periodesitas cahaya tergantung kondisi dari pada eksplan, pada awal penanaman eksplan hanya membutuhkan cahaya 70%. Namun secara umum eksplan membutuhkan cahaya minimal 16 jam per hari.

Pada umumnya suhu berkisar antara 25° - 28° C dan pada suhu yang lebih rendah cenderung menghambat pertumbuhan dari eksplan (Gunawan, 1995). Sedangkan kelembaban relative ruang akar tumbuh kultur jaringan kurang lebih 70%, didalam botol menghendaki kelembaban yang lebih tinggi (Wiendi, Wattimena, 1991).



III. BAHAN DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian telah dilaksanakan mulai Bulan Maret sampai Mei 2012 di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian, Universitas Andalas, Padang. Jadwal kegiatan dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan tanaman yang digunakan adalah : eksplan akar jeruk kacang yang telah dikulturkan secara kultur *in vitro* (Atika), nutrisi penyusun media Murashige dan Skoog (MS) (Lampiran 3), vitamin, *Naphtalene Acetic Acid* (NAA) dan *Benzyl Amino Purine* (BAP), agar *pa (pro analysis)* dengan konsentrasi 7 gram per liter media, sukrosa 30 gram per liter media, HCl 0,1 N, KOH 0,1 N, spritus, aquadest steril, alkohol 70%, baycline, deterjen, plastik wrap, alumunium foil, plastik bening, lakban bening, karet gelang, tissue dan lain-lain yang dirasa perlu.

Alat yang digunakan adalah gunting, pinset, pisau scalpel, botol kultur dengan tinggi 9,3 cm dan diameter 6,5 cm, LAFC (*Laminar air flow cabinet*), gelas beker, gelas ukur, labu semprot, autoklaf, *hot plate* dengan magnetik stirer, pengaduk gelas, handsprayer, timbangan analitik, label, alat tulis, rak kultur yang dilengkapi dengan lampu dan ruangan yang dilengkapi pengatur suhu, kamera digital, serta alat-alat lain yang dirasa perlu.

3.3. Metodologi

Penelitian ini terdiri dari 9 kombinasi perlakuan dengan masing-masing 3 ulangan, sehingga terdapat 27 satuan percobaan. Masing – masing satuan penelitian terdapat 3 botol selai kultur sehingga jumlah keseluruhan menjadi 81 botol kultur. Selanjutnya tiap satuan penelitian diamati menggunakan metode deskriptif.

Masing-masing perlakuan adalah sembilan kombinasi perlakuan yang digunakan untuk pertumbuhan eksplan akar jeruk kacang secara *in vitro*, yaitu:

A₀B₀ : Kombinasi (1 mg NAA + 1 mg BAP)/l

A₀B₁ : Kombinasi (1 mg NAA + 2 mg BAP)/l

A₀B₂ : Kombinasi (1 mg NAA + 3 mg BAP)/l

A₁B₀ : Kombinasi (2 mg NAA + 1 mg BAP)/l

A₁B₁ : Kombinasi (2 mg NAA + 2 mg BAP)/l

A₁B₂ : Kombinasi (2 mg NAA + 3 mg BAP)/l

A₂B₀ : Kombinasi (3 mg NAA + 1 mg BAP)/l

A₂B₁ : Kombinasi (3 mg NAA + 2 mg BAP)/l

A₂B₂ : Kombinasi (3 mg NAA + 3 mg BAP)/l

3.4. Pelaksanaan

3.4.1. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan seperti cawan petri, pinset, pisau scalpel, gelas beker, labu ukur, pipet ukur, erlenmeyer, pengaduk gelas, dan botol kultur. Yang akan digunakan terlebih dahulu disterilisasi dengan autoklaf, suhu 121°C dan tekanan 15 psi (pound per square inch = besarnya tekanan pada bidang seluas 1 inci), selama 30 menit, untuk mematikan mikroorganisme dan kontaminan lain yang kemungkinan berkembang setelah pemakaian sebelumnya sehingga tidak terjadi penyebaran bakteri atau spora jamur ketika pencucian.

Selanjutnya peralatan tersebut dicuci menggunakan sun light dan dibilas hingga bersih, setelah itu dilakukan perendaman menggunakan baycline 5ml/l air selama 24 jam pada botol kultur dan peralatan kaca. Kemudian dilakukan autoklaf ulang pada botol-botol tersebut dan alat-alat yang telah bersih (alat-alat selain botol kultur terlebih dahulu dibungkus dengan kertas) dengan mempertahankan tekanan 15 psi, pada suhu 121°C selama 20 menit, setelah itu dilanjutkan dengan menyimpan alat-alat tersebut di dalam oven sampai saat akan digunakan.

Aquadest yang akan digunakan juga disterilkan menggunakan autoklaf dengan mempertahankan tekanan 15 psi, pada suhu 121°C selama 30 menit, proses sterilisasi aquadest dengan autoklaf ini membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan proses autoklaf untuk alat dan media, karena biasanya aquadest disterilkan dalam volume yang besar (500 ml - 1000 ml) maka tekanan 15 psi harus dipertahankan lebih lama. Lantai dan dinding bagian dalam LAFC,

disterilisasi dengan mengusapkan tissue bersih yang telah dicelupkan pada alkohol 70%, dan selanjutnya disterilisasi dengan lampu ultraviolet (*ger medical UV-lamp*) minimal 2 jam sebelum dipakai.

3.4.2. Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media MS. Zat kimia penyusun dapat dilihat pada (lampiran 2). Media dikelompokkan menjadi beberapa stok dengan kode I (Makro nutrien), II (Mikro nutrien), III (Besi), dan IV (Vitamin + Asam amino). Hal ini untuk menghindari pengendapan larutan, karena yang telah mengalami pengendapan tidak dapat digunakan lagi. Dalam larutan ini konsentrasinya dipekatkan sehingga saat pembuatan media, hanya memipet sejumlah volume tertentu sesuai takaran yang diperlukan.

Total media yang dibuat sebanyak 2 L dimana masing-masing perlakuan mempunyai volume 200 ml. Tahap pertama dalam pembuatan media adalah : pipet unsur hara (A sampai F), *myo inositol* serta vitamin sesuai takaran untuk pembuatan media 2 L. tambahkan gula 60 gram, dicukupkan volume menjadi 1000 ml dengan menambahkan aquadest. Kemudian larutan tersebut dibagi menjadi 10 kedalam gelas piala 200 ml dengan volume masing-masing 100 ml, kemudian ditambahkan NAA dan BAP sesuai dengan perlakuan.

Setelah itu dilakukan pengukuran derajat kemasaman menggunakan pH meter sehingga pH mencapai 5,8. Pengaturan pH dilakukan dengan penambahan beberapa tetes NaOH 0,1 N jika terlalu masam atau HCl 0,1 N jika terlalu basa. Selanjutnya larutan hara yang telah diuji derajat kemasamannya ditambahkan agar 1,4 g pada gelas piala yang telah berisi larutan hara sebanyak 100 ml, lalu media dicukupkan menjadi 200 ml, kemudian diaduk dan dimasak hingga mendidih dan larutan jernih. Media yang telah dimasak dimasukkan kedalam botol kultur sebanyak 9 botoi untuk satu perlakuan volume masing-masing ± 10 ml / botol, sisa media dimasukkan kedalam botol kultur dengan volume yang sama untuk tiap perlakuan yang akan dijadikan sebagai cadangan perlakuan. Botol yang berisi media ditutup dengan alumunium foil, lalu disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan dipertahankan pada tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah sterilisasi media selesai, tutup media yang berupa alumunium foil dilapisi

menggunakan plastik kaca dan diikat menggunakan karet yang telah disterilkan, selanjutnya botol-botol yang telah berisi media tersebut diinkubasi selama satu minggu di ruang kultur untuk melihat apakah terkontaminasi atau tidak.

3.4.3. Pemberian Perlakuan

Stok NAA dibuat dalam 100 mg/L. Kemudian dilakukan pemipetan, pemipetan langsung dilakukan pada waktu pembuatan media. Untuk konsentrasi NAA 1,0 mg/L maka dipipet sebanyak 2 ml, konsentrasi NAA 2,0 mg/L sebanyak 4 ml, dan NAA 3,0 mg/L sebanyak 6 ml. Sedangkan untuk BAP stok dibuat dalam konsentrasi 100 mg/L. Untuk konsentrasi BAP 1,0 mg/L maka dipipet sebanyak 2 ml, untuk konsentrasi BAP 2,0 mg/L dipipet 4 ml, dan konsentrasi BAP 3,0 mg/L dipipet 6 ml.

3.4.4. Penyediaan Eksplan

Eksplan akar jeruk kacang diambil dari hasil penelitian “Kultur Nuselus Jeruk Kacang (*Citrus nobilis L.*) Pada Berbagai Media Basal Secara *In Vitro*” yang terdapat di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Universitas Andalas yang berumur 180 hari. Dan dikeluarkan dari botol, bagian akarnya dipotong-potong didalam petridis dengan ukuran ± 2 cm, proses sterilisasi tidak dilakukan lagi.

3.4.5. Penanaman Eksplan

Eksplan ditanam di dalam LAFC. Alat-alat yang digunakan seperti pinset, lampu spritus, cawan petri, pisau scalpel, gunting dan botol kultur yang berisi media disemprot dengan alkohol 70% sebelum dimasukkan ke dalam LAFC.

Eksplan ditanam pada media sebanyak 3 eksplan pada masing-masing botolnya, penanaman eksplan pada botol media perlakuan dan botol media yang dijadikan sebagai cadangan di lakukan pada waktu yang sama tiap perlakuan. Botol kultur yang telah siap ditanam ditutup kembali dengan lakban bening dan dibalut dengan plastik wrap, dan diberi label. Setelah selesai penanaman botol perlakuan disusun pada rak kultur sesuai dengan denah penempatan (Lampiran 4), dengan suhu 25-30⁰.

3.4.6. Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan terhadap ruang kultur dengan menjaga kebersihan dan suhu ruangan. Botol kultur yang sudah berisi media dan eksplan disemprot dengan alkohol 70%, sedangkan eksplan serta media yang telah terkontaminasi oleh mikroorganisme segera dikeluarkan dari ruang inkubasi, untuk meminimalisir penularan kepada yang lain.

3.5. Pengamatan

3.5.1. Persentase eksplan yang hidup

Eksplan yang hidup dicirikan dengan eksplan yang tidak berubah warna, tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme yaitu $\leq 50\%$ dan tidak mengalami pencoklatan. Pengamatan dimulai satu hari setelah tanam, dengan perhitungan menggunakan rumus :

$$\% \text{ eksplan hidup} = \frac{\sum \text{eksplan yang hidup}}{\sum \text{eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

3.5.2. Persentase eksplan yang membentuk kalus

Kalus merupakan sekumpulan sel yang belum terdeferensiasi. Dinyatakan telah berbentuk kalus bila pada permukaan telah terbentuk sel – sel yang tidak terorganisir yang berwarna putih kompak atau putih kekuningan, hal ini dapat terjadi pada salah satu sisi atau pada semua permukaan. Pengamatan dimulai pada minggu pertama setelah tanam, dengan perhitungan rumus :

$$\% \text{ eksplan yang membentuk kalus} = \frac{\sum \text{eksplan yang membentuk kalus}}{\sum \text{eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

3.5.3. Diameter Kalus

Diameter kalus diamati pada pengamatan terakhir yaitu dengan cara mengeluarkan kalus dari botol dan mengukurnya dengan menggunakan penggaris.

3.5.4. Volume Kalus

Pengamatan dilakukan pada pengamatan terakhir didalam LAFC. Alat dan bahan yang digunakan seperti aquadest steril, tisu, gelas ukur 10 ml, pinset, lampu spiritus, cawan petri, gunting dan botol kultur yang berisi media disemprot dengan alkohol 70% sebelum dimasukkan ke dalam LAFC. Volume kalus di ukur

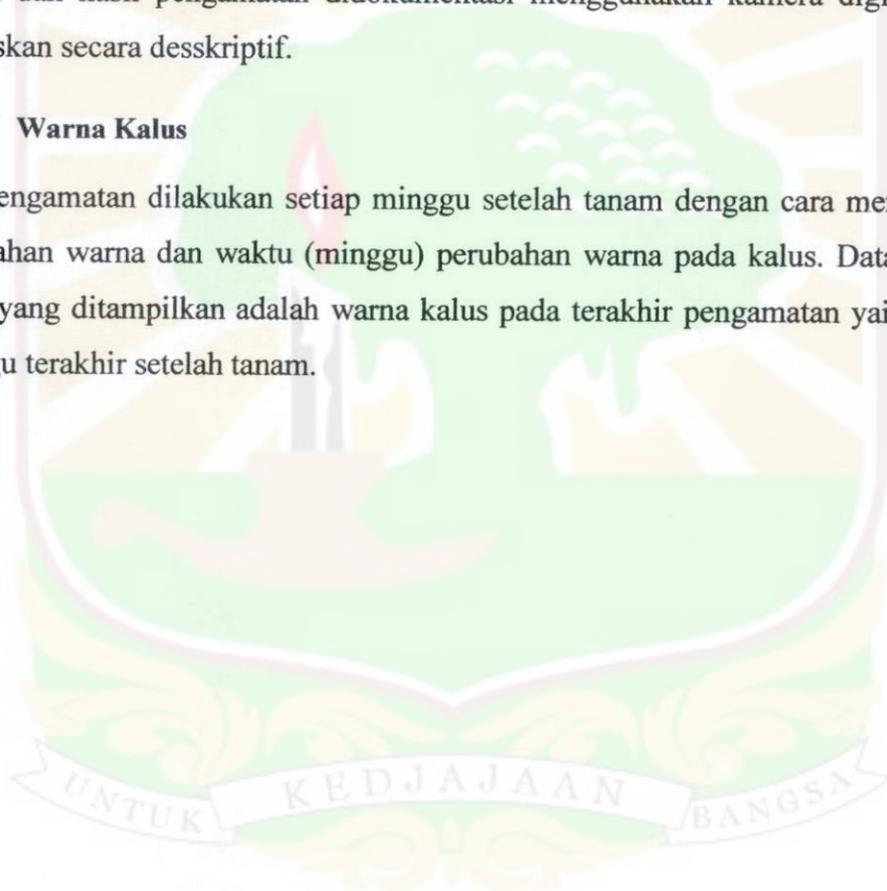
dengan cara mengeluarkan kalus dari botol kemudian dibersihkan dari media yang menempel dengan menggunakan tisu dan di masukkan kedalam gelas ukur yang berisi aquadest steril, setelah volume kalus didapatkan kalus diselamatkan dengan memindahkan kalus ke botol kultur yang berisi media baru.

3.5.5. Tekstur Kalus

Tekstur kalus diamati secara visual, bagian yang diamati bentuk luar dari kalus. Pengamatan ini menggunakan mikroskop untuk membantu memperjelas hasil gambar pengamatan. Pengamatan dilakukan pada minggu terakhir setelah tanam dan hasil pengamatan didokumentasi menggunakan kamera digital, dan dijelaskan secara deskriptif.

3.5.6. Warna Kalus

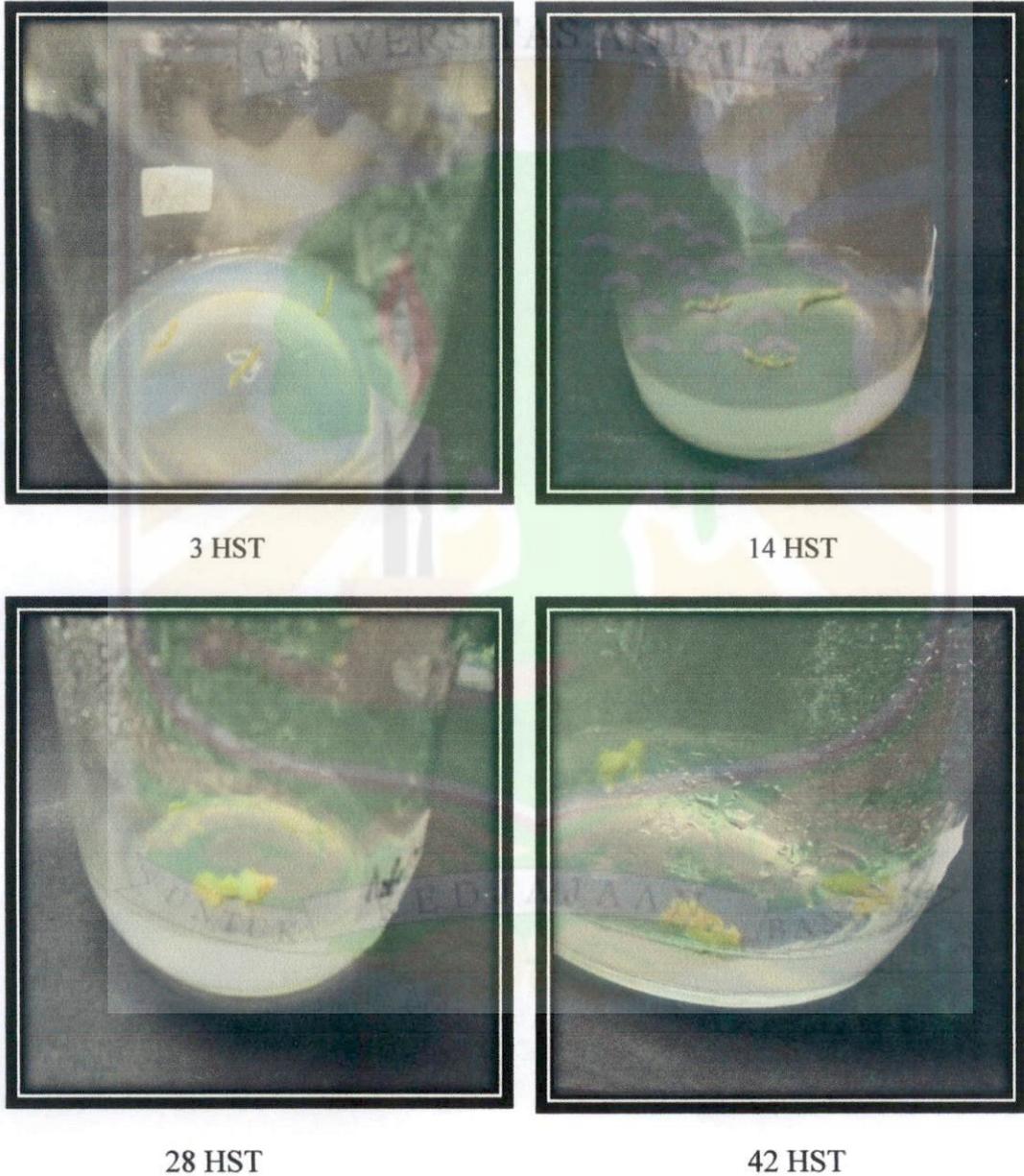
Pengamatan dilakukan setiap minggu setelah tanam dengan cara mengamati perubahan warna dan waktu (minggu) perubahan warna pada kalus. Data warna kalus yang ditampilkan adalah warna kalus pada terakhir pengamatan yaitu pada minggu terakhir setelah tanam.



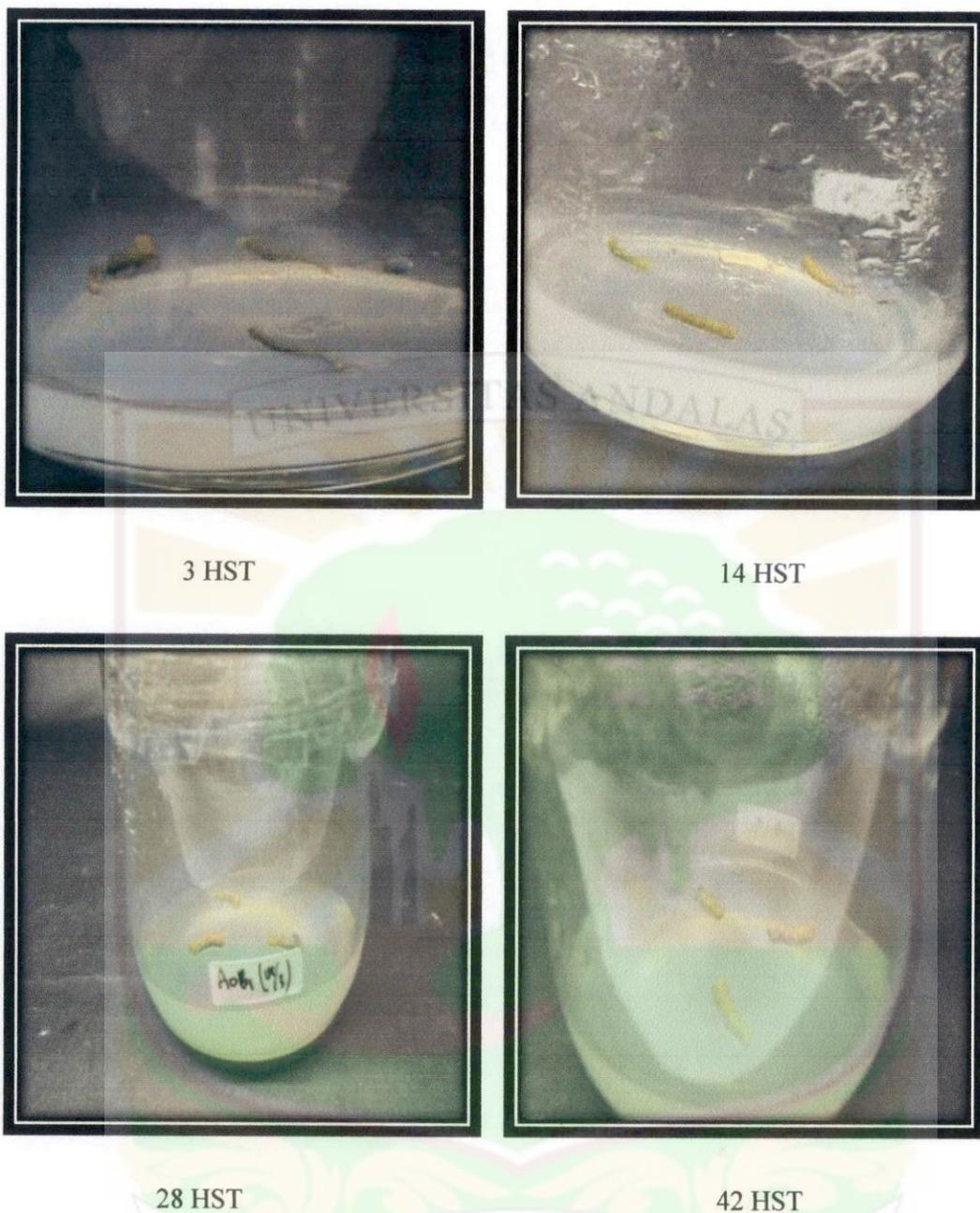
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kondisi Umum Penelitian

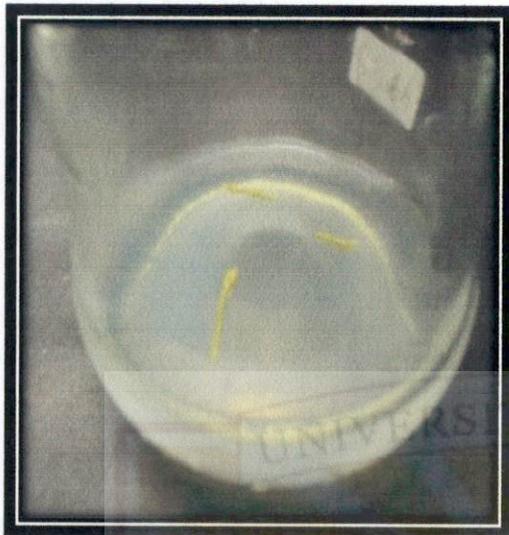
Kondisi umum perkembangan eksplan akar jeruk kacang pada media MS dan berbagai kombinasi NAA dan BAP dari umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST (Hari Setelah Tanam), dapat dilihat pada Gambar 1 sampai Gambar 9.



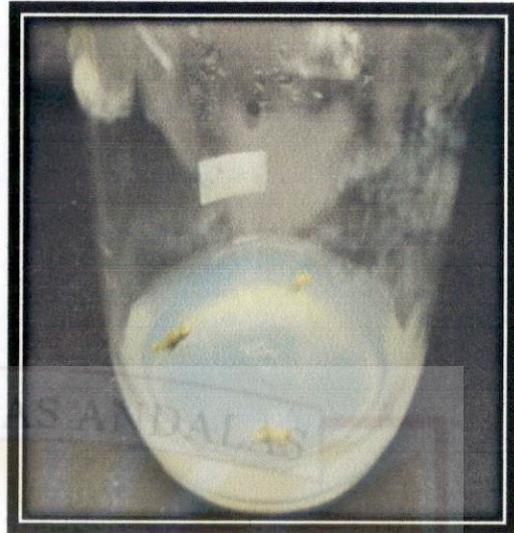
Gambar 1. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (1 mg NAA + 1 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST.



Gambar 2. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (1 mg NAA + 2 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST.



3 HST



14 HST

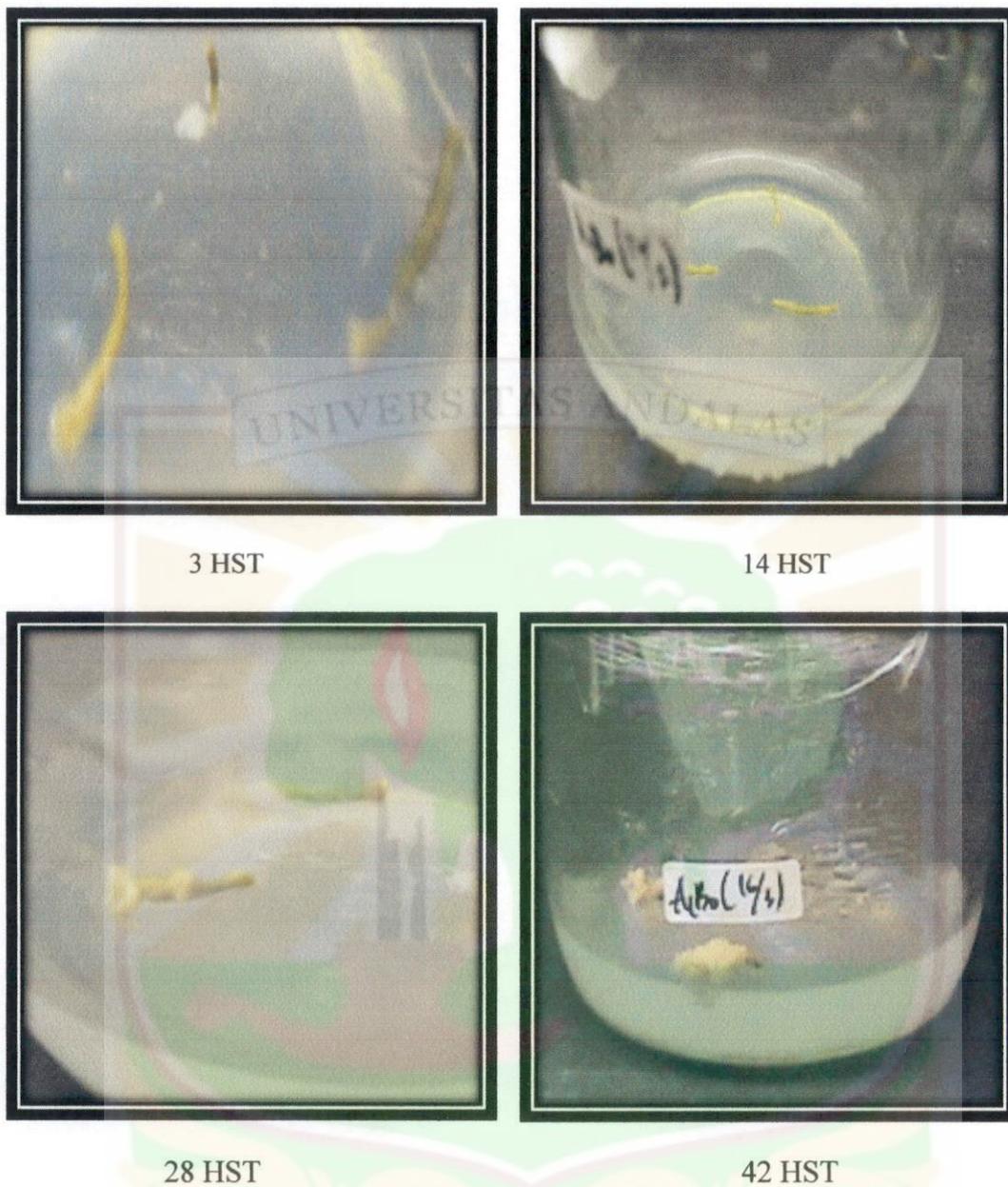


28 HST

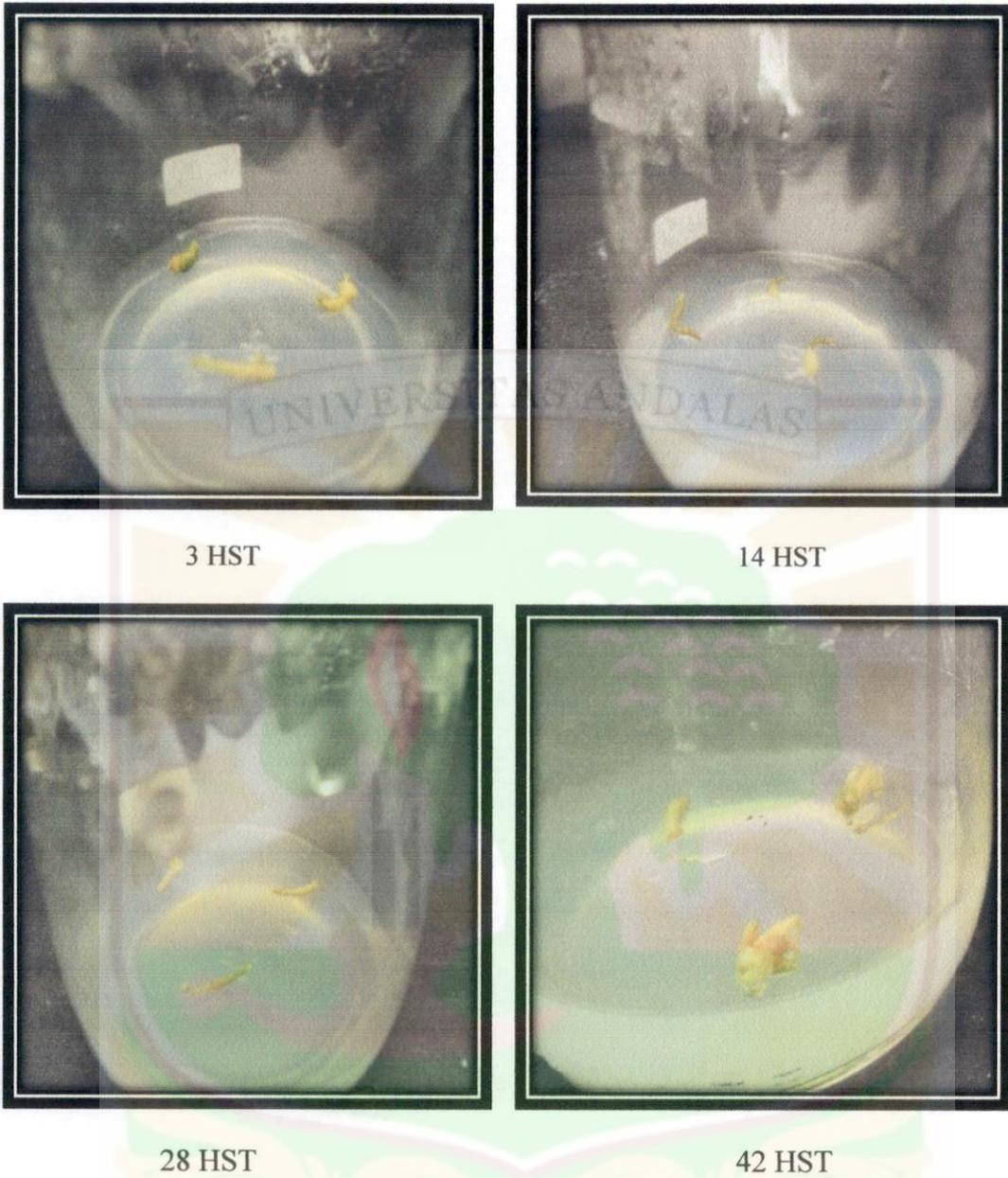


42 HST

Gambar 3. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (1 mg NAA + 3 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST.



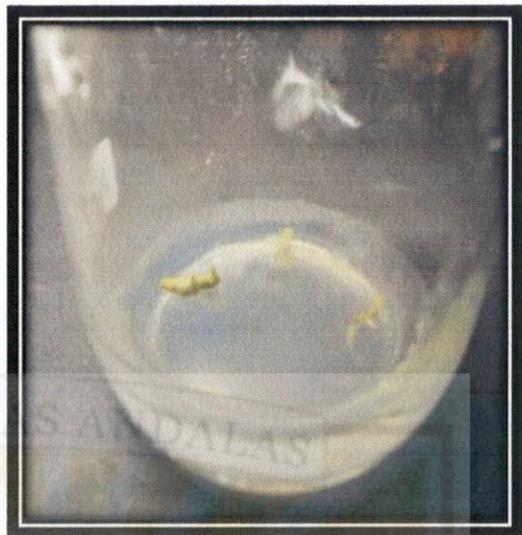
Gambar 4. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (2 mg NAA + 1 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST.



Gambar 5. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (2 mg NAA + 2 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST.



3 HST



14 HST

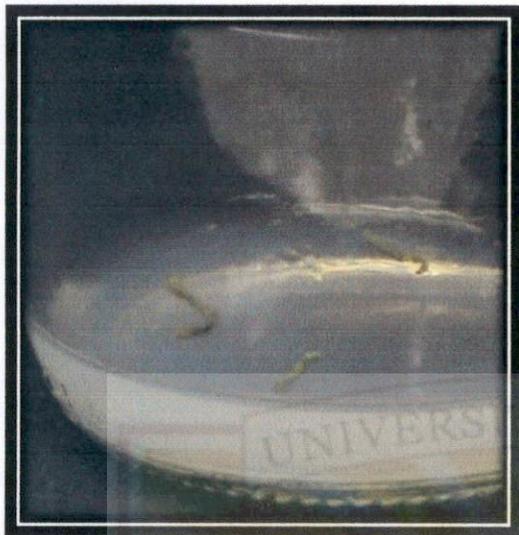


28 HST



42 HST

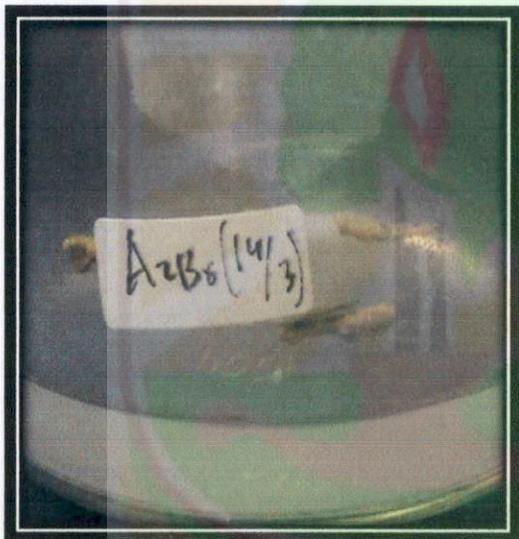
Gambar 6. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (2 mg NAA + 3 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST.



3 HST



14 HST



28 HST



42 HST

Gambar 7. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (3 mg NAA + 1 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST.



Gambar 8. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (3 mg NAA + 2 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST.



Gambar 9. Perkembangan eksplan akar jeruk kacang selama proses pengkulturan pada media MS dengan kombinasi (3 mg NAA + 3 mg BAP)/l pada umur 3 HST hingga eksplan akar berumur 42 HST.

Kondisi perkembangan penelitian secara umum menunjukkan eksplan akar jeruk kacang mulai membengkak sebagai cikal bakal terbentuknya kalus pada umur 3 HST pada kombinasi (A_2B_2) dengan konsentrasi 3 mg NAA+ 3 mg BAP/l, disusul kombinasi (A_2B_1) dengan konsentrasi 3 mg NAA+ 2 mg BAP/l. Perkembangan penelitian terus berkembang pada eksplan akar jeruk kacang sebagai cikal bakal terbentuknya kalus pada umur 14 HST dengan kombinasi (A_0B_0),(A_0B_1),(A_1B_0),(A_1B_2). Pada kombinasi (A_2B_1) kalus mulai menyelimuti bagian eksplan, sedangkan kombinasi (A_2B_2) kalus bertambah besar, pada kombinasi (A_0B_2),(A_1B_1),(A_2B_0) belum ada tanda cikal bakal terbentuknya kalus. Eksplan akar jeruk kacang mulai membesar pada umur 28 HST dengan kombinasi (A_0B_0),(A_0B_1),(A_1B_0),(A_1B_2). Kombinasi (A_2B_1) kalus berkembang dan membesar, kombinasi (A_2B_2) kalus terlihat lebih jelas, sedangkan pada kombinasi (A_0B_2),(A_1B_1),(A_2B_0) mulai terbentuknya kalus. Pada umur 42 HST pada kombinasi (A_0B_0),(A_0B_1),(A_1B_0),(A_1B_2) terdapat berbagai warna kalus. Pada kombinasi (A_2B_1) kalus eksplan akar terlihat lebih jelas dan membesar, kombinasi (A_2B_2) kalus eksplan akar lebih cepat besar, sedangkan pada kombinasi (A_0B_2), (A_1B_1),(A_2B_0) kalus mulai menyelimuti bagian eksplan akar jeruk kacang.

4.2. Persentase Eksplan Hidup

Eksplan yang mati dicirikan dengan eksplan yang tidak terlihat pertumbuhannya dan mati bukan karna kontaminasi mikro organisme, sedangkan eksplan yang hidup dicirikan dengan adanya pertumbuhan dan perkembangan pada eksplan atau tidak tumbuh tapi masih bisa survive di lingkungannya, dalam hal ini media tumbuh dalam botol. Data pengamatan pada beberapa kombinasi perlakuan antara NAA dan BAP yang telah dilakukan hingga umur 12 MST, diperoleh hasil untuk persentase eksplan yang hidup seperti yang tertera pada Tabel 1. Data yang tertera pada Tabel 1 menunjukkan persentase eksplan yang berasal dari akar jeruk kacang yang ditanam pada media perlakuan memiliki kemampuan hidup yang cukup tinggi, yang ditandai dengan hampir seluruh eksplan yang ditanam bertahan hidup pada minggu ke-12 setelah tanam.

Tabel 1. Persentase eksplan akar jeruk kacang yang hidup (12 MST)

Konsentrasi NAA (mg/l)	Konsentrasi BAP (mg/l)		
	1,0	2,0	3,0
1,0	96,29	77,77	92,59
2,0	92,59	96,29	96,29
3,0	77,77	100,00	96,29

Persentase eksplan akar tertinggi yang hidup terdapat pada eksplan akar dengan pemberian kombinasi 3,0 mg NAA + 2,0 mg BAP /l yaitu sebesar 100%. Kemampuan hidup dari eksplan akar jeruk kacang pada media perlakuan menunjukkan rata-rata kemampuan hidup diatas 90%. Hal ini diduga karena media dan zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam penelitian ini sudah memenuhi persyaratan untuk mempertahankan kehidupan eksplan jeruk kacang.

Kemampuan hidup eksplan pada kultur *in vitro* sangat tergantung dari eksplan itu sendiri, jenis dan komposisi media sangat mempengaruhi besarnya ketersediaan zat makanan bagi eksplan sehingga secara langsung dapat mempengaruhi besarnya daya tahan eksplan untuk hidup pada media tersebut, sedangkan zat pengatur tumbuh endogen dan eksogen berpengaruh terhadap besarnya penyerapan zat makanan yang tersedia dalam kultur *in vitro*.

Menurut Abidin (1993), auksin berperan dalam menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein serta meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel sehingga membantu dalam proses penyerapan nutrisi yang berada dalam media kultur *in vitro*. Gunawan (1988), peran fisiologis dari sitokinin adalah mendorong pembelahan sel, pembentukan morfogenesis tanaman, pembentukan tunas, serta menghambat *senescence* dan absisi. Perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh dari sembilan media perlakuan, berpengaruh terhadap kemampuannya dalam mendorong kehidupan eksplan. Walaupun demikian tidak semua eksplan akar jeruk kacang yang hidup dapat berkembang membentuk kalus (Gambar 10).



Gambar 10. Perbandingan eksplan akar hingga akhir pengamatan, pada kombinasi (2 mg NAA + 3 mg BAP)/l.

Beberapa diantaranya tetap berbentuk eksplan dengan warna yang hijau, hal ini diduga karena aktifnya klorofil pada eksplan tersebut akibat adanya interaksi eksplan dengan cahaya selama proses pengkulturan. Aktifnya klorofil dengan indikasi warna yang hijau menunjukkan jaringan eksplan tersebut masih hidup, jaringan eksplan yang mati akan berwarna kuning dan selanjutnya menjadi coklat (Gambar 11).



Gambar 11. Perbandingan eksplan hidup dengan eksplan yang telah mati

Wattimena (1992) menyatakan bahwa selain media dan zat pengatur tumbuh, pertumbuhan dan morfogenesis tanaman juga dipengaruhi oleh genotipe, lingkungan tumbuh, keadaan fisik tempat kultur ditumbuhkan dan fisiologis jaringan eksplan yang digunakan. (Wetherell, 1991) Setiap spesies tanaman yang sama dengan umur yang berbeda mempunyai kemampuan regenerasi yang berbeda jika diperbanyak melalui kultur jaringan.

4.3. Persentase Eksplan Membentuk Kalus

Kalus merupakan sekumpulan sel yang belum terdiferensiasi dan dinyatakan telah terbentuk kalus bila pada permukaan terbentuk sel-sel yang tidak terorganisir yang berwarna putih kompak atau kekuningan, hal ini dapat terjadi pada salah satu sisi permukaan. Data Pengamatan antara NAA dan BAP pada beberapa kombinasi perlakuan yang telah dilakukan hingga umur 12 MST, diperoleh hasil untuk persentase eksplan akar yang membentuk kalus seperti yang tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase eksplan akar jeruk kacang yang membentuk kalus (12 MST)

Konsentrasi NAA (mg/l)	Konsentrasi BAP (mg/l)		
	1,0	2,0	3,0
1,0	48,14	44,44	40,74
2,0	55,55	40,47	37,03
3,0	51,85	85,18	66,66

Data yang tertera pada Tabel 2 menunjukkan, bahwa pemberian 3,0 mg NAA + 2,0 mg BAP/l jumlah kalus yang terbentuk hanya tiga belas dari 27 eksplan akar yang ditanam pada media MS yang menunjukkan persentase pembentukan kalus tertinggi 85,18% , lalu diikuti dengan perlakuan 3,0 mg NAA + 3,0 mg BAP/l sebesar 66,66% dan persentase pembentukan kalus terendah terdapat pada pemberian 2,0 mg NAA + 3,0 mg BAP/l yang hanya sepuluh dari 27 eksplan akar yang ditanam pada media MS, yang berarti 37,03% dari total eksplan akar yang ditanam pada media perlakuan tersebut.

Perbedaan respon dari berbagai perlakuan yang diberikan dengan pemberian 3,0 mg NAA + 2,0 mg BAP/l menunjukkan hasil yang paling baik dalam menginduksi terbentuknya kalus. Terbentuknya kalus 85,18% pada konsentrasi 3,0 mg NAA + 2,0 mg BAP/l diduga karena konsentrasi sudah merupakan konsentrasi NAA dan BAP yang optimum dalam menginduksi jaringan eksplan akar jeruk kacang, sehingga dapat menginduksi 85,18% jaringan eksplan akar

menjadi kalus. George dan Sherrington (1984) menyatakan bahwa bertambah besarnya persentase kalus yang terbentuk pada kultur jaringan tergantung konsentrasi auksin yang digunakan pada pembentukan kalus dibutuhkan auksin pada konsentrasi tinggi. Munculnya kalus ini diduga karena terjadinya perubahan keseimbangan dari auksin dan sitokinin endogen yang terdapat pada jaringan eksplan akar jeruk kacang akibat dari penambahan NAA yang menghambat morfogenesis jaringan eksplan akar, dan merangsang terbentuknya kalus dan BAP merupakan senyawa yang menyebabkan pembelahan sel (Gambar 12).



Gambar 12. Perkembangan kalus

Tingginya kemampuan hidup eksplan yang ditanam karena jenis medium dan zat pengatur tumbuh yang diberikan telah memenuhi kebutuhan hidup tanaman. Medium yang digunakan untuk nutrisi eksplan akar jeruk kacang terdiri dari unsur-unsur makro dan mikro, sumber karbon, vitamin, asam amino dan zat pengatur tumbuh. Semuanya merupakan unsur-unsur yang dibutuhkan oleh jaringan tanaman untuk meneruskan metabolisme hidup, sehingga eksplan yang ditanam masih dapat melaksanakan aktifitas untuk tumbuh dan berkembang serta tetap bertahan hidup. Widiastoety (1987), menyatakan bahwa pembentukan kalus biasanya terjadi jika perbandingan antara konsentrasi auksin dan sitokinin seimbang. Sumardi (1996) menyatakan, bahwa pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh beberapa faktor terutama yang berhubungan langsung dengan eksplan seperti ketersediaan energi, tempat eksplan tumbuh dan zat pengatur tumbuh terutama auksin dan sitokinin dalam media kultur dengan keseimbangan tertentu.

4.4. Diameter Kalus

Media dan zat pengatur tumbuh yang sesuai untuk pertumbuhan kalus akan meningkatkan kemampuan sel untuk terus membelah, akibatnya sel-sel baru terus bertambah sehingga diameternya meningkat atau bertambah besar. Data Pengamatan antara NAA dan BAP pada beberapa kombinasi perlakuan yang telah dilakukan hingga umur 12 MST, diperoleh hasil untuk diameter kalus seperti yang tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata – rata diameter kalus eksplan akar jeruk kacang setelah diberi perlakuan dengan berbagai kombinasi NAA dan BAP (12 MST)

Konsentrasi NAA (mg/l)	Diameter kalus akar jeruk kacang (cm)		
	Konsentrasi BAP (mg/l)		
	1,0	2,0	3,0
1,0	2,9	2,9	3,1
2,0	2,8	2,7	3,3
3,0	3,9	8,4	4,4

Tabel 3 dapat dilihat bahwa diameter kalus tertinggi terdapat pada kombinasi NAA dan BAP dengan konsentrasi 3,0 mg + 2,0 mg/l yaitu 8,4 cm, faktor yang menyebabkan tingginya diameter kalus akar jeruk kacang adalah zat pengatur tumbuh golongan auksin lebih tinggi dari pada zat pengatur tumbuh golongan sitokinin. Diameter kalus yang terendah terdapat pada media dengan kombinasi 2,0 mg NAA + 2,0 mg BAP/l, berbanding lurusnya antara kombinasi NAA dan BAP menyebabkan rendahnya diameter kalus akar jeruk kacang.

Menurut Lakitan (1996), pemberian zat pengatur tumbuh dalam konsentrasi yang sesuai dapat meningkatkan morfogenesis tanaman, tetapi apabila zat pengatur tumbuh diberikan dalam konsentrasi yang berlebihan maka akan menjadi penghambat bagi pertumbuhan morfogenesis tanaman. Gunawan (1998) menyatakan interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan diproduksi oleh sel secara endogen akan menentukan arah perkembangan suatu kultur. Penambahan auksin dan sitokini eksogen, mengubah level zat pengatur tumbuh endogen sel.

Media dengan penambahan auksin maupun dalam peningkatan diameter kalus, pernyataan ini diperkuat oleh pendapat Pierik (1987) auksin mampu meningkatkan pemanjangan sel. (Smith, 1992) pada konsentrasi auksin yang tinggi mampu mendorong pembentukan kalus dan menekan morfogenesis. Selain zat pengatur tumbuh yang diberikan pada media, lingkungan juga mempengaruhi. Lingkungan merupakan faktor utama dalam penentu keberhasilan kultur jaringan dalam pengaturan suhu, kelembaban, serta cahaya. Kyte (1983), pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan seperti cahaya dan suhu dan kedua kelompok zat pengatur tumbuh, auksin dan sitokinin berinteraksi dengan zat kimia lain pada media kultur.

4.5. Volume Kalus

Secara fisiologis auksin berperan dalam mendorong pembesaran dan pemanjangan sel sehingga semakin besar dan panjang sel dalam hal akan dapat meningkatkan volume kalus. Data pengamatan antara NAA dan BAP pada beberapa kombinasi perlakuan yang telah dilakukan hingga umur 12 MST, diperoleh hasil untuk volume kalus seperti yang tertera pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata – rata volume kalus eksplan akar jeruk kacang setelah diberi perlakuan dengan berbagai kombinasi NAA dan BAP (12 MST)

Konsentrasi NAA (mg/l)	Volume kalus akar jeruk kacang (cc)		
	Konsentrasi BAP (mg/l)		
	1,0	2,0	3,0
1,0	1,4	1,3	1,2
2,0	2,2	1,2	1,1
3,0	2,1	5,9	2,6

Tabel 4 terlihat bahwa volume kalus yang terbesar pada kombinasi 3,0 mg NAA + 2,0 mg BAP/l yaitu 5,9 ml. Hasil tersebut memberikan gambaran bahwa media dengan pemberian kombinasi 3,0 mg NAA + 2,0 mg BAP/l mampu memberikan hasil yang terbaik dalam memperbesar volume kalus eksplan akar jeruk kacang. Volume kalus eksplan akar jeruk kacang yang paling rendah terdapat pada media dengan kombinasi 2,0 mg NAA + 3,0 mg BAP/l. Wattimena

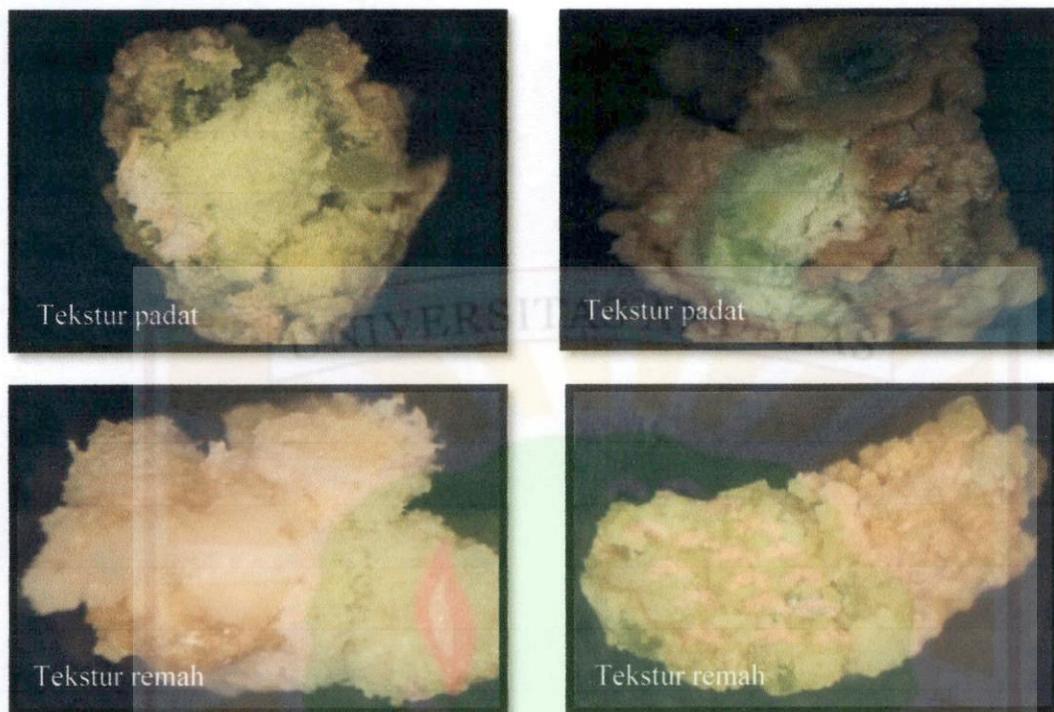
(1987) pertumbuhan kalus akan terjadi apabila konsentrasi auksin lebih tinggi dari pada sitokinin. (Fermila, 2005) Penambahan sitokinin (BAP) yang tinggi kedalam media dapat menghambat pembentukan kalus sehingga cenderung menurunkan volume kalus.

Auksin memberikan pengaruh terhadap aspek perkembangan eksplan, seperti perpanjangan sel dengan cara mempengaruhi metabolisme dari dinding sel. (Heddy, 1996) auksin menyebabkan bahan yang dihasilkan oleh dinding sel primer ditranslokasikan ke ujung bagian tunas dan akar, akibatnya ujung tunas dan akar mengalami perpanjangan sel. Menurut Gunawan (1987), zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan diperlukan untuk mengendalikan dan mengatur pertumbuhan kultur tanaman. Zat ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan dan organ. (George dan Sherington, 1984) Pertumbuhan dan morfogenesis secara *in-vitro* diatur oleh interaksi dan keseimbangan antara hormon tanaman yang ditambahkan pada medium (hormon eksogen) dan hormon tanaman (hormon endogen) yang dihasilkan sendiri oleh sel yang dikulturkan. (Hendaryono dan Wijayani, 1994) Pemberian hormon eksogen akan menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesis protein dan permeabilitas sel terhadap air, serta melunakkan dinding sel yang diikuti dengan menurunnya tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel dan sel akan memperbesar dan memanjang.

4.6. Tekstur Kalus

Pengamatan tekstur kalus dilakukan pada minggu terakhir setelah tanam. Pengamatan ini menggunakan mikroskop untuk memperjelas melihat tekstur kalus yang terbentuk, hasil pengamatan dijelaskan secara deskriptif. Hasil pengamatan didokumentasikan menggunakan kamera digital, sehingga didapatkan kesimpulan bahwa perlakuan berbagai kombinasi NAA dan BAP bertekstur padat dan bertekstur remah. Hasil pengamatan dapat dilihat pada (Gambar 13). Pada penelitian ini ditemukan tekstur kalus yang padat dan kalus yang bertekstur remah. Wattimena *et al.* (1992) bahwa pembentukan kalus atau organ pada teknik kultur *in vitro* lebih dipengaruhi oleh genotipe sumber jaringan atau bahan yang digunakan sebagai eksplan. Kalus yang dihasilkan dari jaringan tanaman yang

berasal dari varietas-varietas yang cukup dekat juga dapat berbeda dalam tekstur, warna dan kemampuan morfogenesisnya.



Gambar 13. Tekstur kalus eksplan akar jeruk kacang secara umum hasil mikroskop (10 kali pembesaran) pada umur 12 MST.

Bentuk kalus kompak adalah kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang kuat dan keras. Biasanya struktur kalus menggambarkan daya regenerasinya membentuk tunas dan akar. Kalus yang berbentuk remah dan terdapat globular (nodul-nodul) berwarna bening biasanya mempunyai kemampuan lebih tinggi untuk membentuk tunas dari pada kalus yang bersifat kompak dan berwarna coklat-kehitaman. Dalam hal ini media yang digunakan untuk memacu regenerasi kalus akan sangat menentukan. Keseimbangan nutrisi dalam media tumbuh sangat mempengaruhi pertumbuhan kalus maupun diferensiasinya membentuk tunas (Purmaningsih, 2002). Morfogenesis eksplan tergantung kepada keseimbangan auksin dan sitokinin di dalam media dan interaksi antara zat pengatur tumbuh endogen di dalam tanaman dan zat pengatur tumbuh eksogen yang diserap dari media tumbuh (Wattimena, 1992).

Salisbury dan Ross (1995) juga menyatakan bahwa tumbuhan merupakan makhluk hidup yang melakukan berbagai aktifitas agar tetap bertahan hidup, yakni dengan melakukan pengangkutan air dan bahan molekul organik serta

melakukan reaksi kimia yang terjadi di dalam setiap sel hidup. Reaksi kimia tersebut mengubah air, garam mineral dan gas dari lingkungan menjadi jaringan yang terorganisasi serta berbagai organ tumbuhan.

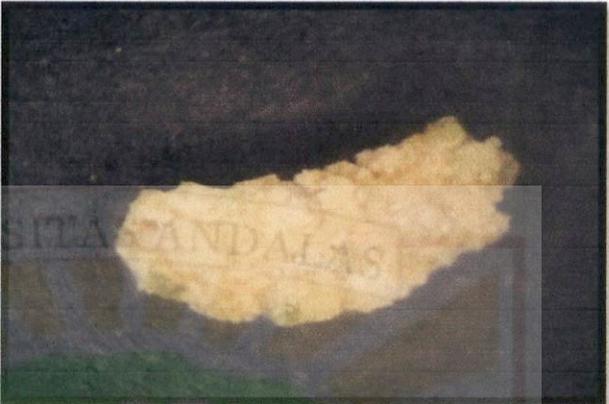
Sesuai dengan pendapat yang dikemukakan oleh Wareing dan Philips (1981) bahwa tanggap tanaman terhadap hormon dan zat pengatur tumbuh sangatlah bervariasi tergantung pada kepekaan organ tanaman tersebut. Bekerjanya hormon tumbuh yang diberikan pada jaringan tanaman yang tanggap, akan membawa perubahan yang akibatnya dapat diukur pada pengaruh fisiologis dan morfologis tanaman. Pengaruh tersebut juga tergantung pada ekspresi genetik dan status sel-sel yang menanggapi.

4.7. Warna Kalus

Pengamatan warna kalus dilakukan secara visual. Terdapat variasi warna kalus eksplan akar jeruk kacang setelah diberi perlakuan dengan berbagai kombinasi NAA dan BAP. Variasi warna dapat dilihat pada Tabel 5, dapat dilihat pada Tabel 5 terdapat 5 variasi warna kalus eksplan akar jeruk kacang setelah diberi perlakuan NAA dan BAP yang berbeda. Variasi warna kalus tersebut terdiri dari 5 kalus hijau kecoklatan yang dapat membentuk organogenesis, 1 kalus putih kecoklatan yang dapat membentuk embriogenesis, 1 kalus hijau keputihan, 1 kalus hijau dan 1 kalus berwarna coklat. Warna eksplan akar pada saat ditanam pada umumnya berwarna hijau dan putih kecoklatan, hal ini dipengaruhi oleh berbagai media yang diberikan sebelumnya.

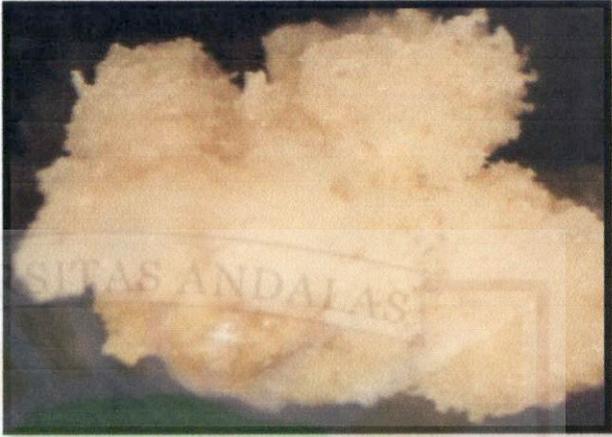
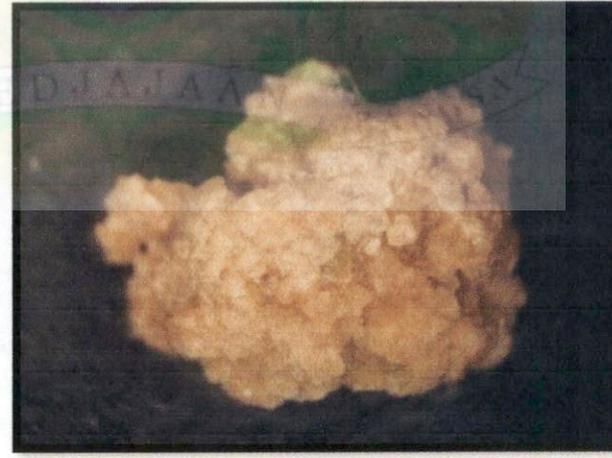
Pada penelitian ini tidak ditemukan warna kalus hijau kekuningan ataupun bening. Hal ini diduga karena dipengaruhi oleh sumber eksplan, umur eksplan dan mutagen. Warna kalus terbaik terdapat pada berbagai kombinasi perlakuan yang berbeda yaitu dengan warna kalus hijau kecoklatan. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) sel-sel muda yang sehat akan menunjukkan warna kuning bening, namun akan berubah menjadi kecoklatan seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua dan kondisi warna kalus yang dapat ditemukan bervariasi disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan.

Tabel 5. Variasi warna kalus eksplan akar jeruk kacang pada berbagai kombinasi NAA dan BAP (12 MST)

No.	Konsentrasi (mg/l)	Warna Kalus
1.	1,0 NAA + 1,0 BAP	 <p data-bbox="799 788 1023 821">Hijau Kecoklatan</p>
2.	1,0 NAA + 2,0 BAP	 <p data-bbox="799 1295 1023 1327">Hijau Kecoklatan</p>
3.	1,0 NAA + 3,0 BAP	 <p data-bbox="799 1841 1023 1873">Hijau Kecoklatan</p>

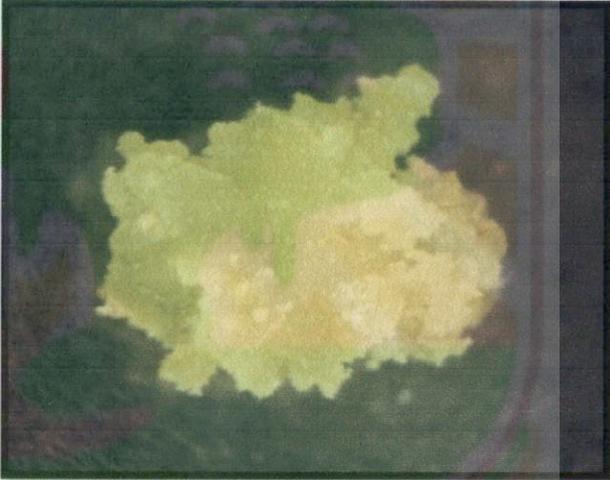
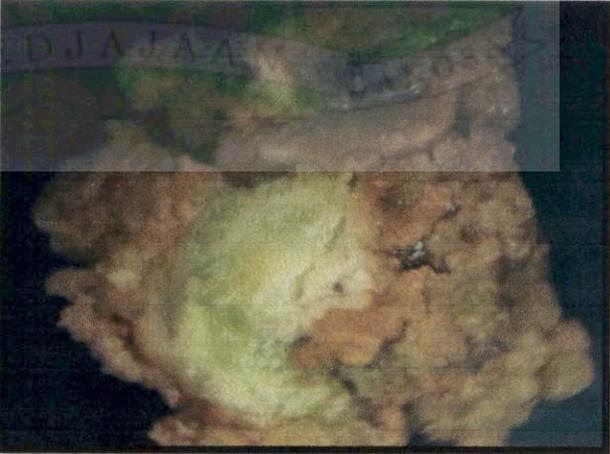
Berlanjut...

Tabel 5. (Lanjutan)

No.	Konsentrasi (mg/l)	Warna Kalus
4.	2,0 NAA + 1,0 BAP	 <p data-bbox="771 777 999 810">Putih Kecoklatan</p>
5.	2,0 NAA + 2,0 BAP	 <p data-bbox="771 1312 999 1345">Hijau Kecoklatan</p>
6.	2,0 NAA + 3,0 BAP	 <p data-bbox="841 1884 935 1917">Coklat</p>

Berlanjut...

Tabel 5. (Lanjutan)

No.	Konsentrasi (mg/l)	Warna Kalus
7.	3,0 NAA + 1,0 BAP	 <p data-bbox="781 751 999 786">Hijau Keputihan</p>
8.	3,0 NAA + 2,0 BAP	 <p data-bbox="851 1340 929 1375">Hijau</p>
9.	3,0 NAA + 3,0 BAP	 <p data-bbox="775 1921 1005 1956">Hijau Kecoklatan</p>

Pada penelitian ini banyak ditemukan kalus yang berwarna coklat. Hal ini dipengaruhi cahaya, dengan pemberian beberapa konsentrasi NAA dan BAP warna kalus menjadi lebih bervariasi. Gunawan (1987) menambahkan bahwa kalus yang berwarna kekuningan cenderung bersifat embriogenetik. Warna kalus kecoklatan, kehijauan, atau putih cenderung tidak embriogenik, warna hijau yang tampak pada kalus menunjukkan bahwa jaringan mampu untuk berdeferensiasi. Morfologi dan sifat kalus melibatkan suatu hubungan yang kompleks antara eksplan, kombinasi medium dan kondisi lingkungan kultur.

Winata (1995) menyatakan suatu eksplan yang ditanam dalam medium akan menunjukkan pertumbuhan dan perkembangan tertentu. Arah pertumbuhan dan perkembangan regenerasi ditentukan oleh beberapa hal yakni: komposisi medium dan zat pengatur tumbuh yang digunakan (jenis zat pengatur tumbuh dan konsentrasinya), serta bagian tanaman yang dijadikan eksplan dan lingkungan tempat tumbuhnya.

Wattimena (1988) Sitokinin yang ditambahkan dalam media mampu menghambat proses perombakan butir-butir klorofil karena sitokinin mampu mengaktifkan proses metabolisme dan sintesis protein.

Tanda bahwa kalus yang diregenerasikan dapat membentuk tunas antara lain terjadinya perubahan warna dari kecoklatan atau dari kuning menjadi putih kekuningan selanjutnya menjadi kehijauan, perubahan warna tersebut merupakan tanda adanya morfogenesis (Mariska dan Lestari, 2003). Warna kalus kehijauan diduga karena konsentrasi BAP yang terdapat pada media setara atau lebih tinggi dari pada konsentrasi NAA, BAP sebagai sitokinin memacu pembentukan klorofil, sebaliknya auksin bisa menjadi penghambat.

Abidin (1993) zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah fisiologi tumbuhan komposisi dan konsentrasi hormon pertumbuhan yang ditambahkan ke dalam media sangat mempengaruhi arah pertumbuhan dan regenerasi eksplan yang dikulturkan dan tujuan pengkulturannya.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilaksanakan dapat diambil kesimpulan bahwa semua kombinasi perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini telah mampu mendorong kehidupan eksplan akar jeruk kacang hingga 100%, dan membentuk kalus dengan persentase tertinggi 85%. Semakin tinggi pemberian NAA semakin besar didapatkan diameter dan volume kalus eksplan akar jeruk kacang. Warna kalus eksplan akar jeruk kacang yang dihasilkan adalah: warna hijau, hijau keputihan, hijau kecoklatan, putih kecoklatan dan coklat. Tekstur kalus yang terbentuk adalah berstruktur padat dan berstruktur remah. Berdasarkan persentase eksplan hidup, persentase kalus, diameter kalus dan volume kalus, pemberian (3,0 mg NAA + 2,0 mg BAP)/l merupakan kombinasi terbaik diantara kombinasi lain.

5.2. Saran

Dari kesimpulan diatas disarankan untuk menggunakan media MS dengan memberikan ZPT auksin lebih tinggi dari sitokinin untuk mendorong pembentukan kalus, karena pada penelitian ini eksplan akar jeruk kacang yang membentuk kalus baru mencapai 85%. Dapat juga dilakukan penelitian lanjutan dengan meregenerasi kalus akar jeruk kacang menjadi *plantlet*, dan menggunakan berbagai eksplan jeruk kacang.

DAFTAR PUSTAKA

- AAK. 1994. *Budidaya Tanaman Jeruk*. Jakarta : Kanisius. 206 Hal.
- Abidin, Z. 1993. *Dasar-dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Angkasa. Bandung. 85 hal
- Button, J. and J. Kochba. 1977. Tissue culture in citrus industry. In: Reinert, J and Y. P. S. Bajaj (ed): *Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue, and organ culture*. Narosa Publishing House. New Delhi. Bombai.p 71-92.
- Comacho-Bustos, S. 1983 *cit Ferita*, dkk (2000). *Managing fruit-tree nurseries*. Lads. Nort kenth st Arlington, Virginia. USA. P:1 – 6.
- Ditjen Hortikultura. 2008. *Pengembangan Jeruk Keprok Nasional*.Deptan.go.id. <http://www.deptan.go.id/news/detailarsip.php?id=407>. [09 Januari 2011].
- Dodds, J. H. and L. W. Roberts. 1982. *Experiment in plant tissue culture*. Cambrige University Press.Cambrige.171 p.
- Fahn, A. 1991. *Anatomi Tumbuhan III*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 934 hal.
- Fermila, E.Y. 2005. Pengaruh Konsentrasi NAA dan BAP dalam menginduksi Kalus Biji Muda Melinjo (*Gnetum gnemon* L) secara in vitro. [Skripsi]. Padang. Fakultas Pertanian Universitas Andalas.
- Gamborg, O. L. and J. P. Shyluk. 1981. Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue culture. In: T. A. Thorpe (ed.): *plant tissue culture, method and aplication in agriculture*. Academic press. New York. p 45-112.
- George, E. F. and P. D, Sherington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Handbook and directory of comerciai laboratory. Exegetics Ltd. England. 709 p.
- Giladi, I, A. Altman. and R. Goren. 1977. *Plant phisiology*. Dept of Hortikultura. The Hebrew University of Jarussalem. Israel. p 1161-1164.
- Gunawan, L. W. 1987. *Teknik kultur jaringan*. Labor kultur jaringan tanaman. Pusat Antar Universitas (PAU). IPB. Bogor. 252 hal.
- Gunawan, L. W. 1988. *Teknik kultur jaringan tumbuhan*. PAU Bioteknologi. IPB. Bogor 304 hal.
- Gunawan, L. W. 1995. *Teknik kultur in-vitro dalam hortikultura*. Penerbit Penebar Swadaya Jakarta.115 Hal.
- Hayati, R. 2001. Aklimatisasi Tanaman Kentang Stek Mikro Dengan Mediumi Arang Sekam Pada Beberapa Jenis Pupuk Daun. [Skripsi]. Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Padang. 43 hal.

- Heddy, S. 1989. Hormon tumbuhan. C. V. Rajawali Jakarta. 65 hal.
- Heddy, S. 1996. Hormon Tumbuhan. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 97 hal.
- Hendaryono, D. P. S. and Wijayani, A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan, Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman Secara Vegetatif Modern*. Yogyakarta. Kanisius. 139 hal
- Hussey, G. 1981. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum*) Ann. Bot. P: 787 – 796.
- Jahja, D. and Sutoyo. 1991. Usaha memproduksi bibit jeruk bebas CVPD lewat kultur meristem apikal jeruk kacang (*Citrus nobilis* L.) pada berbagai media dan komposisi zat pengatur tumbuh. Pusat Penelitian Universitas Andalas. 32 hal.
- Kitto, S. L. and M. J. Young. 1981. *In vitro* propagation of carrizo citrange. Hort Science 16 (3) : p 305-306
- Kyte, L. 1983. Plant From Test Tubest: An Introduction to micropopagation. Portland, Oregon: Timber Press.
- Lakitan, B. 1996. Fisiologi Tumbuhan dan Perkembangan Tanaman. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta 218 hal.
- Mariska, I. and Purnamangsih, P. 2001. *Perbanyakan vegetative tanaman tahunan melalui kultur in – vitro*. Jurnal Litbang Pertanian. Volume I. No. 20. Padang. Hal 1 – 7.
- Mariska L. and E. G Lestari. 2003. *Pemanfaatan Kultur in vitro untuk meningkatkan Keragaman Genetik Tanaman Nilam*. Journal Penelitian dan Pengembangan Pertanian Badan Litbang Pertanian 2 (2):64-69.
- Murashige, T. C. 1974. Somatic plant cell. In Pul K. J. R. and MK Paterson, Jr (ed). Tissue Culture Methode an Application Academic Press. New York p: 170-172.
- Pierik, R. L. M. 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus. NUKHOFF Publ. Bostom. 334.
- Plantus, 2010. Aneka planta. wordpress.com/2010/01/29/bioteknologi-untuk-pelestarian-plasma-nutfah/
- Poespodarsono, S. 1988. Dasar – Dasar Ilmu Pemuliaan Tanaman. IPB. Bogor.
- Pracaya. 2001. Jeruk Manis, Varietas dan Budidaya. Penebar Swadaya : Jakarta.
- Purmaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa gen yang Mengendalikannya. Buletin Agro Bio, Vol.5 No.2. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Bogor. Hal. 51-58

- Pusposendjojo, N. 1991. Penerapan bioteknologi dalam pertanian. Buletin Pertanian.
- Rahmi, Atika Fathur. 2011. Kultur Nuselus Jeruk Kacang (*Citrus nobilis* L). Pada Berbagai Media Tumbuh Secara *in vitro*. [Skripsi]. Padang. Fakultas Pertanian Universitas Andalas.
- Rismunandar. 1977. *Bertanam jeruk*. PT. Gramedia. Jakarta. 159 hal.
- Roesmiyanto and Dwiastuti, 1986. Pengaruh Pemberian CVPD Dengan Oksitetrasiklin Terhadap Kualitas Jeruk Keprok. *Dalam Hortikultura* No. 19 : 625 – 628.
- Ronald. 1994. Pertumbuhan Nuselus Jeruk Kacang (*Citrus nobilis* L.) pada beberapa konsentrasi NAA dan BAP pada media basal Kitto dan Young. [Skripsi]. Padang. Fakultas Pertanian Universitas Andalas. 37 hal.
- Salisbury. F B. and C W . Ross. 1995. *Plant Physiology. Terjemahan* Lukman D R dan Sumaryono. Penerbit ITB Bandung. Bandung. 234 hal.
- Sarwono, B. 1990. Jenis-jenis keprok top. *Dalam Trubus*. Jakarta. XX. 251. Hal 152-154.
- Smith, E. F.. 1992. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiment*. New York: Academic Press Inc.
- Soeroyo, R. 1991. Situasi dan perkembangan jeruk; kendala, tantangan, dan prospek. Perencanaan Program Pengembangan jeruk. Risalah Lokakarya. Dept Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura. Jakarta. Hal 3-5.
- Suliansyah, Irfan. 2004. Karakterisasi Genotipe Jeruk (*Citrus* sp.) Indegenous Sumatera Barat Dengan Marka Molekuler RAPD. *J. Stigma XIII* (4) 520-525.
- Suliansyah, Irfan. 2009. *Buku Ajar Kultur Jaringan Tanaman*. Program Studi Agroekoteknologi. Fakultas Pertanian. Universitas Andalas. Padang. 200 hal.
- Sumardi. 1996. Penggunaan Arang Aktif Pada Beberapa Komposisi NAA dan BAP dalam kultur Durian (*Durio zibethinus*. Murr) Secara *In Vitro*. Thesis S2. Program Pasca Sarjana Universitas Andalas. Padang. 76 hal.
- Suryadi. 1982. Pembiakan Tanaman Dengan Cara Teknik Kultur *In Vitro* dari Berbagai Macam Jaringan Tanaman Jeruk Dalam Medium Murashige dan Skoog. Dept Agronomi. Fakultas Pertanian. IPB. Bogor. 29 hal.
- Syarief, E. 2004. Sebuah warisan di dusun kacang. *Dalam Trubus* 413/XXXV. Jakarta: Hal 69 – 70.

- Thorpe, T. A. 1981. Plant tissue culture, metode and application in agriculture. Acad. Press. New York. 379 p.
- Wareing, P. F. and I. D. J. Philips. 1981. Growth and differentiation in plant. Pargemon Press Tokyo. 342 p.
- Wattimena, G. A. 1988. Zat pengatur tumbuh tanaman. PAU IPB. Bogor. 145 hal.
- Wattimena, G. A. L. W Gunawan., A. Syamsudin., Wiendi, A. Ernawati. 1991. Bioteknologi Tanaman. PAU. IPB. Bogor.
- Wattimena, G. A. 1992. Pemuliaan tanaman secara *in vitro* dalam biotecnologi tanaman. PAU Bioteknologi. IPB, Bogor.
- Wattimena, G. A. L. W Gunawan, N. A Mattjik, E. Syamsudin, N. M. A. Wiendi, A. Ernawati. 1992. Bioteknologi Tanaman. PAU. IPB. Bogor.
- Wetherell, D. F. 1982. *Pengantar propagasi tanaman secara in vitro*. Koesoemardiyah, penerjemah. Fakultas Farmasi. Univ. Gadjah mada. 109 hal.
- Wetherell, D. F. 1991. Bioteknologi tanaman. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman IPB. Bogor. 507 hal.
- Wiendi, Wattimena, Gunawan, 1991. *Bioteknologi Tanaman*. Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Tanaman. PAU Bioteknologi. IPB. Bogor. 507 hal.
- Winata, L. G. 1995. Teknik kultur in vitro dalam hortikultura. Penebar Swadaya. Jakarta. 115 hal.
- Witjaksono. 1992. Kultur jaringan jeruk jepara. Hal 49-56. Di dalam: Prosiding seminar hasil penelitian dan pengembangan sumberdaya hayati. Pusat Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Hayati. Bogor. LIPI.
- Yusniwati, 2003. Kultur jaringan cara memperbanyak tanaman secara efisien. Agromedia Pustaka. Bogor
- Zairani, F. Y. 1997. Respon Kultur Pucuk Salak (*Salacca edulis Reinw*). Terhadap berbagai Konsentrasi NAA dan BAP pada Media MS dan WPM. [Tesis]. Padang. Fakultas Pertanian Universitas Andalas.

Lampiran 1. Deskripsi tanaman jeruk kacang*)

A. Keadaan Daun

1. Panjang : 7,5 cm
2. Lebar : 3,9 cm
3. Panjang tangkai : 1,3 cm
4. Bentuk : ovalis
5. Panjang sayap : 0,8 cm
6. Lebar sayap : 0,2 cm

B. Keadaan Buah

1. Ukuran : 5,5 cm x 5,9 cm
2. Bentuk : elips
3. Permukaan : halus
4. Panjang tangkai : 3 mm
5. Diameter : 2,6 mm
6. Tebal kulit : 2,1 mm

C. Keadaan Biji

1. Jumlah bij perbuah : 14
2. Ukuran : 0,3 cm
3. Warna : krem

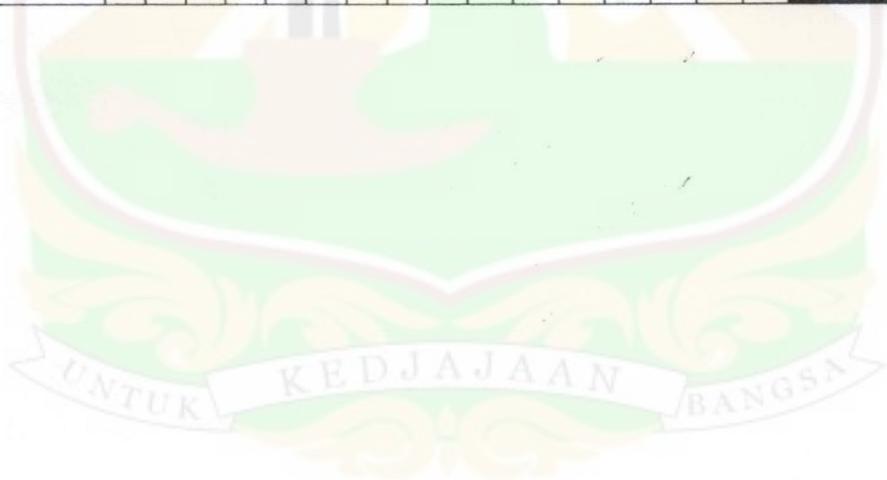
D. Keadaan Bunga

1. Diameter : 2,4/2,4 cm
2. Jumlah tangkai bunga : 1-2 buah
3. Jumlah benang sari : 16 buah
4. Panjang tangkai sari : 0,7 cm
5. Jumlah daun bunga : 10 buah
6. Panjang putik : 0,8 cm

*) Sumber: Vademekum Jeruk, Direktorat Tanaman Buah. Ditjen BP Hortikultura, 2002 *cit.* Syariefa, E. 20

Lampiran 2. Jadwal pelaksanaan penelitian dari awal Bulan Maret sampai Mei 2012

KEGIATAN	M I N G G U																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Persiapan	■	■																		
Pembuatan media dan inkubasi media		■	■	■																
Penanaman					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pemeliharaan dan pengamatan					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pengolahan data dan penulisan																			■	■



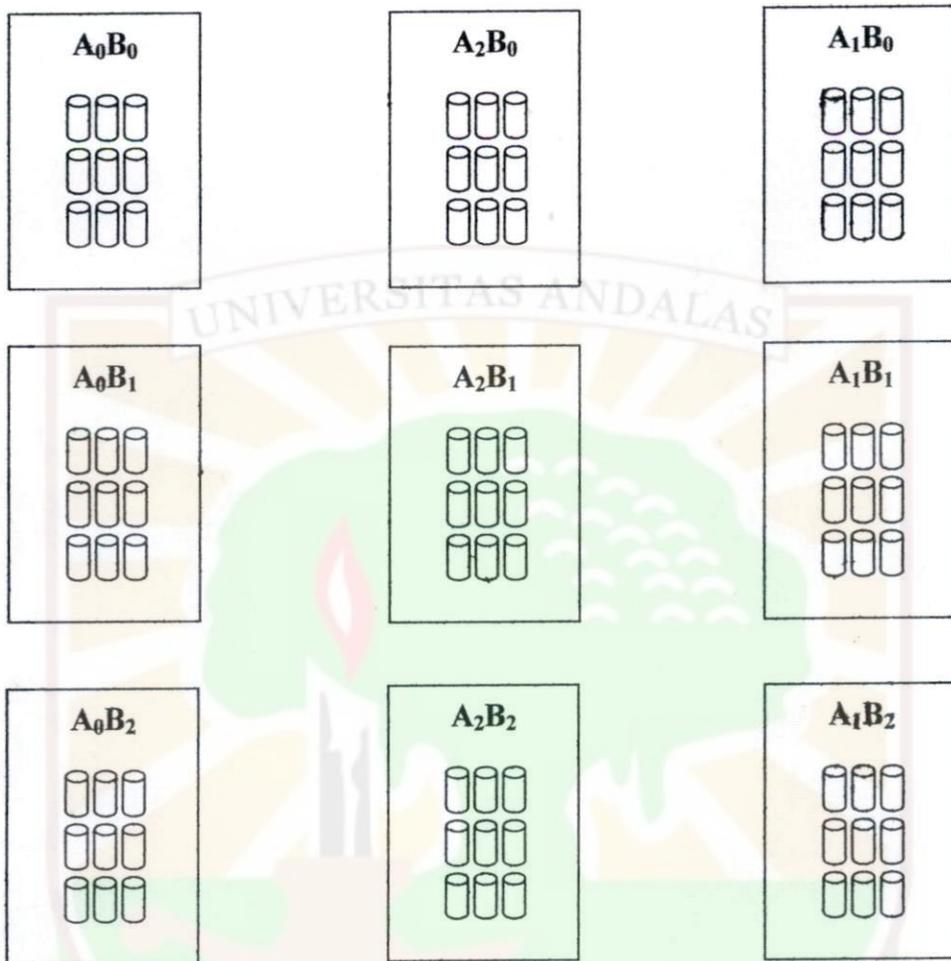
Lampiran 3. Komposisi media Murashige dan Skoog

Larutan baku	Senyawa penyusun	Konsentrasi larutan baku (g/l)	Volume Larutan Medium (ml/l)	Konsentrasi dalam medium (mg/l)
A	NH ₄ NO ₃	82.500	20	1.650.00
B	KNO ₃	95.000	20	1.900.000
C	H ₃ BO ₃	1.240	5	6.200
	KH ₂ PO ₄	34.000		170.000
	KI	0.166		0.830
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.050		0.250
	CoCl ₂ .2H ₂ O	0.005		0.025
D	CaCl ₂ .2H ₂ O	88.000	5	440.000
E	MgSO ₄ .4H ₂ O	74.000	5	370.000
	MnSO ₄ .4H ₂ O	4.460		22.300
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.720		8.600
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.005		0.025
F	Na ₂ -EDTA	7.450	5	37.250
	FeSO ₄ .7H ₂ O	55.570		37.850
G	Thiamine-HCL	0.100	1	0.100
	Nicotinic acid	0.500	1	0.500
	Pyridoxin-HCL	0.500	1	0.500
	Glycine	2.000	1	2.000
H	Myo-inositol	10.000	10	100.00
	Sukrosa	30.000		

Sumber : Murashige dan Skoog, 1962

PH : 5.8

Lampiran 4. Denah penempatan botol kultur di laboratorium



Keterangan :

A_0, A_1, A_2 dan B_0, B_1, B_2 = perlakuan



= botol kultur

0,1,2

= ulangan