

Pengaruh Media dan Penyungkupan Terhadap Daya Tumbuh Benih Jeruk Bebas Penyakit Hasil Penyambungan Meristem Tip *In Vitro* (The Effect of Medium and Lidding on Growth Capability of Free Diseases Citrus Plant Derived from Meristem Tip Grafting *In Vitro*)

Devy, NF¹⁾, Suhariyono¹⁾, dan Hardiyanto²⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jln. Raya Tlekung No. 1, Junrejo, Batu, Jawa Timur 65301

²⁾Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sumatera Barat, Jln. Raya Padang – Solok, Km. 40, Sukarami, Kab. Solok, Sumbar 25001

E-mail : nfdevy@gmail.com

Naskah diterima tanggal 27 Februari 2014 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 23 Februari 2015

ABSTRAK. Teknologi penyambungan meristem tip (PMT) untuk mengeliminasi penyakit yang berasal dari *graft-transmissible* pada tanaman jeruk di Indonesia telah dilakukan sejak dua dekade lalu. Namun tingkat pertumbuhan benih hasil penyambungannya masih sangat rendah dan waktu yang diperlukan untuk proses indeksing masih relatif panjang. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Pembibitan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika mulai Januari 2012 – Maret 2013. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan teknologi PMT yang diperbarui melalui modifikasi media *in vitro* serta penyungkupan untuk meningkatkan persentase keberhasilan dan daya tumbuh tanaman. Perlakuan yang diaplikasikan adalah penambahan konsentrasi vitamin MS pada media persemaian biji batang bawah jeruk Japanese Citroen/JC (*Citrus medica*) dan media pertumbuhan tanaman keprok Batu 55 (*Citrus reticulata* Blanco) hasil PMT *in vitro*. Pada tahapan berikutnya, perlakuan yang diaplikasikan adalah perbaikan kondisi lingkungan tumbuh berupa penambahan ukuran polibag dan pengaturan suhu lingkungan mikro tanaman dengan melakukan penyungkupan menggunakan plastik tanaman hasil PMT yang di-*regrafting*. Penelitian dirancang dalam rancangan acak lengkap dengan lima ulangan pada tahapan pertumbuhan semai *in vitro*, rancangan acak lengkap faktorial dengan lima ulangan pada pertumbuhan tanaman hasil PMT, dan rancangan acak kelompok faktorial dengan tiga ulangan pada tahapan *regrafting*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada fase semaian batang bawah *in vitro*, penambahan konsentrasi vitamin pada media sampai 10 kali tidak berpengaruh nyata terhadap persen perkecambahan biji serta pertumbuhan semaian JC, sedangkan pada fase *ex vitro*, perlakuan kombinasi antara ukuran polibag dan penyungkupan tidak berpengaruh nyata terhadap semua parameter yang diamati. Perlakuan penyungkupan pada minggu ke-10 sampai dengan ke-14 berpengaruh nyata terhadap peningkatan pertumbuhan tinggi dan jumlah daun jeruk keprok Batu 55, masing-masing mencapai 40,1% dan 25,9 %. Hasil penelitian ini akan mempercepat kisaran waktu yang dibutuhkan untuk menghasilkan tanaman induk jeruk bebas penyakit dengan menggunakan teknik PMT.

Katakunci: Meristem tip; Penyambungan *in vitro*; Fase *ex vitro*; *Citrus reticulata* Blanco; *Citrus medica*; Sungkup plastik

ABSTRACT. Meristem tip grafting technology (MTG) *in vitro* that effectively eliminate the graft-transmissible diseases of citrus plants has been done in Indonesia since the last two decades. The rate growth, however, are slow and taking a long time needed for indexing process. The experiment was conducted at the Tissue Culture Laboratory and Nursery House of Indonesian Citrus and Subtropical Fruit Research Institute (IOSFRI) in January 2012 to March 2013. The purpose of this research was to obtain an updated MTG technology through *in vitro* medium modification as well as lidding treatment to increase the percentage of graft success and plants growth. In the *in vitro* stage, the treatments applied were the addition of MS vitamin concentration, both on the culture media of Japanese Citroen/JC (*Citrus medica*) rootstock seed and keprok Batu 55 (*Citrus reticulata* Blanco) MTG-derived plants. In the next *ex vitro* phase (regrafted plants), the treatments were the increment of plant growth container size and environment temperature by covering regrafted plants using plastic sheet. The research was designed in a completely randomized design with five replicates on *in vitro* seedling growth, completely randomized design factorial with five replications on MTG-derived plant growth, and block randomized design factorial with three replications on regrafting stages. In the *in vitro* seedling phase, the results showed that the addition of concentration vitamin up to 10 times did not significantly affect the percentage of seed germination and seedling growth. While on the regrafted phase, the combination of size containers and plastic covering plants treatments had no significant effect on all parameters observed. However, the using plastic sheet during 10th up to 14th week was increasing the growth and number of leaves about 40,1 % and 25,9 %, respectively. The results of this study will shorten the time for producing free-diseases citrus mother plants by using MTG technique.

Keywords: Meristem tip; Grafting *in vitro*; *Ex vitro* phase; *Citrus reticulata* Blanco; *Citrus medica*; Plastic cover

Patogen yang menyerang jeruk sering tidak menimbulkan gejala, tetapi menyebabkan risiko kematian. Virus serta patogen lainnya yang menyerang jeruk di Indonesia adalah tristeza, psorosis, exocortis,

cachexia serta *citrus vein phloem degeneration/CVPD* (Huang Lungbin). Eliminasi virus merupakan langkah strategis untuk produksi induk bebas penyakit yang menghasilkan benih bermutu tinggi.

Teknologi eliminasi atau pembersihan tanaman jeruk yang terinfeksi penyakit pada awalnya dilakukan oleh Navarro *et al.* (1975) dengan metode yang disebut *shoot tip grafting* (STG), yaitu dengan menyambung batang bawah berumur 2 minggu dengan batang atas berupa jaringan meristem berukuran 0,14–0,18 mm secara *in vitro*. Tanaman hasil STG yang telah tumbuh, diaklimatisasikan dan bila pertumbuhannya telah mencapai ukuran yang optimal, tanaman dapat diambil sampel daunnya untuk diindeksing kandungan penyakitnya.

Teknologi ini sampai sekarang masih digunakan dengan berbagai modifikasi. Dari berbagai penelitian, didapat bahwa pembersihan melalui teknologi sambung meristem *in vitro* tersebut, terbukti secara efektif dapat mengeliminasi semua penyakit jeruk yang berasal dari patogen yang terbawa pada saat proses penyambungan, walaupun tingkat keberhasilan bervariasi antara 60% (*tatterleaf*, psorosis) sampai 100% (citrus viroids, *S. citri*), sedangkan untuk *citrus tristeza virus* (CTV) di Pakistan keberhasilannya lebih dari 90% (Abbas *et al.* 2008). Dikombinasikan dengan pemanasan, metode ini juga berhasil mengeliminasi ICRsV (*indian citrus ringspot virus*) pada jeruk cv Kinnow (*C. nobilis* x *C. deliciosa* Tenora) (Sharma *et al.* 2007).

Di Indonesia, teknologi penyambungan meristem diaplikasikan pada pelaksanaan program penyediaan benih jeruk bebas penyakit sejak tahun 1985. Selain di Indonesia, metode ini juga dikembangkan di berbagai sentra produksi jeruk di dunia seperti China (Ruilin *et al.* 1996), Pakistan (Naz *et al.*, 2007), Italy (Continella *et al.* 1997) dan Cyprus (Kapari-Isaia *et al.* 2002). Selain pada tanaman jeruk, metode penyambungan meristem juga diterapkan pada tanaman aprikot (Deogratias *et al.* 1991), kapas (Luo & Gould 1999), *Prunus avium* L. (*cherry*) var. Seeyahe Mashad (Amiri 2006), anggur (Duran *et al.* 1988), manggis (Chabukswar & Deodhar 2006) serta apel dan pir (Toma & Mosleh 2010).

Selama dua dekade terakhir, metode ini telah diterapkan di Indonesia, tetapi ditemukan dua masalah penting, yaitu tingkat keberhasilan tanaman yang tumbuh masih relatif rendah, yaitu hanya mencapai 23% dan 34% untuk masing-masing tanaman hasil sambung yang dorman dan berkembang normal (Triatminingsih *et al.* 1992 & Devy *et al.* 1995). Masalah lain adalah lamanya pertumbuhan tanaman *regrafting* di rumah pembibitan untuk diambil daunnya sebagai bahan pengujian indeksing. Umumnya tanaman akan mempunyai jumlah daun berkisar antara 10–15 buah dalam waktu 6–8 bulan setelah *regrafting*.

Untuk itu perlu upaya perbaikan teknologi agar ketersediaan benih induk jeruk bebas penyakit lebih

banyak dalam waktu yang relatif lebih singkat. Namun, penelitian untuk meningkatkan persen keberhasilan sambung meristem ini belum banyak yang dipublikasikan. Dari publikasi yang ada, peningkatan keberhasilan dapat diupayakan dengan penambahan kadar sukrose (Naz *et al.* 2007) dan zat pengatur tumbuh BA pada media pertumbuhan (Abbas *et al.* 2008), perlakuan perendaman *shoot* pada larutan 2,4 D atau Kinetin sebelum *grafting* (Edriss 1984) serta dengan penggunaan batang bawah yang beragam (Sertkaya 2004, Ekta & Jogdande 2008).

Tujuan penelitian adalah mendapatkan teknologi sambung meristem yang diperbarui melalui perbaikan media *in vitro* serta modifikasi lingkungan mikro *ex vitro*. Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah bahwa penambahan vitamin pada media tumbuh *in vitro* diduga akan meningkatkan persentase tanaman hidup dari hasil sambung meristem dan meningkatkan pertumbuhan tanaman, sedangkan penambahan volume media dan suhu melalui penyungkupan pada tanaman *regrafting* diduga akan mempercepat pertumbuhan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mempersingkat proses penyediaan tanaman jeruk hasil *regrafting* sehingga dapat mempercepat proses indeksing penyakitnya. Hal ini berdampak pada percepatan penyediaan induk jeruk bebas penyakit.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

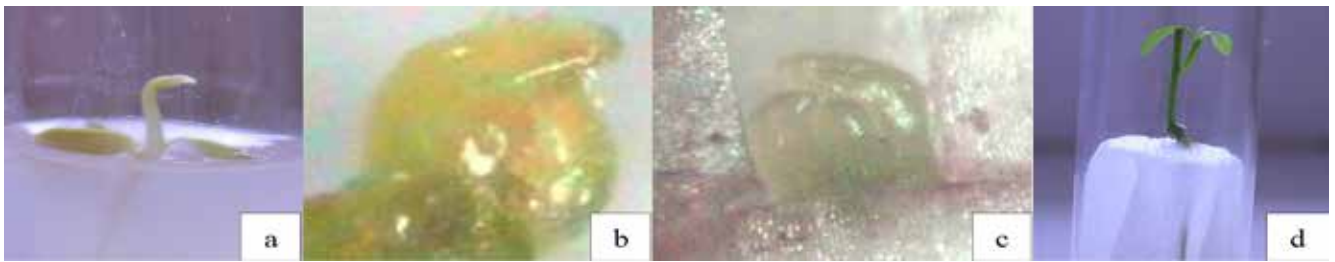
Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2012 sampai dengan Maret 2013 di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Perbenihan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah media basal medium MS (Skirvin 1980), buah jeruk batang bawah Japanese Citroen (JC), induk jeruk keprok Batu 55 (*Citrus reticulata* Blanco), Batang bawah JC (*Citrus medica*) berumur 8 bulan.

Prosedur

Metode penyambungan meristem *in vitro* dilakukan dengan mengadopsi teknik yang dikembangkan dan dipublikasikan oleh Navarro *et al.* (1975) dengan sedikit modifikasi. Tahapan ini terdiri atas persiapan batang bawah, persiapan *shoot-tip* dan tahapan penyambungan *in vitro*. Modifikasi yang dilakukan dari standar adalah perlakuan *regrafting* dengan tujuan mempercepat pertumbuhan tanaman, yaitu menyambung tanaman hasil sambung meristem *in vitro*



Gambar 1. Semai batang bawah *in vitro* (a), meristem tip dengan dua primordia daun (b), meristem tip yang tersambung pada batang bawah *in vitro* (c), dan tanaman hasil PMT yang tumbuh (d) [*Rootstock in vitro seedling (a), a two-leaf primordia meristem tip (b), grafted meristem tip on in vitro rootstock (c), and growing MTG plant (d)*]

umur 1 bulan pada semaian batang bawah JC umur 8 bulan secara *ex vitro* di rumah pembibitan.

Persemaian Batang Bawah Jeruk Secara *In Vitro*

Biji batang bawah jeruk JC diambil dari buah yang masih segar, kemudian dicuci dengan menggunakan abu. Biji yang sudah bersih dan kasat, dikupas kulit luarnya dan direndam selama 30 menit dalam larutan 1% fungisida kemudian dicuci dengan akuades steril. Untuk sterilisasi lebih lanjut, biji yang sudah dikupas dibawa ke dalam *laminar air flow cabinet* (LAFC), dan disterilkan kembali dalam larutan 1% dan 0,5% sodium hipoklorit masing-masing selama 10 menit, setelah itu dicuci dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Dengan menggunakan pinset, kulit ari dari biji yang telah disterilkan dikupas dan ditanam pada media MS padat standar dengan posisi bagian kalasal berada di bawah. Setiap *test tube* berisi satu biji, kultur biji kemudian diinkubasikan pada lemari gelap dengan suhu ruang (25°C) yang konstan selama 2–3 minggu atau sampai semai biji tumbuh dengan tinggi mencapai 5–7 cm, dengan diameter ideal mencapai 1–1,5 mm (Gambar 1a).

Persiapan Batang Atas

Sumber meristem tip yang akan dipakai sebagai batang atas diambil dari pucuk tunas jeruk keprok Batu 55 berukuran 1 cm, yaitu pucuk tanaman yang baru tumbuh \pm 1 minggu setelah ranting di-rompes daunnya. Daun-daun yang telah terbuka lebar dibuang, dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan dibungkus dengan kain kasa. Di dalam LAFC, bahan meristem disterilkan dengan cara merendamnya pada larutan 0,5 menit dan 1% sodium hipoklorit masing-masing selama 10 dan 15 menit, setelah itu bahan meristem dicuci dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Dengan menggunakan mikroskop binokuler, ujung meristem beserta dua primordia daun dengan ukuran 0,14–0,18 mm dipotong untuk disambungkan pada batang bawah jeruk *in vitro* (Gambar 1b).

Sambung *in vitro*

Semaian *in vitro* batang bawah yang telah berumur 2–3 minggu, dikeluarkan dari *test tube* pada kondisi yang steril, dipotong dan disisakan pada bagian epikotil sepanjang 1 – 1,5 cm, sedangkan kotiledon dan tunas-tunas samping yang tumbuh dibuang, ujung akar dipotong sampai tersisa \pm 4 cm. Untuk tempat menempelnya meristem batang atas, dibuat dua irisan pada lokasi \pm 1 – 2 mm dari permukaan atas epikotil tersebut, yaitu irisan secara vertikal yang dimulai dari titik irisan sepanjang \pm 1 mm ke bagian bawah dan irisan secara horizontal pada irisan bawah melebar \pm 1 mm. Irisan dibuat sedemikian rupa sehingga melalui kortek sampai kambium batang dan permukaan kortikal tampak. Dalam keadaan demikian, batang bawah siap untuk disambung, yaitu dengan cara meletakkan meristem tip secara mendatar pada dasar permukaan irisan (Gambar 1c).

Pemeliharaan tanaman hasil grafting *in vitro*

Tanaman hasil PMT ditanam pada media MS cair pH media MS dengan pH $5,7 \pm 0,1$, dengan menggunakan



Gambar 2. Tanaman hasil PMT yang di-regrafting pada batang bawah JC (*Regrafted MTG-plants on the JC rootstock*)

kertas saring sebagai penyangga tanaman. Tanaman tersebut diinkubasikan terlebih dahulu pada ruangan gelap selama 3 hari, kemudian tanaman diinkubasikan pada kondisi terang dengan suhu yang konstan (25°C) dan penyinaran 16 jam/hari (± 1.000 lux) (Gambar 1.d).

Akselerasi pertumbuhan tanaman hasil PMT: Regrafting secara *ex vitro*

Untuk memacu pertumbuhannya, tanaman hasil PMT *in vitro* yang telah mempunyai daun 3–4 lembar (berumur ± 2 bulan setelah sambung), di-*regrafting*-kan (disambung ulang) secara *ex vitro* pada batang bawah JC yang berumur ± 8 bulan dan dipelihara secara optimal di polibag dalam rumah pembibitan (Gambar 2).

Rancangan Percobaan

Kegiatan penelitian terdiri atas tiga subkegiatan, yaitu (a) perbaikan media pada fase semai batang bawah JC *in vitro*, (b) perbaikan media untuk pertumbuhan tanaman keprok Batu 55 hasil PMT *in vitro*, dan (c) perbaikan lingkungan pertumbuhan tanaman hasil *regrafting*.

Perbaikan media pada fase semai batang bawah JC *in vitro*

Biji JC yang telah dikupas dan disterilkan dikulturkan pada media MS padat dengan tiga perlakuan, yaitu (1) MS standar (kontrol), (2) MS standar + 5 x vit MS, dan (3) MS standar + 10 x vit MS. Penelitian ini disusun dengan rancangan acak lengkap (RAL), lima ulangan, dan setiap ulangan terdiri atas 10 unit tanaman.

Peubah yang diamati adalah (a) saat tumbuh semaian yang diamati setiap hari, (b) persen (%) semaian yang tumbuh, diamati setelah umur 2 dan 4

minggu, dan (c) ukuran panjang dan diameter batang semaian pada umur 2 dan 4 minggu.

Perbaikan media pertumbuhan tanaman jeruk keprok Batu 55 hasil penyambungan meristem tip (PMT)

Batang bawah JC *in vitro* yang telah tumbuh pada tiga perlakuan di fase persemaian kemudian disambung dengan meristem tip batang atas keprok Batu 55. Tanaman hasil sambungan tersebut kemudian masing-masing dikulturkan pada tiga macam media cair, yaitu (1) MS standar + 50 g sukrose (sebagai kontrol), (2) MS0 + 5 x vit MS + 50 g sukrose, dan (3) MS0 + 10 x vit MS + 50 g sukrose. Penelitian disusun dengan RAL faktorial dengan lima ulangan, dan setiap ulangan terdiri atas 10 tanaman.

Peubah yang diamati adalah (a) saat tumbuh sambungan yang diamati setiap hari, (b) persen (%) sambungan hidup/tumbuh, diamati pada umur 2 bulan setelah sambung, dan (c) tinggi tanaman hasil sambung pada umur 2 bulan setelah sambung (saat *regrafting*).

Perbaikan lingkungan pertumbuhan tanaman jeruk keprok Batu 55 hasil *regrafting*

Perbaikan pada fase ini bertujuan mendorong percepatan pertumbuhan tanaman, yaitu penambahan volume media tumbuh (memperbesar ukuran polibag) serta penambahan suhu lingkungan mikro tanaman dengan cara rak pertanaman hasil *regrafting* disungkup dengan plastik. Perlakuan disusun dengan rancangan acak kelompok (RAK) faktorial, faktor I adalah ukuran polibag dan faktor II adalah penyungkupan. Adapun perlakuan ukuran polibag adalah (a) polibag kecil (ukuran 10 cm x 30 cm, sebagai kontrol) dan (b) polibag besar (ukuran 35 cm x 40 cm), sedangkan



Gambar 3. Perlakuan tanaman hasil *regrafting* di lokasi terbuka dan sungkup (*The treatments of grafted plants, i.e. opened and covered places*)

perlakuan penyungkupan dilakukan dengan cara tanaman diletakkan di rak (a) secara terbuka (kontrol) dan (b) rak yang ditutup (disungkup) dengan plastik UV. Seluruh kegiatan dilakukan di dalam rumah pembibitan (Gambar 3). Penelitian dilakukan dengan RAK faktorial dengan tiga ulangan, dan setiap ulangan terdiri dari lima tanaman.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perbaikan Media untuk Pertumbuhan Batang Bawah Jeruk JC

Hasil penelitian menunjukkan bahwa saat tumbuh semai, batang bawah tidak dipengaruhi oleh perbedaan konsentrasi vitamin MS yang ditambahkan, tetapi penambahan konsentrasi vitamin MS sampai 10 kali cenderung memperlambat biji untuk tumbuh (Tabel 1), sedangkan pada persen semaian yang tumbuh pada umur 2 minggu tidak berbeda nyata antarperlakuan. Pada umur 4 minggu setelah kultur didapat bahwa media kontrol (MS0 standar) menghasilkan persen tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya (Tabel 2).

Peningkatan konsentrasi vitamin tidak berpengaruh nyata terhadap saat serta kecepatan tumbuh semai jeruk. Hal ini diduga disebabkan biji jeruk telah

mempunyai cadangan makanan (endosperm) yang cukup untuk menumbuhkan embrio yang ada sehingga media yang ada hanya berfungsi sebagai penyangga lingkungan mikro yang optimal bagi tumbuhnya embrio, hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan pada kultur kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) secara *in vitro* (Pardhe & Satpute 2011). Biji kering kacang tanah tumbuh secara optimum pada media MS standar yang mengandung vitamin. Namun, kecepatan pertumbuhan tanaman ternyata hampir sama dengan semaian yang dikulturkan pada media MS tanpa vitamin. Setelah 10 hari dikulturkan pada media MS + vitamin, panjang semaian mencapai 10–15 cm, sedangkan pertumbuhan tinggi semaian di media MS tanpa vitamin tidak berbeda.

Perlakuan media juga tidak berpengaruh terhadap tinggi tanaman, diameter batang, berat basah, dan berat kering (Tabel 3). Secara normal, tanaman akan menyintesis vitamin yang dibutuhkan untuk tumbuh dan berkembang. Namun, pada tanaman yang dikultur secara *in vitro*, vitamin yang dibutuhkan secara mutlak yang harus ditambah dari luar adalah vitamin B1 (*thiamine*), B (*nicotinic acid*), dan B6 (*pyridoxine*). Menurut Abrahamian & Kantharajah (2011), dalam media kultur jaringan *in vitro*, penambahan vitamin dari luar tidak banyak dilakukan, karena jumlah yang dibutuhkan oleh tanaman secara pasti tidak diketahui dan sangat bervariasi.

Pada perlakuan MS0 + 5 x vit MS, berat kering semaian relatif lebih baik dibandingkan pada perlakuan lain. Hal ini diduga dengan makin berkembangnya tanaman, vitamin yang tersintesis dari dalam tidak mencukupi sehingga kebutuhannya dipenuhi dengan mengambil dari lingkungan mikro (media tumbuhnya) sampai batas optimal sehingga kelebihan vitamin yang tersedia menjadi tidak berpengaruh lagi bahkan cenderung menghambat pertumbuhan yang diduga disebabkan terhambatnya penyerapan unsur-unsur lain yang dibutuhkan tanaman. Keadaan ini sesuai dengan penelitian Abrahamian & Kantharajah (2011) pada perbanyakan mikro planlet kentang, dimana aplikasi 25 mg vitamin D3 dalam media akan menyebabkan penyerapan Ca²⁺ secara efisien, tetapi penyerapan tidak

Tabel 1. Saat tumbuh semai pada tiga macam media (Time of seedling growth at three kinds of medium)

Perlakuan (Treatments)	Rerata saat tumbuh semai (The average of time seedling growth), Hari (Days)
MS0 standar (Control)	14,92 a ^{*)}
MS0 + 5 x vit MS	14,88 a
MS0 + 10 x vit MS	16,00 a
KK (CV), %	21

^{*)} angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5% (Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different based on Duncan's multiple range test 5%)

KK (CV) = koefisien keragaman (coefficient variation)

Tabel 2. Rerata persen semai yang tumbuh 2 dan 4 minggu setelah kultur (The average of percentage growing seedling at 2 and 4 weeks after culture)

Perlakuan (Treatments)	Rerata % semai tumbuh (The average of % growing seedling)	
	2 minggu (weeks)	4 minggu (weeks)
MS0 standar	24,2 a ^{*)}	63,0 a
MS0 + 5 x vit MS	20,7 a	45,7 b
MS0 + 10 x vit MS	34,7 a	57,9 ab
KK (CV), %	16,4	18,2

Tabel 3. Rerata tinggi, diameter, berat basah, dan berat kering semaian JC yang tumbuh 6 minggu setelah kultur (*The average height, diameter, fresh and dry weight of growing JC seedling at 6 weeks after culture*)

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Tinggi semaian (<i>Seedling height</i>), cm	Diameter semaian (<i>Seedling diameter</i>), mm	Berat basah (<i>Fresh weight</i>), mg	Berat kering (<i>Dry weight</i>), mg
MS0 standar	4,0 a [*])	1,15 a	55,0 a	7,6 a
MS0 + 5 x vit MS	4,1 a	1,15 a	63,1 a	8,3 a
MS0 + 10 x vit MS	4,0 a	1,19 a	60,0 a	8,1 a
KK (<i>CV</i>), %	8,3	7,86	5,8	6,6

terjadi bila konsentrasi vitamin tersebut ditingkatkan sampai 100%.

Perbaikan Media untuk Pertumbuhan Tanaman Jeruk Hasil PMT

Dari hasil analisis statistik diketahui bahwa perlakuan kombinasi pada media kultur tanaman keprok Batu 55 hasil sambung meristem tidak berpengaruh nyata pada pertumbuhannya. Secara terpisah, persentase tertinggi tanaman keprok Batu 55 hasil sambung meristem yang mati terdapat pada tanaman yang berasal dari batang bawah JC yang dikulturkan pada media standar, sedangkan yang dorman tertinggi pada dua perlakuan media lainnya (Tabel 4). Pada perlakuan media kultur tanaman PMT keprok Batu 55, hasil sambungan meristem tidak berpengaruh nyata pada pertumbuhan tanaman (Tabel 5).

Tingkat kematian yang tinggi pada tanaman hasil sambung *in vitro* di media cair, diduga disebabkan

tidak menempelnya secara sempurna meristem dengan jaringan kambium batang bawah JC. Secara mikroskopis terlihat bahwa meristem yang menempel sempurna akan tumbuh dan berwarna hijau 2 minggu setelah sambung dan akan mati apabila penempelannya tidak sempurna (Gambar 4a dan 4b) serta pada minggu ke 6, meristem yang tersambung sempurna akan tumbuh dengan baik (Gambar 4c). Menurut Thimmappaiah *et al.* (2002) tanaman yang tumbuh pada teknik *micrografting* terjadi apabila kedua jaringan pembuluh batang atas dan bawah tersambung dengan baik, hal ini ditandai dengan adanya pertumbuhan kalus pada luka sambungan pada minggu ke-3 serta diikuti oleh berkembangnya daun pada minggu ke 5-6.

Hal di atas sesuai dengan pendapat Estrada-Luna *et al.* (2002), dimana kematian pada penyambungan *in vitro* selain disebabkan karena tidak menempelnya jaringan kambium, antara batang bawah dan batang atasnya, juga adanya fenol pada jaringan di tempat

Tabel 4. Rerata saat tumbuh, persen tumbuh, persen dorman, dan persen mati tanaman hasil PMT pada tiga asal batang bawah JC tumbuh (*The average of growing time, percent growth, percent dormant, and percent MTG plants derived from three kinds of JC rootstock*)

Asal batang bawah JC (<i>The source of JC rootstock</i>)	Saat tumbuh (<i>Growing time</i>) Hari (<i>Days</i>)	Tanaman yang tumbuh (<i>Growing plants</i>), %	Tanaman yang dorman (<i>Dormant plants</i>), %	Tanaman yang mati (<i>Dead plants</i>), %
JC (MS0 standar)	18,8 a [*])	6,5 a	56,6 b	36,9 a
JC (MS0 + 5 x vit MS)	23,1 a	6,5 a	68,4 a	25,0 b
JC (MS0 + 10 x vit MS)	21,5 a	6,6 a	67,4 a	25,9 b
KK (<i>CV</i>), %	18,8	16,2	7,1	14,1

Tabel 5. Rerata saat tumbuh, persen tumbuh, persen dorman, dan persen mati tanaman hasil PMT pada tiga macam media tumbuh (*The average of growing time, percent growth, percent dormant, and percent MTG plants at three kinds of medium*)

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Saat tumbuh (<i>Growing time</i>) Hari (<i>Days</i>)	Tanaman yang tumbuh (<i>Growing plants</i>), %	Tanaman yang dorman (<i>Dormant plants</i>), %	Tanaman yang mati (<i>Dead plants</i>), %
MS0 (MS standard) + 50 g sukrose	25,3 a [*])	4,1 a	68,7 a	27,2 a
MS0 + 5 x vit MS + 50 g sukrose	21,0 a	11,7 a	62,3 a	25,9 a
MS0 + 10 x vit MS + 50 g sukrose	17,1 a	3,8 a	61,5 a	34,6 a
KK (<i>CV</i>), %	18,8	16,2	7,1	14,1



Gambar 4. Meristem yang menempel sempurna di kambium (a), meristem yang mati (b), dan sambungan meristem yang tumbuh (c) [*Meristem that budded in cambium perfectly, (a) dead meristem (b), and a well growing grafted meristem plant (c)*]



Gambar 5. Tanaman keprok Batu 55 hasil PMT pada tiga macam media tumbuh (*The keprok Batu 55 MTG derived plants grown on three kinds of culture medium*) (a) MS0 (MS standard) + 50 g sukrose, (b) MS0 + 5 x vit MS + 50 g sukrose, (c) MS0 + 10 x vit MS + 50 g sukrose

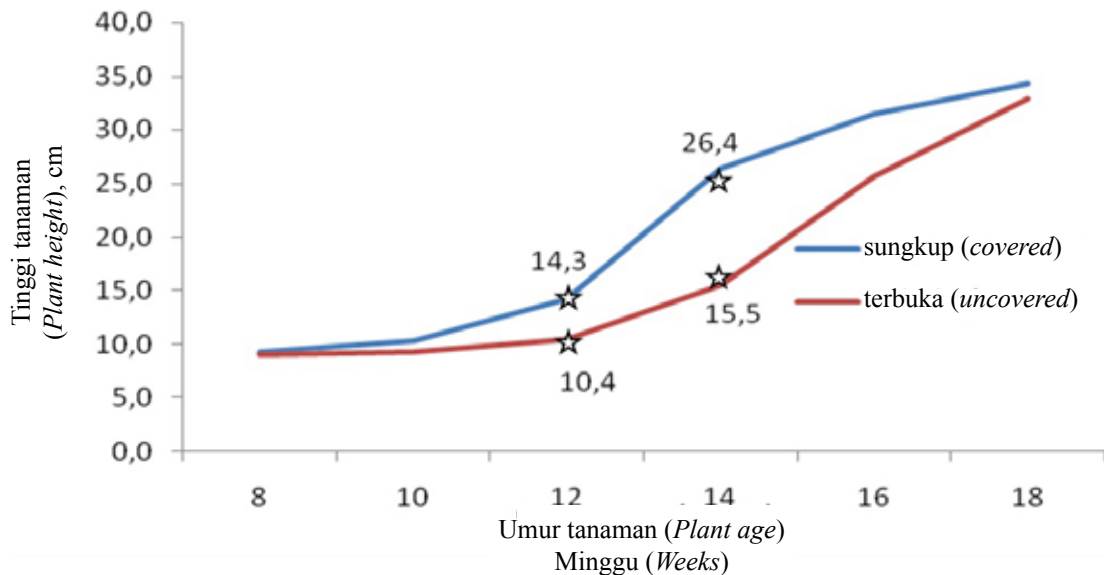
pertautannya yang mendorong terjadinya proses pengeringan jaringan tersebut. Dengan tidak bersatunya jaringan kambium maka jaringan pembuluh kedua batang tersebut tidak tersambung dan akan mendorong matinya jaringan tanaman tersebut (Yildirim *et al.* 2010).

Perlakuan media MS cair + 10 x vit MS + 50 g sukrose merupakan media yang menjadikan tanaman hasil sambung meristem lebih cepat tumbuhnya dibandingkan perlakuan lainnya, sedangkan tinggi tanaman dan jumlah daun sampai dengan umur 2 bulan setelah sambung tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (Tabel 6).

Komposisi media kultur sangat berpengaruh terhadap tumbuh dan berkembangnya tanaman yang dikultur. Dengan meningkatnya penambahan vitamin pada media, menyebabkan tanaman hasil PMT keragaannya lebih baik sehingga dapat lebih cepat untuk siap di-*regrafting* (disambung ulang) secara *ex vitro* pada batang bawah JC di rumah pembibitan (Gambar 5.). Hal ini diduga bahwa pertumbuhan tanaman hasil tersebut memerlukan asupan vitamin yang tinggi untuk menginduksi pertumbuhannya. Selain vitamin, menurut Naz *et al.* (2007), penambahan konsentrasi sukrose sampai 5% akan meningkatkan persentase keberhasilan PMT dari 21% menjadi 33%. Penambahan sukrose dalam media tumbuh dapat

Tabel 6. Tinggi, jumlah daun, dan saat tanaman keprok Batu 55 hasil MTG umur 2 bulan (*The height, leaves total, and regrafting time of 2 months keprok Batu 55 MTG derived plant*)

Perlakuan media (Media treatments)	Tinggi tanaman (Plant height), cm	Jumlah daun (Leaves total)	Saat regraft (<i>Regrafting time</i>) Hari (Days)
MS0 (MS standard) + 50 g sukrose	0,24 a ^{*)}	2,4 a	19,4 a
MS0 + 5 x vit MS + 50 g sukrose	0,18 a	2,0 a	14,0 b
MS0 + 10 x vit MS + 50 g sukrose	0,18 a	1,4 a	9,6 c
KK (CV), %	18,5	18,8	19,4



Gambar 6. Tinggi tanaman *regrafting* pada kondisi tersungkup dan terbuka (*Plant height at covered and uncovered conditions*)

Tabel 7. Rerata tinggi tanaman pada umur 8–18 minggu setelah *regrafting* (*The average of plant height at 8–18 weeks after grafted*)

Perlakuan (Treatments)	Rerata tinggi tanaman pada 8–18 minggu setelah <i>regrafting</i> (<i>The average of plant height at 8–18 weeks after grafted</i>), cm					
	8	10	12	14	16	18
V ₁ N ₀	8,6 a*)	9,8 a	14,1 a	26,1 a	31,5 a	32,5 a
V ₁ N ₁	10,1 a	10,8 a	14,5 a	26,7 a	31,6 a	36,1 a
V ₂ N ₀	8,6 a	9,0 a	10,9 a	20,1 ab	29,6 a	32,2 a
V ₂ N ₁	9,4 a	9,5 a	9,8 a	10,7 b	21,5 a	33,5 a
KK (CV), %	22,3	17,7	27,1	30,1	30,0	15,4

V₁ (disungkup) (*covered*); V₂ (terbuka) (*uncovered*); N₀ (polibag kecil) (*small polybag*); N₁ (polibag besar) (*big polybag*)

Tabel 8. Rerata jumlah daun pada umur 8–18 minggu setelah *regrafting* (*The average of leaves total at 8–18 weeks after grafted*)

Perlakuan (Treatments)	Rerata jumlah daun pada 8–18 minggu setelah <i>regrafting</i> (<i>The average of leaves total at 8–18 weeks after grafted</i>)					
	8	10	12	14	16	18
V ₁ N ₀	7,5 ab*)	8,2 a	11,2 a	21,7 a	22,0 a	21,0 a
V ₁ N ₁	8,2 a	8,2 a	11,5 a	19,2 ab	21,0 a	23,2 a
V ₂ N ₀	7,0 b	7,0 a	8,5 a	17,5 ab	23,7 a	23,0 a
V ₂ N ₁	7,5 ab	7,7 a	7,7 a	12,5 b	19,7 a	22,0 a
KK (CV), %	6,3	13,1	30,1	28,3	24,3	16,7

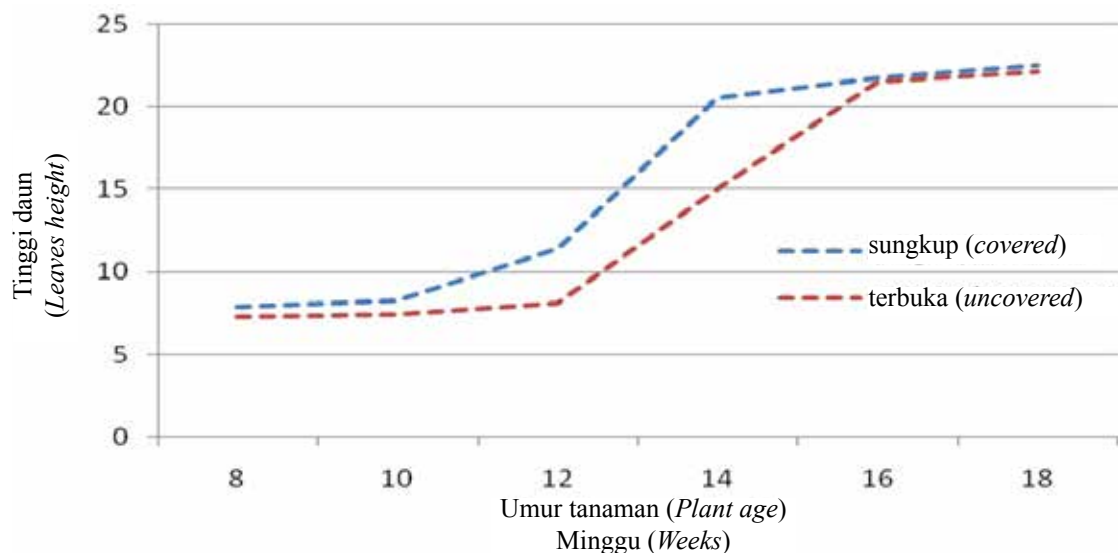
berfungsi sebagai agen osmotik dan sebagai sumber karbon maupun energi yang dibutuhkan pada kultur *in vitro*.

Pengaruh Lingkungan Terhadap Pertumbuhan Tinggi dan Jumlah Daun Tanaman Jeruk Hasil PMT yang di-*regrafting*

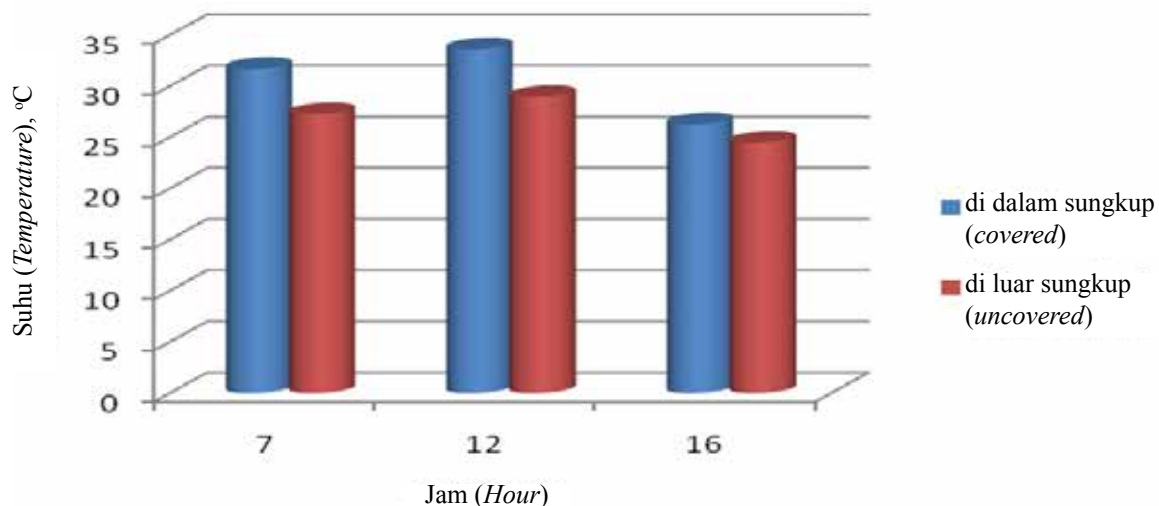
Hasil penelitian menunjukkan tidak ada interaksi antara ukuran polibag dengan peletakan tanaman (terbuka dan disungkup) terhadap parameter tinggi

tanaman PMT yang di-*regrafting*, dan tidak berbeda nyata antarperlakuan sampai dengan umur 18 minggu setelah penyambungan (Tabel 7).

Namun secara terpisah, tinggi tanaman hasil *regrafting* dipengaruhi oleh cara penempatan tanaman. Tinggi tanaman yang disungkup mulai berbeda pada saat tanaman berumur 10 minggu, dimana tinggi tanaman yang disungkup umur 10 minggu sama dengan tinggi pada tanaman yang tidak disungkup umur 14 minggu (10,4 cm), dengan bertambahnya



Gambar 7. Pengaruh posisi peletakan tanaman terhadap pertumbuhan jumlah daun (*Effect of plants position on leaves total*)



Gambar 8. Rerata suhu (°C) di dalam sungkup dan di luar sungkup pada pukul 7.00 pagi, 12.00 siang, dan 16.00 WIB (*The average of covered and uncovered temperature (°C) at 7.00 am, 12.00 am, and 4.00 pm*)

umur, perbedaan secara nyata terjadi pada minggu ke 12 dan 14 (Gambar 6), sedangkan ukuran polibag tidak berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan tinggi dari umur 8 – 18 minggu.

Aklimatisasi merupakan proses yang sulit bagi tanaman hasil perbanyakan *in vitro*. Tanaman yang telah diaklimatisasikan dengan baik pada lingkungan *in vitro* sebelum diletakkan *ex vitro* akan berpotensi tumbuh lebih baik dibandingkan tanpa perlakuan tersebut. Hal ini ditandai dengan relatif tingginya nilai *net* fotosintesis serta rendahnya nilai kecepatan transpirasi epidermal yang disebabkan lebih baiknya kandungan pati dan lapisan lilin di epikutikular (Lamhamedi et al. 2003, Magdalita et al. 2010).

Pada parameter jumlah daun yang tumbuh, didapat bahwa tidak ada interaksi antara ukuran polibag dengan peletakan tanaman (terbuka dan disungkup) terhadap parameter tersebut dan tidak berbeda nyata antarkombinasi perlakuan sampai dengan umur 18 minggu setelah penyambungan (Tabel 8).

Pada jumlah daun tanaman *regrafting*, perlakuan penyungkupan cenderung mendorong terjadinya peningkatan jumlah yang terjadi pada minggu ke-10 sampai dengan minggu ke-16 (Gambar 7), sedangkan perlakuan ukuran polibag, tidak berpengaruh secara nyata terhadap jumlah daun yang tumbuh dari umur 8 sampai dengan 18 minggu.

Pada penyiapan bahan daun untuk proses indeksing, jumlah daun yang diperlukan berkisar antara 8–10 buah, dimana akan tercapai pada umur 10 dan 14 minggu, masing-masing pada kondisi disungkup dan terbuka. Percepatan pertumbuhan tinggi dan jumlah daun pada tanaman dengan perlakuan penyungkupan diduga membuat lingkungan mikro bagi tanaman lebih optimal dibandingkan kontrol. Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa penyungkupan menyebabkan terjadinya peningkatan suhu rerata sebesar 3,6°C atau 13,5% dibandingkan dengan suhu di luar (Gambar 8).

Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Allen & Vu (2009), bahwa peningkatan CO₂ dan suhu lingkungan berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman jeruk manis di daerah lembab subtropikal. Pada tanaman jeruk Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc. cv. Okitsu Wasse) umur 1 tahun, jumlah dan panjang tunas akan tumbuh lebih tinggi bila ditanam pada tanah dengan suhu yang lebih tinggi (sampai 30°C). Meningkatnya suhu tanah maupun lingkungan juga akan meningkatkan berat kering tanaman (Poerwanto *et al.* 1989).

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Pada fase semai batang bawah *in vitro*, penambahan konsentrasi vitamin sampai dengan 10 kali pada media MS standar tidak berpengaruh nyata terhadap persen tumbuh biji maupun pertumbuhan semaiannya.
2. Pada fase *regrafting*, perlakuan penyungkupan pada tanaman akan meningkatkan suhu udara di sekitar tanaman rerata sebesar 3,6°C atau 13,5% dibandingkan dengan suhu di luar dan mempercepat rerata pertumbuhan tinggi tanaman dan jumlah daun pada minggu ke 10 – 14, masing-masing sebesar 40,1% dan 25,9% sehingga hal ini akan mempercepat waktu dua sampai empat minggu lebih awal ketersediaan sampel daun yang diperlukan untuk proses indeksing penyakitnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abbas, M, Khan, MM, Fatima, Iftikhar, Y, Mughal, SM, Jaskani, MJ, Khan, IA & Abbas, H 2008, 'Elimination of *Citrus tristeza closterovirus* (CTV) and production of certified citrus plants through shoot tip grafting', *Pak. J. Bot.*, vol. 40, no. 3, pp. 1301-12.
2. Abrahamian, P & Kantharajah, A 2011, 'Effect of vitamins on *in vitro* organogenesis of plant', *American Journal of Plant Sciences*, no. 2, pp. 669-74.

3. Allen, LH & Vu, JCV 2009, 'Carbondioxide and high temperature effect on growth of young orange trees in a humid, subtropical environment', *Agricultural and Forest Meteorology*, no. 149, pp. 820-30.
4. Amiri, ME 2006, 'In vitro techniques to study the shoot-tip grafting of *Prunus avium* L. (cherry) var. Seeayah Mashad, International journal of food', *Agriculture and environment.*, vol. 4. no. 1, pp. 151-4.
5. Chabukswar, MM & Deodhar, MA 2006, 'Restoration of rooting competence in a mature plant of *Garcinia indica* through serial shoot tip grafting *in vitro*', *Scientia Horticulturae*, vol. 108, no. 2, pp. 194-9.
6. Continella, G, Davino, M, Cartia, G, Busa, A, Valenti, C & Azzaro, A 1997, 'Results of a citrus shoot-tip grafting program at the University of Catania (Italy)', *Tenth IOCV Conference*, pp. 417-21.
7. Deogratias, JMV, Castellani, F, Costa, J, Juarez, JM, Arregui, C, Ortega, G, Llacer & Navarro, L 1991, 'Study of growth parameters on apricot shoot-tip grafting (STG) *in vitro*', *Acta Hort.*, vol. 293, pp. 363-71.
8. Devy, NF, Sutanto, A & Dwiastuti, ME 1995, 'Pengaruh metode penyambungan tunas pucuk pada pertumbuhan dan status penyakit tanaman jeruk', *Prosiding Simposium Hortikultura Nasional*, Malang 8-9 November 1994, hlm. 66-9.
9. Duran-Vila, N, Juarez, J & Arregui, JM 1988, 'Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture', *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 39, no. 3, pp. 217-20. 10.
10. Edriss, MH & Burger, DW 1984, 'Micro-grafting shoot-tip culture of citrus on three rootstocks', *Scientia Horticulturae*, vol. 23, pp. 255-9.
11. Ekta, SD & Jogdande, ND 2008, 'Effect of different rootstocks on success of *in vitro* shoot tip grafting in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) cv. Nagpur Seedless', *R. J. f Biotech*, vol. 3, no. 3, pp. 25-9.
12. Estrada-Luna, AA, Lopez-Peralta, C & Cardenas-Soriano, E 2002, 'In vitro micrografting and histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.)', *Scientia Horticulturae*, no. 92, pp. 317-27.
13. Kapari-Isaia, Th, Minas, GJ, Polykarpou, D, Iosephidou, E, Arseni, SP & Kyriakou, A 2002, 'Shoot-tip grafting *in vitro* for elimination of viroids and citrus psorosis virus in the local Arakapas mandarin in Cyprus', *Fifteenth IOCV Conference*, 2002-Short Communications, pp. 417-9.
14. Lamhamedi, MS, Chamberland, H & Tremblay, FM 2003, 'Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization', *Physiology Plantarum*, no. 118, pp. 554-61.
15. Luo, J & Gould, JH 1999, 'In vitro shoot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 57, no. 3, pp. 211-3.
16. Magdalita, PM, Damasco, OP & Adkins, SW 2010, 'Effect of medium replenishment and acclimatization techniques on growth and survival of embryo cultured coconut seedlings', *Philippines Science Letters*, vol. 3, no. 2, pp. 1-9.
17. Navarro, L, Roistatcher, N & Murashige, T 1975, 'Improvement of Shot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus', *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, vol. 100, no. 5, pp. 471-79.
18. Naz, A, Jaskani, MJ, Abbas, H & Qasimi, M 2007, 'In vitro studies on micrografting technique in two cultivars of citrus to produce virus free plants', *Pak. J. Bot.*, vol. 39, no. 5, pp. 1773-8.

19. Pardhe, DD & Satpute, RA 2011, 'Effect of high concentration vitamins on germination of groundnut seeds (*Arachis hypogaea* L.) on MS medium *in vitro*', *Bioscience Discovery*, vol. 02, no. 1, pp. 101-3.
20. Poerwanto, R, Inoue, H, Ikoma, Y & Kataoka, I 1989, 'Effect of air and soil temperature on vegetative growth and flower bud differentiation of Satsuma Mandarin trees', *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, vol. 58, no. 2, pp. 275-81.
21. Ruilin, S, Rujian, W & Ke Chung 1996, 'Elimination of citrus pathogens by shoot-tip grafting and the establishment of citrus germplasm in Fujian Province, China', *Thirteenth ZOCV Conference, 1996-Surveys and Certification*, pp. 305-309
22. Sertkaya, G 2004, 'Effects of different rootstocks in micrografting on growing of Washington navel orange plants obtained by shoot tip grafting', *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, vol. 19, no. 2, pp. 82-8.
23. Sharma, S, Singh, B, Rani, G, Zaidi, AA, Halan, V, Nagpal, A & Virk, GS 2007, 'Production of Indian citrus ringspot virus free plants of Kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting', *J. Cent. Eur. Agric.*, no. 8, pp. 1-8.
24. Skirvin, RM 1980, 'Fruit crops: In cloning agricultural plants via *in vitro* technique. Conger, B.V. (ed.)', *C.R.S. Press, Boca Raton, FL USA*, pp. 51-139.
25. Thimmappaiah, GT, Puthra & Anil 2002, 'In vitro grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.)', *Scientia Horticulturae*, vol. 92, pp. 177-82.
26. Toma, RS & Mosleh, MS 2010, 'Factors involved in micropropagation and shoot-tip grafting of apple (*Malus domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus* sp. L.)', "World Food System – A Contribution from Europe", Tropentag, September 14-16, 2010 in Zurich, Department of Horticulture, College of Agriculture. University of Duhok, Iraq, pp. 1-4.
27. Triatminingsih, R, Purbiati, T & Widayati, E 1992, 'Citrus STG and its application in Indonesia', *Proc. of Asia Citrus Rehabilitation Conf*, Indonesia, pp. 77-88.
28. Yildirim, H, Onay, A, Suzerer, V, Tilkat, E, Ozden-Tokatli, Y & Akdemir, H 2010, 'Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars "Ferragnes" and "Ferraduel"', *Scientia Horticulturae*, no. 125, pp. 361-7.