

**PENYIMPANAN TANAMAN JERUK
(JAPANSCHÉ CITROEN) SECARA *IN VITRO* DENGAN
TEKNIK ENKAPSULASI**

SKRIPSI

**Disusun untuk melengkapi syarat-syarat
guna memperoleh gelar sarjana sains**



Disusun oleh :

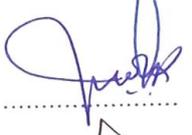
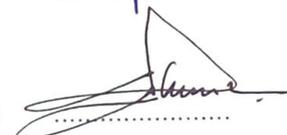
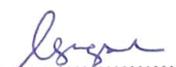
**RANI WULAN SUCI
3425122239**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
2016**

PERSETUJUAN PANITIA UJIAN SKRIPSI

PENYIMPANAN TANAMAN JERUK (JAPANSCHÉ CITROEN) SECARA IN VITRO
DENGAN TEKNIK ENKAPSULASI

Nama : Rani Wulan Suci
No. Reg : 3425122239

	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab Dekan	: <u>Prof. Dr. Suyono, M.Si</u> NIP. 19671218 199303 1 005		10/2-17
Wakil Penanggung Jawab Wakil Dekan	: <u>Dr. Muktiningsih, M. Si</u> NIP. 19640511 198903 2 001		10/2-17
Ketua	: <u>Dra. Yoswita Rustam, M.Si</u> NIP. 19530909 198010 2 002		6/2-17
Sekretaris/Penguji I	: <u>Dr. Adisyahputra, M.S</u> NIP. 19601111 1998703 1 003		9/2-17
Anggota Pembimbing I	: <u>Dr. Reni Indrayanti, M.Si</u> NIP. 19621023 199803 2 002		3/2-17
Pembimbing II	: <u>Dr. Mia Kosmiatin</u> NIP. 19690917 199903 2 001		6/2-17
Penguji II	: <u>Agung Sedayu, M. Sc</u> NIP. 19750911 200112 1 004		3-2-17

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 24 Januari 2017

ABSTRAK

RANI WULAN SUCI. Penyimpanan Tanaman Jeruk (Japansche Citroen) secara *In Vitro* dengan Teknik Enkapsulasi. Skripsi. Program Studi Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta. 2016.

Enkapsulasi adalah teknik pembungkusan eksplan yang dapat berupa embrio somatik, meristem atau tunas pucuk dengan suatu pembungkus khusus sehingga eksplan tidak mudah rusak selama masa penyimpanan. Enkapsulasi menggunakan tunas buku Jeruk (*Citrus limon* (L.) Osbeck cv. Japansche Citroen) sebagai eksplan. Jeruk ini banyak digunakan sebagai batang bawah karena memiliki karakter unggul berupa tahan kering dan organ batang yang kokoh. Tanaman ini juga lebih cepat pertumbuhannya dibandingkan jeruk RL dan Volkameriana. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kombinasi media yang tepat untuk enkapsulasi eksplan tunas buku jeruk JC dan lama penyimpanannya secara *in vitro*. Metode yang digunakan adalah eksperimen. Penelitian ini terdiri dari 3 tahapan. Tahapan pertama adalah percobaan pendahuluan. Percobaan pendahuluan ini terdiri dari perkecambahan biji JC (Japansche Citroen), regenerasi tunas buku jeruk JC tanpa perlakuan enkapsulasi, Pengaruh jenis alginat terhadap bentuk kapsul dan enkapsulasi eksplan pada zat osmoregulator sukrosa dan manitol. Hasilnya menunjukkan jika penambahan asam giberelat (GA_3) pada media perkecambahan menyebabkan perkecambahan lebih cepat. Regenerasi tunas lebih baik pada media MS+VMW+Kin 0.3 mgL^{-1} , pembentukan kapsul menggunakan alginat tipe kepadatan tinggi dan zat osmoregulator manitol pada enkapsulasi lebih baik dibanding sukrosa. Tahapan kedua adalah mengulang enkapsulasi dan penyimpanan eksplan selama 5 bulan pada media manitol. Hasil membuktikan bahwa pada kombinasi media alginat dan media inkubasi yang dapat menyimpan eksplan selama 5 bulan ada dua yaitu : MS+VMW dengan penambahan Manitol 3% dan $\frac{1}{2}$ (MS+VMW) Manitol 3%; MS+VMW dengan penambahan Manitol 4 % dan $\frac{1}{2}$ (MS+VMW) dengan penambahan Manitol 4%. Tahapan ketiga adalah regenerasi eksplan yang sudah dienkapsulasi dan disimpan lalu dibandingkan dengan kontrol. Hasil analisis menunjukkan terdapat perbedaan waktu bertunas dan berakar antara eksplan yang sudah dienkapsulasi dan disimpan dengan kontrol, namun tidak ada perbedaan pada karakter pertumbuhan eksplan setelah 12 MST (Minggu Setelah Tanam), sehingga hal ini membuktikan bahwa teknik enkapsulasi dapat menyimpan eksplan buku satu tunas jeruk JC selama lima bulan tanpa mengubah karakter pertumbuhannya.

Kata Kunci : *Enkapsulasi, Osmoregulator, Penyimpanan In Vitro, Regenerasi*

ABSTRACT

RANI WULAN SUCI. Storage of Citrus (Japansche Citroen) with In Vitro Encapsulation Technique. Thesis. Biological Studies Program. Department of Biology, Faculty of Mathematics dan Natural Sciences, State University of Jakarta. 2016.

Encapsulation is a technique of wrapping explants such as somatic embryos, meristems or shoot tips with a special wrapper, so the explants are slow growth during storage period. Encapsulation using single node orange (*Citrus x limonia* cv. Japansche Citroen) as explants. This JC orange are widely used as a rootstock because it has excellent characters such as drought resistant dan stem firmly. The plant is also much faster growth than RL oranges dan Volkameriana. This study aims to determine the right media combination for the encapsulation of explants JC orange and period of storage. The method used was experiment. The study consisted three phases. The first stage is preliminary experiment. This preliminary experiment composed of seed germination of JC (Japansche Citroen), single node regeneration without treatment encapsulation, Effect types of alginate to capsules form and encapsulation explants on media consist of osmoregulator sucrose and mannitol. Result showed if the addition of hormone gibberellin on germination media causes faster germination. Better shoot regeneration on MS medium + VMW + Kin 0.3mg L^{-1} , encapsulation used alginate type high viscosity better than low viscosity and used osmoregulator mannitol in media better than sucrose. The second stage is repeated encapsulation and storage of explants for 5 months with mannitol in media. The results proved that the combination of alginate media and incubation media which is can stored explant for 5 months is twofold: MS + VMW with the addition of 3% Mannitol and $\frac{1}{2}$ (MS + VMW) Mannitol 3%; MS + VMW with the addition of 4% Mannitol and $\frac{1}{2}$ (MS + VMW) by addition of Mannitol 4%. The third stage is the regeneration of explants that have been encapsulated and stored and compared with controls. Results of the analysis showed there are differences in germinating and rooting time among the explants that have been encapsulated and stored with controls, but no difference in the growth character of the explants after 12 WAP (Weeks After Planting), so this proves that the encapsulation technique can saved explants one nodus shoot orange JC for five months without changing growth character .

Keywords: *Encapsulation, In vitro storage, Osmoregulator, Regeneration*

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmaniirrahiim. Dengan mengucapkan Syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa dan atas berkat rahmat serta kasih-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul : “Penyimpanan tanaman jeruk (Japansche Citroen) secara *in vitro* dengan teknik enkapsulasi. Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi sebahagian syarat memperoleh gelar Sarjana Sains (S. Si) di program studi Biologi, Universitas Negeri Jakarta.

Laporan skripsi yang telah selesai ini merupakan bentuk semangat dan bantuan beberapa pihak, sehingga pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat penulis mengucapkan terima kasih bagi semua pihak yang telah memberikan bantuan moril maupun materil dalam penyusunannya. Pihak tersebut yaitu : Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), peneliti, staf dan *outsourcing* di laboratorium sel dan jaringan Kultur *in vitro* kelompok peneliti Biologi Sel dan Jaringan (BSJ).

Terimakasih kepada dosen pembimbing Ibu Dr. Reni Indrayanti, M.Si dan Dr. Mia Kosmiatin, M.Si yang telah memberikan kritik, saran bimbingan dan arahan yang sangat berguna dalam penyusunan laporan skripsi ini. Terimakasih kepada dosen pembimbing akademik Ibu Dra. Yoswita Rustam, M. Si yang telah mendampingi dan memberi naseha yang positif kepada penulis. Penulis berterimakasih juga kepada teman seperjuangan Reni's child (Amalia, Riza, Stefani, Debby, Hery, Puput, Ka Bagus, Ka Upi dan Ka

Nani) dan teman sepenanggungan (Mas Eris, Mba Fitri dan Wury) yang tak henti memberi motivasi dan kegembiraan. Rasa teristimewa penulis ucapkan kepada orang tua penulis yaitu Ibu Sutini dan Bapak Rahmat Jais yang merupakan pemberi utama dalam semua kegiatan yang penulis lakukan baik dalam hal material, kasih sayang, motivasi dan banyak hal positif lainnya.

Terima kasih sekali lagi penulis ucapkan, semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan dan menjadi bahan masukan dalam dunia sains. Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih belum sempurna. Oleh sebab itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan.

Jakarta, 19 November 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN	
ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA, KERANGKA BERPIKIR DAN HIPOTESIS	
A. Kajian Pustaka	
1. Jeruk JC (Japansche Citroen)	6
2. Penyimpanan Secara <i>In vitro</i>	9
3. Enkapsulasi	14
4. Regenerasi.....	19
B. Kerangka Berpikir	22
C. Hipotesis Penelitian.....	23
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Tujuan Operasional	24
B. Tempat dan Waktu	24
C. Bahan dan Metode Penelitian	24
D. Tahapan Penelitian	30

E. Teknik Pengumpulan Data	34
F. Teknik Analisis Data	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Percobaan pendahuluan.....	
1. Perkecambahan biji JC(Japansche Citroen) secara <i>in vitro</i> ..	35
2. Optimasi media regenerasi tunas buku jeruk JC.....	40
3. Pengaruh jenis alginat terhadap bentuk kapsul.....	47
4. Pengaruh penambahan jenis zat osmoregulator pada media enkapsulasi	48
B. Enkapsulasi eksplan buku satu tunas jeruk JC (Japansche Citroen) dengan penambahan manitol.....	49
C. Regenerasi eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan.....	55
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	59
B. Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	70
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Deskripsi umum varietas Jeruk JC (Japansche Citroen).....	8
2. Desain Percobaan Optimasi Media Regenerasi.....	26
3. Desain percobaan pengaruh penambahan jenis zat osmoregulator pada media enkapsulasi	28
4. Desain Penelitian interaksi antar media inkubasi dengan media enkapsulasi	29
5. Hasil pengamatan perkecambahan jeruk JC secara <i>in vitro</i> pada media dasar MS+VMW dan ditambahkan asam giberelat (GA) Minggu Setelah Tanam (MST)	37
6. Regenerasi eksplan buku satu tunas jeruk JC setelah 12 MST	41
7. Skoring kualitas kapsul setelah masa penyimpanan selama 5 bulan	52
8. Perbandingan regenerasi eksplan buku satu tunas hasil enkapsulasi dan penyimpanan dengan eksplan kontrol setelah 12 MST	56

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Jeruk JC	7
2. Degradasi warna kulit buah Jeruk JC	7
3. Rumus bangun Manitol	14
4. Struktur Alginat	15
5. Pembentukan gel pada alginat dengan penambahan larutan kalsium	16
6. Enkapsulasi tanaman.....	18
7. Rumus bangun senyawa ZPT	22
8. Diagram alir penelitian penyimpanan eksplan jeruk JC dengan teknik enkapsulasi	25
9. Rerata jumlah akar pada perkecambahan jeruk JC secara <i>in vitro</i> .	38
10. Rerata jumlah tunas dan Rerata jumlah daun pada perkecambahan biji jeruk JC secara <i>in vitro</i>	39
11. Kecambah steril hasil perkecambahan jeruk secara <i>in vitro</i>	40
12. Keragaman performa tunas hasil regenerasi dari eksplan buku satu tunas jeruk JC	43
13. Grafik Jumlah tunas eksplan buku satu tunas jeruk	44
14. Jumlah daun eksplan potongan buku jeruk	44
15. Kalus yang terbentuk pada media yang ditambahkan 2iP	46
16. Kategori skoring bentuk kapsul alginat	47
17. Rerata kondisi eksplan pada berbagai kombinasi zat osmoregulator	49
18. Katogeri skoring nilai kondisi eksplan selama masa penyimpanan.	50
19. Tendensi perkembangan jumlah eksplan hijau selama 5 bulan masa penyimpanan	54
20. Performa regenerasi eksplan.....	58

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Hasil percobaan pendahuluan tahap ke-4.....	70
2. kandungan Media Dasar	72
3. Hasil Analisis Statistik dengan SPSS 20.0	73
4. Pembuatan kapsul	85

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Jeruk merupakan komoditas buah-buahan yang memiliki nilai ekonomi di Indonesia. Buah jeruk mempunyai prospek yang baik untuk dikembangkan dan merupakan salah satu buah unggulan nasional karena banyak dikonsumsi sebagai sumber nutrisi terutama vitamin C oleh penduduk baik dalam negeri maupun luar negeri. Produktivitas buah jeruk di Indonesia selalu mengalami penurunan. Peristiwa ini karena faktor berkurangnya luas lahan dan sulitnya mendapatkan indukan yang unggul dan sehat. Data luas lahan dan produksi buah jeruk dari tahun 2012 ke tahun 2013 mengalami penurunan sebesar 1.722 Ha dan 42.963 ton (Pusdatin, 2015).

Budidaya tanaman jeruk untuk mendapat indukan yang unggul dan produktif juga dilakukan untuk memenuhi kebutuhan pasar. Metode umum yang dilakukan untuk mendapat indukan jeruk yang unggul adalah dengan menyambung atau menempel jenis jeruk yang memiliki produksi buah yang tinggi sebagai batang atas (*scion*) dengan jenis jeruk yang memiliki batang bawah (*rootstock*) yang kokoh. Salah satu jenis jeruk yang sering digunakan di Indonesia sebagai batang bawah adalah jeruk JC (Japansche Citroen).

Tanaman jeruk JC memiliki keunggulan berupa tahan kering, organ batang yang kokoh tebal serta susunan perakaran serabut yang luas dan kuat. Selain itu menurut Jayanti *et al.*, (2015) batang bawah JC memiliki kompatibilitas dengan tingkat keberhasilan tempelan tumbuh sebesar 100%

pada kultivar jeruk Citrumello (jeruk besar cikoneng) serta memiliki pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan jeruk RL dan Volkmeriana. Banyaknya keunggulan jeruk JC juga sebanding dengan kendalanya. Kendala pada tanaman ini adalah masa penyimpanan benih, tingginya tingkat poliembrio biji dan rasa buah yang asam. Rasa asam pada buah jeruk JC merupakan kendala karena kultivar ini dianggap tidak menguntungkan secara ekonomi serta dapat mempengaruhi rasa buah batang atas (Towill, 1992). Sementara itu jeruk ini merupakan sumber plasma nufah yang perlu dikonservasi. Benih jeruk JC dalam bentuk buah hanya dapat disimpan selama 7 hari dan indukan tidak bisa disimpan dalam bentuk biji, dikarenakan biji bersifat rekalsitran. Rekalsitran adalah biji yang masak dengan kandungan kadar air relatif tinggi, kondisi ini menyebabkan biji tidak bisa disimpan dengan pengeringan (Salisbury dan Ross, 2013).

Alternatif pemecahan masalah pada tanaman tersebut adalah konservasi dengan teknik kultur jaringan atau kultur *in vitro* (Suryowinoto, 1996). Terdapat tiga teknik konservasi *in vitro* yaitu penyimpanan pada media tumbuh atau subkultur berulang, penyimpanan secara kriopreservasi dan penyimpanan secara pertumbuhan minimal (Mariska *et al.*, 1996; Leunufna, 2004). Setiap teknik konservasi tersebut memiliki keunggulan dan kekurangan masing-masing, diantaranya pada penyimpanan dengan media tumbuh umumnya tidak diperlukan penambahan zat pengatur tumbuh dikarenakan dapat mempercepat pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Penyimpanan dengan media tumbuh memiliki kendala diantaranya adalah memerlukan tindakan subkultur yang frekuentif, sehingga membutuhkan

tenaga, waktu, dan biaya serta memperbesar peluang kontaminasi dan variasi somakonal. Teknik kriopreservasi menunjukkan bahwa tanaman hasil kriopreservasi bersifat stabil dan tidak berbeda dengan tanaman kontrolnya (Dewi, 2002). Teknik kriopreservasi dapat menyimpan materi genetik dalam jangka waktu lama tanpa mengubah materi genetik yang tersimpan. Teknik ini memiliki kendala berupa sulitnya penguasaan regenerasi tanaman hasil kriopreservasi, keterampilan pemeliharaan tanaman serta memerlukan dukungan teknis dan finansial (Roostika, 2008). Teknik penyimpanan secara pertumbuhan minimal memiliki keunggulan yaitu tidak memerlukan subkultur yang frekuentif sehingga mengurangi tingkat kontaminasi dan biaya yang relatif murah serta dapat menyimpan eksplan dalam jangka waktu menengah (<1 tahun) (Roostika, 2009). Penyimpanan pertumbuhan minimal dapat dilakukan dengan mengencerkan konsentrasi hara makro, meningkatkan konsentrasi zat osmotikum atau menambahkan zat penghambat pertumbuhan. Penelitian ini menggunakan teknik penyimpanan secara pertumbuhan minimal dengan setengah komposisi media MS (*Half strength*) serta dikombinasikan dengan meningkatkan konsentrasi zat osmotikum pada media enkapsulasi.

Enkapsulasi adalah proses pelapisan eksplan dengan media alginat. Hasil enkapsulasi disimpan di media cair atau media inkubasi untuk mempertahankan kelembaban kapsul. Media enkapsulasi dan media inkubasi ditambahkan manitol sebagai zat osmotikum. Hal ini dilakukan untuk menjaga stabilitas tekanan osmotik sel sehingga sel tetap viabel dan dapat tumbuh ketika dikulturkan kembali (Suryowinoto, 1989). Roostika *et al.*,

(2012), menyatakan bahwa teknik Ekpasulasi dengan penambahan manitol 4% dan diinkubasi pada akuades steril dapat menyimpan benih tanaman nanas dengan waktu maksimal masa simpan adalah 4 bulan. Hasil penelitian Gholami *et al.*, (2013) menunjukkan bahwa enkapsulasi buku tunas jeruk lemon eureka (*Citrus limon* cv. Eureka) dapat bertahan selama 8 minggu. Belum adanya penelitian teknik enkapsulasi dan penyimpanannya pada jeruk JC , menjadikan penelitian ini perlu dilakukan dan dikembangkan. Sehingga tujuan umum penelitian adalah mengetahui komposisi media yang tepat agar eksplan hasil enkapsulasi memiliki masa simpan yang maksimal, dan kualitas eksplan yang baik. Kualitas eksplan yang baik ditandai dengan lengkapnya regenerasi membentuk planlet.

B. Rumusan Masalah

1. Bagimanakah kombinasi media alginat (Ma)—media inkubasi (Mi) yang dapat menyimpan eksplan buku tunas jeruk Japansche Citroen (JC) secara maksimal?
2. Formulasi media regenerasi apa yang cocok untuk meregenerasikan buku tunas jeruk JC?
3. Apakah terdapat pengaruh enkapsulasi dan penyimpanan terhadap daya regenerasi eksplan tanaman jeruk JC ?

C. Tujuan penelitian

1. Mendapat kombinasi media untuk teknik enkapsulasi yang mampu menyimpan eksplan buku tunas jeruk JC.

2. Mengetahui media pertumbuhan yang optimum untuk regenerasi buku tunas jeruk JC.
3. Mengetahui daya regenerasi eksplan setelah dienkapsulasi dan disimpan.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi baru dalam hal pemecahan masalah penyimpanan koleksi biji rekalsitran secara *in vitro* khususnya dengan teknik enkapsulasi pada tanaman jeruk JC di Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA, KERANGKA BERPIKIR DAN HIPOTESIS

A. Kajian Pustaka

1. Jeruk JC (Japansche Citroen)

Tanaman jeruk JC (Japansche citroen) umumnya disebut jeruk citroen atau Rangpur Lime berasal dari India. Jeruk JC terkenal diberbagai negara dengan sebutan yang berbeda-beda, di Jepang jeruk ini bernama Hime Lemon dan di Brazil bernama Cravo Lemon (Webber dan Dexter, 1989). Jeruk JC telah ditanam di kebun Cukurgondang, Pasuruan sejak tahun 1924. Jeruk ini awalnya dibawa oleh orang Belanda ke Indonesia. Pada tahun 1936 tanaman ini berkembang dan menyebar ke wilayah-wilayah sentra produksi jeruk di Indonesia, termasuk di pulau Bali.

Jeruk JC secara umum sering digunakan sebagai batang bawah (*rootstock*) karena memiliki sifat tahan kekeringan, tidak mudah mati saat dipindahan dan kompatibel bila ditempel (okulasi) atau sambung (*grafting*) dengan beberapa macam varietas jeruk. Daun jeruk JC bertipe majemuk beranak daun tunggal dengan warna hijau, tepi daun rata dan ujung daun meruncing (Tjitrosoepomo, 2000). Buah jeruk bertipe hesperidium (variasi dari buah buni dengan tiga lapisan dinding buah). Lapisan itu terdiri dari Lapisan luar yang liat dan berisi kelenjar minyak, lapisan tengah yang serupa jaringan bunga karang dan berwarna keputih-putihan, serta lapisan dalam yang bersekat-sekat, dengan gelembung-gelembung berisi cairan di dalamnya yang disebut dengan bulir atau *pulp*. Biji buah tersebar di antara

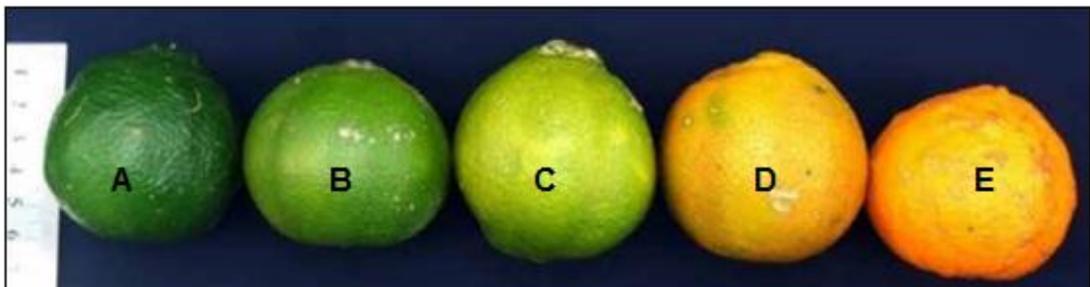
bulir-bulir. Bunga Jeruk tunggal, memiliki lima kelopak berwarna putih dengan banyak stamen (Gambar 1). Jeruk JC memiliki degradasi warna lapisan luar buah mulai dari hijau tua sampai dengan orange dengan rata-rata diameter buah adalah 6 cm (Gambar 2). Deskripsi jeruk JC diringkas pada Tabel 1.

Klasifikasi Jeruk JC (Carpenter, 1970) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Bangsa : Sapindales
 Suku : Rutaceae
 Marga : *Citrus*
 Jenis : *Citrus x limon* (L.) Osbeck cv. Japansche Citroen
 Sinonim : *Citrus x limonia* cv. Japansche Citroen



Gambar 1. Jeruk JC. (A). Pohon jeruk JC; (B). Tanaman jeruk JC berbuah; (C). Bunga (Mulyanto, 2014)



Gambar 2. Degradasi warna kulit buah Jeruk JC (Andrini, 2013). Fenotip jeruk E yang dipakai sebagai sumber eksplan

Tabel 1. Deskripsi umum varietas Jeruk JC (Japansche Citroen).

Komoditas	Jeruk
Bentuk buah	: Bulat
Berat per buah	: 89-100 gram
Daya simpan buah	: Pada suhu 23-25 ⁰ C masa simpan 5-7 hari setelah panen
Diameter Buah	: 5,1—6,6 cm
Hasil buah	: 30—75 kg/pohon/tahun
Rasa daging buah	: Asam
Tinggi Buah	: 5,2—6,4 cm
Tinggi tanaman	: 3,3 m
Umur tanaman	: (diperkirakan pohon induk tunggal) 9 tahun
Waktu berbunga	: Awal musim hujan
Waktu panen	: Juni sampai dengan Agustus
Warna daging buah	: kuning
Warna Kulit Buah	: hijau kekuningan
Wilayah adaptasi	: Beradaptasi dengan baik di dataran rendah sampai tinggi tinggi dengan altitude 300-900 m dpl.
Status	: Komersial

Sumber : <http://www.litbang.pertanian.go.id>

Jeruk JC yang dalam kondisi yang optimal mampu berbuah sepanjang musim dan bisa dipanen minimal tiga kali setahun. Perawatan yang dilakukan adalah pemangkasan tajuk. Kondisi lapangan yang mendukung pertumbuhan optimal jeruk JC adalah ketinggian 300—900 m dari permukaan laut baik di sentra tanaman jeruk maupun daerah lain seperti lahan konservasi dan tanah kering (Tegal). Tanaman mulai produksi dan berbuah saat umur 2—2,5 tahun.

Produksi buah satu pohon adalah 30—40 Kg. Populasi pohon jeruk JC sebesar 600—800 per hektar (tanah lereng) mampu menghasilkan ±13—15 ton buah jeruk. Puncak produksi tanaman ini saat umur 6—10 tahun. Saat umur tersebut pohon jeruk JC mampu menghasilkan buah masak 75—150 Kg buah. Rasa asam pada buah jeruk JC menyebabkan pemanenan dalam

bentuk biji. 100 Kg buah jeruk JC dapat menghasilkan $\pm 1-1,2$ Kg biji basah dan setelah dikeringkan menjadi 700–800 gram. Harga benih JC kering adalah Rp. 650.000 per Kg (Mulyanto, 2014). Biji kering selanjutnya didistribusi ke produsen untuk disemai dan menjadi benih.

Kebutuhan produsen benih jeruk JC selama 5 tahun sebelumnya dipasok dari daerah Brastagi, Kabupaten Karo-Sumut (Mulyanto, 2014). Benih didapat dan dihimpun dari beberapa pohon yang bukan dari kebun khusus tanaman jeruk JC sehingga pada musim tertentu benih jeruk JC menjadi langka dan mahal.

2. Penyimpanan secara *In vitro*

Konservasi adalah perlindungan atau pelestarian terhadap sesuatu yang penting bagi manusia dimasa sekarang dan yang akan datang. Menurut Wang *et al.*, (1993) konservasi tanaman pada prinsipnya bertujuan untuk menyimpan, melindungi dan mempertahankan keberadaan suatu plasma nutfah tanaman yang beraneka ragam sifat genetiknya tanpa menimbulkan perubahan yang merugikan untuk keperluan pemuliaan. Konservasi plasma nutfah sangat diperlukan untuk melindungi sumber keragaman genetik tanaman, preservasi jangka pendek, menengah dan panjang, studi genetik dan kegiatan pemuliaan serta sebagai bahan yang dapat dipertukarkan di dalam maupun ke luar negeri (Gunawan, 1992). Jenis tumbuhan yang umumnya dikonservasi adalah spesies liar dan kultivar lokal karena merupakan sumber keragaman sifat-sifat ketahanan, donor sifat-sifat kualitas hasil hibrida dan kultivar-kultivar baru serta sebagai donor sifat-sifat

agronomis (Widyastuti, 2000).

Konservasi dapat dilakukan dengan *in vitro* atau menanam tanaman secara kultur jaringan. Cara ini digunakan pada beberapa tanaman yang berbiji rekalsitran dan tanaman yang diperbanyak secara vegetatif (Imelda dan Soetisna, 1992). Konservasi *in vitro* dilakukan dengan beberapa alasan yaitu viabilitas benih terbatas, tidak ada biji tanaman, benih amat heterozigot dan benih tanaman rusak karena patogen didalamnya. Teknik tersebut sangat spesifik untuk setiap varietas dan jenis tanaman. Keuntungan melakukan konservasi *in vitro* adalah mampu menyimpan tanaman langka yang hampir punah dan tidak menghasilkan biji; tanaman bebas gangguan hama penyakit karena disimpan dalam keadaan aseptis; serta dapat dikerjakan dalam ruangan yang relatif kecil. Berdasarkan lama waktu penyimpanan, maka konservasi *in vitro* dibedakan menjadi dua jenis, yaitu : penyimpanan jangka pendek atau menengah dengan tujuan hanya menekan pertumbuhan untuk sementara atau kurang dari satu tahun dan penyimpanan jangka panjang dengan tujuan dalam waktu cukup lama dimana aktifitas metabolisme betul-betul dihentikan tetapi sel-sel yang disimpan tidak mati (Widyastuti, 2000). Terdapat tiga teknik konservasi *in vitro*, yaitu : teknik penyimpanan pada media tumbuh, kriopreservasi dan penyimpanan pertumbuhan secara minimal (Mariska *et al.*, 1996, Suryowinoto, 2000; Leunufna, 2004).

Teknik penyimpanan pada media tumbuh adalah menyimpan eksplan dalam media selama jangka waktu tertentu dan dipindahkan ke media yang sama setelah beberapa waktu. Umumnya jangka waktu penyimpanan

dengan teknik ini adalah 1 bulan. Penyimpanan dengan teknik ini kurang menghemat tenaga, waktu, dan biaya serta berisiko terhadap kontaminasi (Mariska *et al.*, 1996). Selain itu, berisiko terhadap timbulnya keragaman somaklonal (Eeuwens *et al.*, 2002).

Teknik kriopreservasi adalah menyimpan eksplan pada suhu yang sangat rendah dengan menggunakan nitrogen cair (Roostika, 2013). Kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan dalam nitrogen cair dan di inkubasi pada suhu -196°C , kemudian disimpan pada tekanan atmosfer dan kandungan O_2 yang rendah (Grout, 1990). Bahan tanaman yang dapat dikriopreservasi antara lain protoplast, sel, suspensi sel, kultur meristem, planlet, benih, embrio somatik maupun polen. Teknik kriopreservasi dapat menyimpan bahan dengan masa simpan jangka lama atau menahun. Teknik ini didasarkan pada *freeze-induced dehydration*, yaitu dehidrasi yang diinduksi dengan pembekuan pada suhu di bawah titik beku air hingga -40°C . Teknik pembekuan memiliki dua tahapan yaitu inkubasi sel pada krioprotektan dengan total konsentrasi 1–2 M yang menyebabkan dehidrasi moderat dan diikuti oleh pembekuan lambat, misalnya dengan kecepatan 1°C per menit hingga suhu -35°C , lalu pembekuan dalam nitrogen cair.

Teknik penyimpanan secara pertumbuhan minimal adalah menginkubasi eksplan pada media yang telah diencerkan. Kultur pada media dengan hara minimal sering digunakan untuk penyimpanan kultur jangka pendek sampai menengah dan teknik ini berhasil pula memperpanjang waktu subkultur pada kultur kultivar pisang (Hoesen, 2000). Penerapan teknik pertumbuhan minimal membuat eksplan dapat disimpan dalam jangka menengah atau

bulanan. Teknik pertumbuhan minimal baik dilakukan untuk tanaman tropika (Wattimena, 1992). Teknik ini dapat menggunakan zat retardan seperti *cycocel*, *ancymidol*, *succinic acid-2*, *2-dimetil hidrazida* (SADH) dan *paclobutrazol* (Dodds dan Roberts, 1987). Teknik pertumbuhan minimal juga dilakukan dengan menanam eksplan pada media kultur yang diberi osmoregulator seperti manitol dan sorbitol.

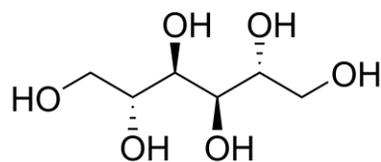
Regulator osmotik (osmoregulator) adalah suatu senyawa organik yang dapat mempengaruhi tekanan osmotik dalam media kultur sehingga mengurangi serapan hara mineral dan air oleh sel atau jaringan yang mengakibatkan terhambatnya pertanaman kultur (Dodds dan Roberts, 1985). Sukrosa, manitol, dan sorbitol yang merupakan produk fotosintesis utama banyak digunakan dan dilaporkan dapat memperpanjang masa simpan *in vitro* karena dapat berfungsi sebagai Osmoregulator (Chaorensu dan Phansiri, 2004; Hassan *et al.*, 2007; Shawky dan Aly, 2007).

Sukrosa fungsi utamanya merupakan sumber energi dan sumber karbon dalam kultur *in vitro* dan berperan dalam siklus sel (Tyas *et al.*, 2013), serta pembelahan dan pembentukan sel (Dewitte dan Murray, 2003). Pertumbuhan tanaman dalam kultur *in vitro* sangat tergantung pada konsentrasi sukrosa yang diberikan. Konsentrasi sukrosa dalam media dasar untuk mendapatkan pertumbuhan normal adalah 30 gL^{-1} (Murashige dan Skoog, 1962), sedangkan dalam konsentrasi yang sangat tinggi (90 gL^{-1}) sukrosa dapat berfungsi sebagai osmoregulator yang menghambat pertumbuhan tanaman (Pookma *et al.*, 2001). Penurunan konsentrasi sukrosa ($<30 \text{ gL}^{-1}$) dalam media kultur akan menyebabkan tanaman

memperlambat siklus selnya sehingga pembelahan serta pembentukan sel berjalan lambat dan menyebabkan pertanaman terhambat. Konsentrasi sukrosa 0,1M ($0,1\text{gL}^{-1}$) dan 0,2M ($0,2\text{ gL}^{-1}$) menurunkan pertumbuhan tanaman bawang putih Hassan *et al.*, (2007), *Dioscorea* sp. (Maurie *et al.*,1993) dan jeruk besar (Tyas *et al.*, 2012).

Penambahan manitol atau sorbitol pada konsentrasi tertentu ke dalam media kultur dapat menghambat pertumbuhan pada tanaman ubi-ubian (Borges *et al.*, 2004). Hal ini disebabkan terjadinya peningkatan tekanan osmotik media sehingga aliran nutrisi ke dalam jaringan tanaman terhambat. Manitol dan sorbitol seperti halnya gula juga dapat dimetabolismekan sebagai sumber energi oleh tanaman sesudah beberapa bulan dalam penyimpanan sehingga mengurangi efektivitas waktu simpan karena pertumbuhan yang meningkat. Manitol dapat dicerna tanaman jika dalam bentuk fruktosa dengan memutus ikatan alkohol.

Manitol adalah gula yang mengandung gugus alkohol dan memiliki berat molekul sebesar 182,172 g/mol. Manitol tidak berbau, larut dalam air dan sangat sukar larut dalam alkohol serta pelarut organik. Kelarutan manitol sebesar 22 gram dalam 100 gram air (Jamieson, 2012). Struktur kimia manitol adalah 1,2,3,4,5,6-*hexanehexol* ($\text{C}_6\text{H}_8(\text{OH})_6$) dan merupakan poliol (alkohol gula) (Gambar 3). Manitol ditemukan pada bahan alam seperti ganggang laut, jamur, dan eksudat pohon. Manitol merupakan isomer dari sorbitol, yang biasanya disintesis oleh hidrogenasi glukosa. Secara komersial manitol tersedia dalam bentuk bubuk kristal putih atau bentuk granular. Manitol bersifat asam dengan pH 6.3 (Shawkat *et al.*, 2012).



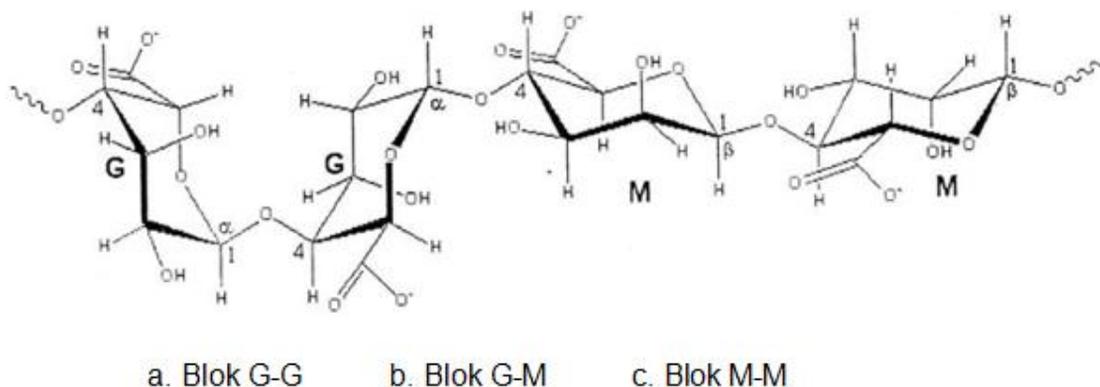
Gambar 3. Rumus bangun Manitol (Buchanan *et al.*, 2006)

3. Enkapsulasi

Enkapsulasi merupakan teknik pembungkusan eksplan bahan tanaman (embrio somatik atau meristem atau tunas pucuk) dengan pembungkus khusus yang membuat eksplan tidak mudah rusak, dapat disimpan dan tetap dapat tumbuh (Warnita dan Suliansyah, 2008). Enkapsulasi dirancang untuk memberikan proteksi fisik didalam kapsul sehingga menghambat pertumbuhan eksplan. Enkapsulasi merupakan pengembangan dari konsep produksi dan pemanfaatan benih sintetis. Benih sintetis pertama kali dikemukakan oleh Murashige tahun 1977 dan dikembangkan oleh Radenbaugh tahun 1984 (Cyr, 2000). Radenbaugh yang pertama kali melakukan teknik enkapsulasi untuk memproduksi benih sintetis dari embrio somatik tanaman alfalfa. Radenbaugh membungkus embrio somatik tersebut dengan natrium alginat.

Alginat adalah polisakarida alam yang umumnya terdapat pada dinding sel dari semua spesies alga coklat (*Phaeophyceae*). Natrium alginat didapat dengan pemurnian karbohidrat yang diekstraksi dari alga coklat dengan menggunakan basa lemah (Grasdalen *et al.*, 1979). Struktur asam alginat adalah kopolimer biner, terdiri dari residu β -D-mannuronat (M) dan α -L-asam guluronat (G) yang tersusun dalam blok-blok yang membentuk rantai linear (Grasdalen *et al.*, 1979). Kedua unit tersebut berikatan pada atom C1 dan

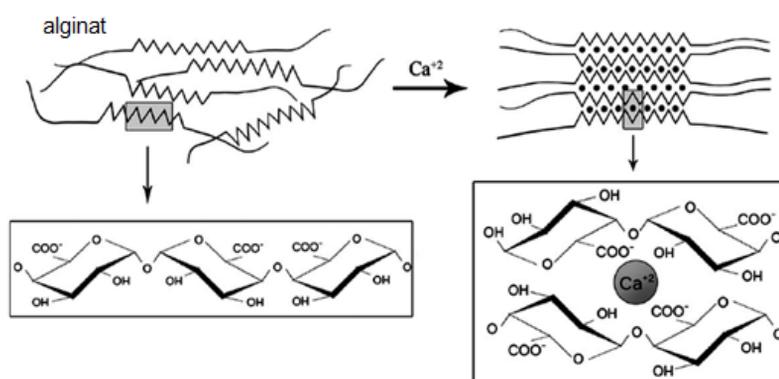
C4 dengan susunan homopolimer dari masing-masing residu (MM dan GG) dan suatu blok heteropolimer dari dua residu (GM) (Thom *et al.*, 1980; Son *et al.*, 2003) (Gambar 4).



Gambar 4. Struktur Alginat (Goksungur dan Zorlu, 2001)

Asam alginat tidak larut dalam air, karena itu yang digunakan dalam industri adalah dalam bentuk garam seperti natrium alginat atau kalium alginat. Alginat stabil pada pH 5–10. Alginat bersifat permeabel dibanding substrat agar dan dapat larut pada suhu kamar tanpa panas (Bapat *et al.*, 1987). Natrium alginat mempunyai kemampuan membentuk gel dengan penambahan larutan garam-garam kalsium seperti kalsium glukonat, kalsium tartrat dan kalsium sitrat. Pembentukan gel ini disebabkan oleh terjadinya kelat antara rantai L-guluronat dengan kation-kation divalent. Contoh kation-kation divalent seperti Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+} . Ikatan silang terjadi antara natrium aglinat dengan kation karena adanya kompleks kelat antara ion-ion divalent dengan anion karboksilat dari blok G-G membentuk struktur serupa telur dalam kotaknya (*egg in an egg box*) (Gambar 5).

Alginat dengan kandungan homopolimer G yang tinggi akan lebih kuat dibandingkan dengan alginat dengan kandungan homopolimer M yang tinggi. Ganggang *Macrocystis* memberikan alginat dengan viskositas yang sedang. Ganggang *Sargassum* memberikan hasil viskositas alginat yang rendah. Ganggang *Laminaria digitata* menghasilkan kekuatan gel lembut sampai sedang sementara *Laminaria hyperborea*, dan *Durvillaea* menghasilkan gel yang kuat (McHugh, 2003).



Gambar 5. Pembentukan gel pada alginat dengan penambahan larutan kalsium. Kalsium menggantikan natrium dalam alginat dan membentuk struktur *egg in an egg box*. (Prakash *et al.*, 2004)

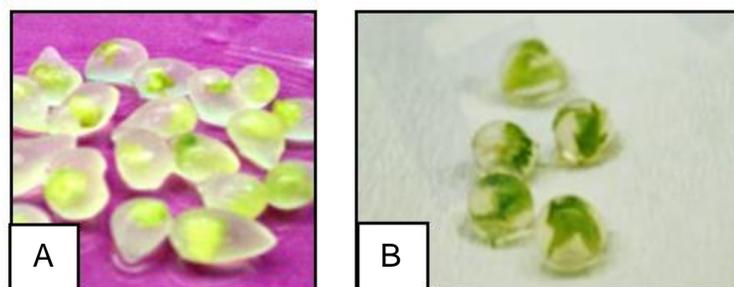
Gel yang dibentuk dari alginat lebih mudah dikontrol dan tidak mudah meleleh bila dipanaskan walaupun terdegradasi pada pH yang ekstrim (Robinson, 1987). Endapan juga lebih homogen dan stabil dapat diperoleh melalui pendinginan yang lambat larutan alginat dengan adanya ion kalsium. Kemampuan dari sifat natrium alginat (larut dalam air, membentuk gel) menyebabkan alginat cocok untuk teknik enkapsulasi.

Penelitian enkapsulasi menggunakan bahan selubung hidrogel natrium alginat telah berhasil dilakukan pada beberapa tanaman yaitu embrio somatik alfalfa dan seledri (Redenbaugh *et al.*, 1985), embrio somatik wortel

(Kitto dan Janick 1985). Setek buku tunggal mulberry (*Morus indica* L.) juga telah berhasil dienkapsulasi (Bapat *et al.*, 1987) dengan komposisi natrium alginat 4 % dan diinkubasi pada media MS. Enkapsulasi dengan 2% natrium alginat yang mengandung media MS berhasil pada tunas pucuk akasia (*Accasia mangium*) (Sudarmonowati dan Bachtiar 1994). Konsentrasi 2,5% berhasil dilakukan pada kentang (Warnita dan Suliansah, 2006). Konsentrasi 3% natrium alginat dapat dilakukan pada tunas pucuk pisang (Rao *et al.*, 1993). Warnita dan Suliansyah (2001) menunjukkan konsentrasi alginat terbaik untuk enkapsulasi kentang adalah 2,5 %. Warnita (2004) telah berhasil mengenkapsulasi planlet buku tunggal kentang dengan 2 % natrium alginat PA yang sebelum ditanam pada media MS padat yang mengandung 0.025 mgL^{-1} paclobutrazol. Enkapsulasi juga berhasil dilakukan pada jeruk Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour.) (Singh *et al.*, 2007) dan jeruk lemon eureka (*Citrus limon* cv. Eureka) (Gholami *et al.*, 2013).

Prinsip umum prosedur kerja dalam pembuatan enkapsulasi dibuat memadatkan alginat sehingga membentuk kapsul yang menyelubungi biakan tanaman. Proses pembuatan benih sintetik enkapsulasi dilakukan dengan cara (Shu, 2001) (1) pemotongan *Shoot buds* yang dari kultur tunas sebesar 2-3 mm dan dimasukkan dalam matriks kapsul. (2) embrio somatik atau *shoot bud* dimasukkan ke dalam larutan campuran dan dibentuklah kapsul lalu dikeraskan (Gambar 6). Kekerasan kapsul dikontrol melalui konsentrasi larutan campuran dan waktu mencampur. Ukuran kapsul ditentukan oleh ukuran dari embrio somatik atau shoot bud dan diameter dalam pipet yang digunakan. (3) Kapsul atau benih sintetik dikumpulkan, dan dibilas dengan

air. Benih sintetik harus cukup lentur sebagai bantalan dan melindungi embryo dan harus cukup keras untuk menahan kerusakan mekanis pada saat penyimpanan, *manufacturing*, transportasi dan pertanaman.



Gambar 6. Enkapsulasi tanaman. A. Pucuk aksilar pruatjan, B. Tunas tebu (Roostika *et al.*, 2006)

Media MS yang ditambah dengan vitamin Morel dan Wetmore (VMW) merupakan media yang optimum digunakan pada kultur Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) (Purwito *et al.*, 2015). Media ini juga dapat menginduksi akar sekunder pada tunas embrio somatik jeruk Siam Simadu (*Citrus nobilis* Lour) (Yulianti *et al.*, 2015). Media pada teknik enkapsulasi berfungsi sebagai sumber nutrisi dan pelarut alginat. Ganapathi *et al.*, (1992) menyatakan media White banyak digunakan untuk enkapsulasi pisang. Murashige dan Skoog (MS) digunakan pada enkapsulasi Jojoba (*Simmondsia chinensis* L.) (Hassan, 2003), Pamelo (*Citrus maxima* Merr.) (Tyas *et al.*, 2013).

4. Regenerasi tanaman

Regenerasi adalah kemampuan untuk memperbaiki bagian yang rusak (Roostika, 2005). Mekanisme ini dapat dilakukan melalui organogenesis langsung, organogenesis tidak langsung dan embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik adalah suatu proses pertumbuhan dan perkembangan suatu sel atau jaringan somatik membentuk tanaman baru tanpa melalui fusi gamet (Husni *et al.*, 2010). Menurut Gray, (2005) Embriogenesis somatik merupakan salah satu proses regenerasi tanaman dari sel somatik dengan serangkaian proses pertumbuhan dan perkembangan yang menyerupai embriogenesis zigotik melalui tahapan proembrio, embrio tahap globular, tahap hati, tahap torpedo, tahap kotiledon, pematangan dan perkecambahan.

Organogenesis langsung adalah proses pembentukan tunas adventif langsung dari eksplan. Tunas adventif yang dihasilkan berstruktur unipolar dengan jaringan pembuluh yang masih terhubung dengan jaringan induknya (Qosim, 2006). Organogenesis tidak langsung adalah proses pembentukan tunas adventif melalui pembentukan kalus terlebih dahulu (Goh *et al.*, 1990). Regenerasi eksplan melalui organogenesis secara garis besar dilakukan dalam dua tahap, yaitu induksi tunas dan multiplikasi tunas. Tahapan induksi tunas, eksplan ditanam pada media induksi tunas. Jenis dan komposisi media untuk induksi tunas, disesuaikan dengan jenis tanaman. Al-Bahrany (2001), menyatakan bahwa panjang tunas maksimum jeruk nipis diperoleh dari media yang mengandung $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ BAP dikombinasikan dengan 1

mgL⁻¹ Kinetin.

Jaringan yang digunakan sebagai eksplan adalah jaringan meristem atau jaringan parenkim dikarenakan kemampuan regenerasinya yang tinggi (Purnamaningsih, 2003). Jaringan meristem adalah jaringan muda yang belum mengalami diferensiasi dan masih aktif membelah (meristematik). Jaringan ini biasa ditemukan pada tunas apikal, tunas aksiler, bagian tepi daun, ujung akar, dan kambium batang. Tipe jaringan parenkima yaitu jaringan penyusun tanaman muda yang sudah mengalami diferensiasi dan menjalankan fungsinya (Yeoman, 1986). Contoh jaringan tersebut adalah jaringan daun yang sudah berfotosintesis dan jaringan batang atau akar yang berfungsi sebagai tempat cadangan makanan.

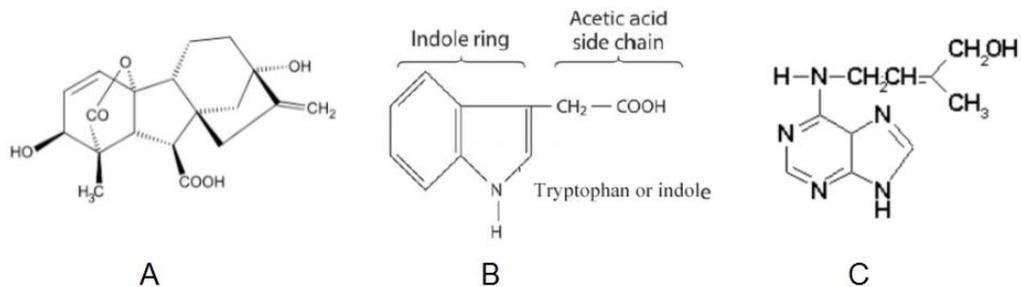
Faktor-faktor yang mempengaruhi regenerasi yaitu (Rohani *et al.*, 2012) : **Eksplan** (bagian tanaman yang dipergunakan sebagai bahan awal untuk perbanyak tanaman). Faktor eksplan yang penting adalah genotipe atau varietas, umur eksplan, letak pada cabang, dan seks (jantan/betina). **Lingkungan tumbuh.** Lingkungan tumbuh yang dapat mempengaruhi regenerasi tanaman meliputi pH, temperatur, waktu penyinaran, intensitas penyinaran, kualitas sinar, dan ukuran wadah kultur. **Media tumbuh,** dalam media tumbuh mengandung komposisi garam anorganik, zat pengatur tumbuh, dan bentuk fisik media. Terdapat 13 komposisi media dalam kultur jaringan, antara lain: Murashige dan Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM), Knop, Knudson-C, danerson, Murashige dan Tucker (MT), Morel dan Wetmore (MW). Media yang sering digunakan secara luas adalah MS. Media tersebut berfungsi untuk penyediaan air, hara mineral, vitamin, zat

pengatur tumbuh, akses ke atmosfer untuk pertukaran gas, dan pembuangan sisa metabolisme tanaman pada proses regenerasi kultur jaringan. Umumnya jaringan dikulturkan pada media padat yang dipadatkan dengan menggunakan agar, gelrite atau phytigel. Konsentrasi phytigel yang digunakan 0.25%. Konsentrasi agar yang tinggi menjadikan media keras dan sedikit air yang tersedia, sehingga difusi hara ke tanaman menjadi tidak optimum.

Media tanam memiliki kandungan : unsur-unsur mineral makro (Nitrogen (N) 25-60 mM, Kalium, Fosfor (P) 1-3 mM, Kalsium (Ca) 1-3 mM, Magnesium (Mg) 1-3 mM, Sulfur (S) 1-3 mM)); unsur-unsur mikro (Besi (Fe) 1 mM, Mangan (Mn) 5-30 mM, Seng (Zn), Boron (B), Tembaga (Cu) 0.1 mM, Molybdenum (Mo) 1 mM, Cobalt (Co) 0.1 mM, Iodine (I) Nickel (Ni), aluminum (Al), dan silicon (Si); senyawa organik (gula, sukrosa, dan lainnya) 20 sampai 40 gL⁻¹; vitamin (thiamin (vitamin B1), nicotinic acid, pyridoxine (B6), dan myo-inositol); dan zat pengatur tumbuh.

Zat pengatur tumbuh adalah sekumpulan senyawa organik yang bukan hara atau nutrisi dan dibentuk secara alami maupun dibuat oleh manusia. Umumnya ZPT yang digunakan untuk kultur *in vitro* yaitu golongan auksin seperti Indole Acetic Acid (IAA), Naphthalene Acetic Acid (NAA), 2,4-D dan Indole Acetic Acid (IBA). Golongan Sitokinin seperti Kinetin, Benziladenin (BA), 2i-P, Zeatin, Thidiazuron, dan PBA, dan golongan Gibberelin seperti GA3 (Sirchi, 2008). Faktor yang perlu diperhatikan dalam penggunaan ZPT adalah konsentrasi, urutan penggunaan dan periode masa induksi dalam kultur tertentu. Penambahan konsentrasi ZPT berkisar antara satu milimol

per liter sampai dengan satu mikromol per liter.



Gambar 7. Rumus bangun senyawa ZPT. (A) asam giberelat (B) Auksin (C) Sitokinin (Davies, 2004)

B. Kerangka Berpikir

Jeruk JC adalah salah satu varietas jeruk yang tahan kering dan memiliki karakter unggul berupa batang yang kokoh tebal dan cocok di jadikan batang bawah dalam teknik inokulasi. Selain karakter jeruk yang unggul terdapat kendala pada jeruk berupa biji yang sifatnya rekalsitran sehingga tidak dapat disimpan dalam waktu lama. Alternatif pemecahan masalah ini adalah dengan teknik penyimpanan secara *in vitro*, diantaranya menggunakan pertumbuhan minimal dengan enkapsulasi. Penerapan teknik pertumbuhan minimal membuat eksplan dapat disimpan dalam jangka menengah (bulanan). Teknik ini juga memiliki keunggulan berupa tidak memerlukan subkultur yang frekuentif sehingga memperkecil tingkat kontaminasi, biaya dan tenaga. Enkapsulasi menggunakan media dasar MS yang ditambah dengan vitamin Morel dan Wetmore. Komposisi media tersebut paling lengkap dibandingkan dengan vitamin MS, karena mengandung biotin. Media juga ditambahkan manitol. Penambahan manitol atau sorbitol pada konsentrasi tertentu ke dalam media kultur dapat

menghambat pertumbuhan tanaman dikarenakan manitol berfungsi sebagai osmoregulator. Penelitian pada enkapsulasi benih tanaman nanas dengan enkapsulasi dan penambahan manitol 4% memiliki maksimal masa simpan selama 4 bulan (Roostika *et al.*, 2012). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengetahui masa simpan maksimal eksplan buku tunas jeruk JC pada media enkapsulasi serta mengetahui kemampuan regenerasi eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan.

C. Hipotesis Penelitian

1. Terdapat perbedaan kualitas eksplan dari setiap perlakuan media enkapsulasi
2. Terdapat pengaruh media pertumbuhan terhadap regenerasi buku tunas jeruk JC.
3. Terdapat perbedaan daya regenerasi antara eksplan yang diberi dan tidak diberi perlakuan penyimpanan ekapsulasi

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional

1. Menghitung persentase kualitas eksplan (hijau, coklat, tumbuh) buku satu tunas jeruk JC selama lima bulan.
2. Mengukur pertumbuhan eksplan buku tunas jeruk JC pada berbagai media regenerasi
3. Mengukur pertumbuhan regenerasi eksplan buku tunas jeruk JC setelah masa penyimpanan enkapsulasi

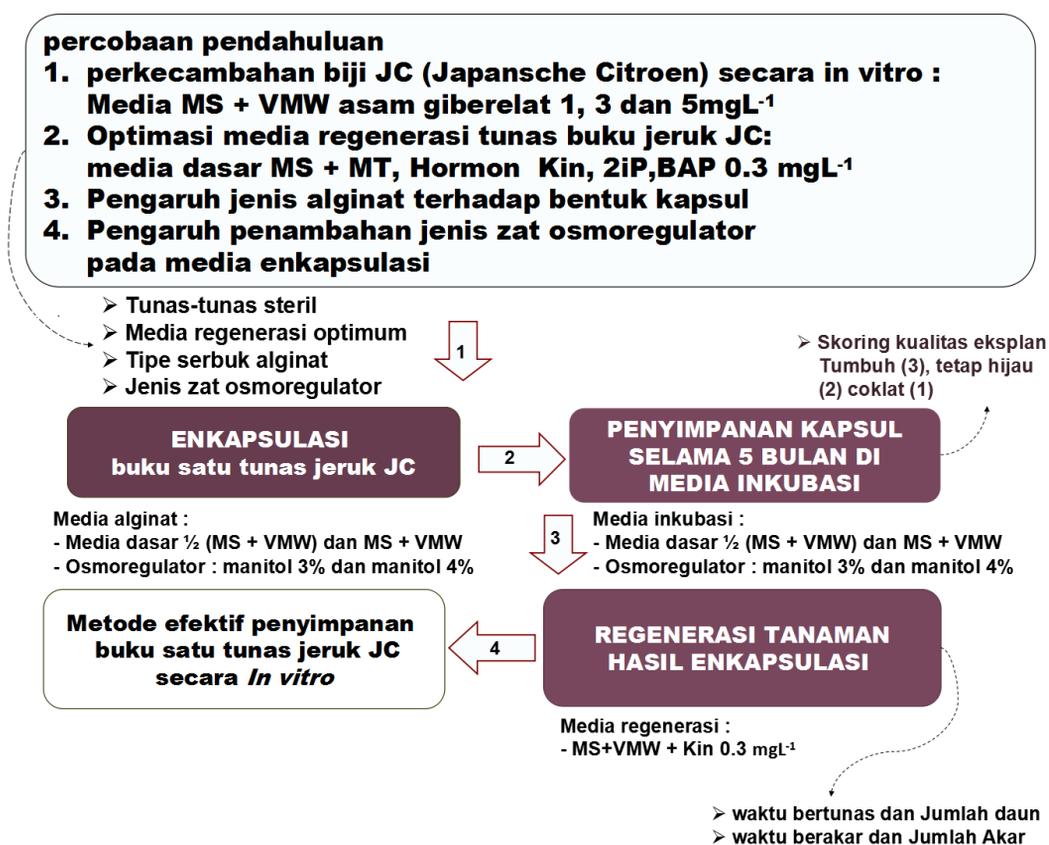
B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium kultur *in vitro* kelompok peneliti biologi sel dan jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB BIOGEN), Bogor. Periode penelitian adalah bulan September 2015 sampai bulan Juli 2016.

C. Bahan dan Metode Penelitian

Bahan yang digunakan adalah biji jeruk JC (Japansche Citroen) dari Koleksi Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO) dan dikecambahkan di laboratorium kultur *in vitro* kelompok peneliti biologi sel dan jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB BIOGEN).

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimen. Penelitian ini menggunakan rancangan lingkungan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL). Diagram alir (*road map*) penelitian disajikan pada Gambar 8. Serangkaian percobaan yang dilakukan untuk mencapai tujuan adalah sebagai berikut :



Gambar 8. Diagram alir penelitian penyimpanan eksplan jeruk JC dengan teknik enkapsulasi

Percobaan pendahuluan.

1. Perkecambahan biji JC (Japansche Citroen) secara *in vitro*

Biji jeruk JC dikecambahkan secara *in vitro* untuk mendapatkan tunas-tunas *in vitro* steril. Tunas tersebut akan digunakan dalam percobaan selanjutnya. Biji jeruk sebagai bahan tanaman dikulturkan pada media dasar

MS+VMW dan ditambahkan asam giberelat GA₃ dengan konsentrasi 1 mgL⁻¹, 3 mgL⁻¹ dan 5 mgL⁻¹. Tujuannya untuk mendapatkan formulasi media yang dapat menghasilkan kecambah yang lebih cepat. Setiap perlakuan ditanam pada 10 botol kultur dan setiap botol berisi 6 biji, sehingga diperoleh keseluruhannya adalah 180 unit pengamatan. Parameter yang diukur adalah waktu inisiasi akar dan daun; jumlah akar dan daun; tinggi tunas dan panjang akar. Pengamatan dilakukan selama enam minggu.

2. Optimasi media regenerasi tunas buku jeruk JC

Eksplan yang digunakan adalah buku satu tunas jeruk JC. Eksplan ditanam pada berbagai media regenerasi. Terdapat dua faktor pada optimasi media regenerasi (tabel 2). Faktor pertama adalah jenis media dasar (MS+VMW dan MT). faktor kedua adalah jenis zat pengatur tumbuh (ZPT). ZPT yang digunakan adalah golongan sitokinin (Kinetin, 2iP dan BAP) dengan konsentrasi sama yaitu 0.3 mgL⁻¹. Setiap perlakuan ditanam pada 8 botol kultur dan setiap botol berisi 4 eksplan, sehingga diperoleh keseluruhannya adalah 192 unit percobaan. Optimasi media regenerasi diamati selama tiga bulan. Parameter yang diukur adalah waktu inisiasi akar dan daun; jumlah akar dan daun; tinggi tunas dan panjang akar.

Tabel 2. Desain Percobaan Optimasi Media Regenerasi

Media dasar	Hormon		
	Kinetin 0.3 mgL ⁻¹	2iP 0.3 mgL ⁻¹	BAP 0.3 mgL ⁻¹
MS + VMW	A1	A2	A3
MT	B1	B2	B3

3. Pengaruh jenis alginat terhadap bentuk kapsul

Tujuan percobaan ini adalah mengetahui jenis alginat yang dapat menghasilkan bulatan kapsul yang sempurna. alginat yang digunakan adalah jenis kepadatan rendah (*low viscosity*) dan kepadatan tinggi (*high viscosity*). Sebanyak 3% (30 gL^{-1}) alginat dilarutkan pada media MS + VMW. Eksplan dimasukkan kedalam media alginat, kemudian eksplan diambil dengan pipet dan diteteskan ke larutan kalsium klorida ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Tetesan tersebut diinkubasi pada larutan kalsium klorida selama 30 menit, sehingga mengeras dan membentuk kapsul. Parameter pengamatan adalah jumlah kapsul bulat sempurna. Kapsul yang bulat diberi nilai 2 dan tidak bulat diberi nilai 1.

4. Pengaruh penambahan jenis zat osmoregulator pada media enkapsulasi

Percobaan dilakukan dengan membuat media alginat dan inkubasi pada media dasar MS+VMW dan ditambahkan zat osmoregulator. Tujuan percobaan ini adalah ingin mengetahui jenis zat osmoregulator yang cocok digunakan untuk teknik enkapsulasi eksplan buku satu tunas jeruk JC. Percobaan menggunakan zat osmoregulator sukrosa dan manitol. Zat tersebut diberikan pada media kapsul dan media inkubasi. Percobaan terdiri atas 2 faktor, yaitu jenis zat osmoregulator (2) dan media dasar (2). Setiap perlakuan terdapat enam kapsul dan satu kapsul berisi satu eksplan.

Tabel 3. Desain percobaan pengaruh penambahan jenis zat osmoregulator pada media enkapsulasi

media inkubasi (MI)		manitol 3%		manitol 4%		sukrosa 3%		sukrosa 4%	
		$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	MS + MW	$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	MS + MW	$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	MS + MW	$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	MS + MW
media alginat (MA)									
Manitol 3%	$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
	MS + VMW	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
Manitol 4%	$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
	MS + VMW	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
sukrosa 3%	$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
	MS + VMW	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
sukrosa 4%	$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
	MS + VMW	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8

Ket : VMW = Vitamin Morel dan Wetmore; MS=: Mushirage dan Skoog

Percobaan 1. Enkapsulasi eksplan buku satu tunas jeruk JC (Japansche Citroen) dengan penambahan manitol

Tunas yang sebelumnya sudah dikecambahkan secara *in vitro* diisolasi dan digunakan sebagai sumber eksplan percobaan ini. Percobaan teknik enkapsulasi dilakukan untuk mengetahui formulasi antara media alginat dan media inkubasi yang dapat menyimpan eksplan selama lima bulan. Percobaan ini mengulang kembali hasil dari percobaan pendahuluan tahap ke tiga. Percobaan terdiri dari 2 faktor dan setiap faktor terdiri dari 2 taraf. Faktor tersebut yaitu :

Media Alginat : 1. Konsentrasi manitol : 3 % dan 4%
 2. media dasar : $\frac{1}{2}$ (MS + VMW) dan MS + VMW

Media Inkubasi : 1. Konsentrasi manitol : 3 % dan 4%
 2. Media dasar : $\frac{1}{2}$ (MS + VMW) dan MS + VMW

Rancangan percobaan acak lengkap (RAL) dengan pola faktorial. Jumlah perlakuan 16 dengan pengulangan 12 ulangan. Sehingga unit percobaan menjadi 192 unit percobaan. Parameter yang diamati pada percobaan 2 adalah Kualitas eksplan selama masa penyimpanan. Kualitas ini dibagi jadi tiga kategori yaitu jumlah eksplan berwarna hijau, coklat, menembus kapsul dan jika eksplan tumbuh maka dicatat waktu awal eksplan menembus kapsul.

Tabel 4. Desain Penelitian interaksi antar media inkubasi dengan media enkapsulasi

Media Alginat (MA)	Media Inkubasi (Mi)	manitol 3%		manitol 4%	
		$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	MS + MW	$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	MS + MW
Manitol 3%	$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	A1	A2	A3	A4
	MS +VMW	B1	B2	B3	B4
Manitol 4%	$\frac{1}{2}$ (MS + VMW)	C1	C2	C3	C4
	MS +VMW	D1	D2	D3	D4

Ket : VMW = Vitamin Morel dan Wetmore; MS = Mushirage dan Skoog

Percobaan 2. Regenerasi eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan

Kapsul hasil enkapsulasi dan penyimpanan dibuka selubungnya sehingga didapat eksplan. Eksplan kemudian ditanam pada media agar.

Media yang digunakan adalah media hasil uji pendahuluan tahap ke dua. Tanaman selanjutnya disimpan diruang kultur pada suhu 26°C, Fotoperiodisitas 16 jam dan intensitas terang 800–1000 lux. Parameter yang diamati adalah regenerasi eksplan yang meliputi waktu inisiasi terbentuknya tunas, jumlah daun, jumlah tunas, tinggi tunas, waktu inisiasi akar, jumlah akar dan panjang akar. Regenerasi eksplan diamati selama 12 minggu. Data regenerasi eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan dibandingkan dengan eksplan tanpa perlakuan.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Pembuatan larutan stok dan zat pengatur pertumbuhan.

Larutan stok dibuat dengan cara menimbang bahan-bahan kimia sesuai komposisi media MS + VMW (lampiran 2), kemudian mengencerkannya dengan aquades. Larutan stok tersebut diaduk sampai homogen dengan magnetic stirrer, lalu dimasukkan dalam botol dan diberikan label pada tiap botolnya lalu simpan dalam kulkas. Larutan zat pengatur tumbuh dibuat dalam stok 1000 ppm. Serbuk kinetin, 2iP, BAP masing-masing ditimbang sebanyak 100 mg dan masing-masing dilarutkan dalam 1 mL HCL 0,1 N, lalu ditera dengan aquades sampai 100 mL.

2. Sterilisasi alat dan bahan kultur

Alat-alat seperti botol kultur, cawan petri, dan alat diseksi dicuci sampai bersih dengan detergen kemudian dikeringkan. Alat-alat tersebut kemudian

disterilisasikan dalam oven selama 2 jam. Bahan yang digunakan adalah buah jeruk JC. Buah disterilisasikan dengan cara direndam pada larutan alkohol 96% selama 30 menit, kemudian buah dilewatkan pada nyala api bunsen dan diulang sebanyak 2 kali agar kulit luar buah steril. Buah yang sudah steril kemudian dipotong dan diambil Bijinya. Semua proses sterilisasi bahan kultur dilakukan didalam *laminar air flow cabinet*.

3. Pembuatan media tanam

a. Media perkecambahan biji JC dan optimasi regenerasi

Media perkecambahan dibuat dengan menakar masing-masing larutan stok untuk media 1000 mL, gula sebanyak 30 gr, Asam giberelat atau GA₃ (1, 3 dan 5 mgL⁻¹) kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Tambahkan dengan akuades sampai mendekati 1000 mL. Larutan media kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* agar homogen, lalu dikondisikan larutan tersebut pada pH 5,8. Tambahkan NaOH 0,1 N jika larutan terlalu asam, atau HCl 0,1 N jika larutan terlalu basa. Larutan kemudian di tera hingga 1000mL dengan menambahkan akuades. Larutan ditambah agar phytigel sebanyak 2.5 gr, diaduk dengan *magnetic stirrer* agar homogen dan dipanaskan hingga mendidih diatas *hot plate*. Larutan dituangkan ke dalam botol kultur sebanyak ±25 ml per botol, kemudian botol kultur ditutup dengan *aluminium foil*. Media kemudian dimasukkan ke dalam otoklaf untuk disterilisasi dengan tekanan 1,5 psi(kg/cm²) pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

Pembuatan media dasar optimasi regenerasi sama seperti diatas hanya berbeda bagian dimasukkannya komposisi media dasar dan ZPT yang

digunakan. Media dasar MS + VMW dan MT dibuat dengan menakar hara makro mikro dan vitamin sesuai komposisi pada lampiran 2. ZPT yang digunakan pada optimasi media regenerasi adalah Kinetin, 2iP, BAP masing-masing sebanyak 0.3 mgL^{-1}

b. Media inkubasi dan media alginat

Media inkubasi dan media alginat dibuat dalam bentuk cair, sehingga tidak diperlukan penambahan agar. Cara membuat media tersebut adalah ditimbang hara makro, mikro dan vitamin sesuai takaran pada lampiran 2 dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Gula pada media disesuaikan dengan perlakuan. Larutan kemudian ditambahkan akuades sampai mendekati 1000 mL dan diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai homogen. Larutan dikondisikan pada pH 5,8 dengan menambahkan NaOH 0,1 N jika larutan terlalu asam, atau HCl 0,1 N jika larutan terlalu basa. Larutan kemudian ditera hingga 1000mL dengan ditambahkan akuades dan diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai homogen. Larutan kemudian dituangkan ke dalam botol kultur sebanyak ± 15 ml per botol. Botol kultur ditutup dengan *aluminium foil* dan disterilisasi ke dalam otoklaf dengan tekanan $1,5 \text{ psi}(\text{kg}/\text{cm}^2)$, suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah steril diinkubasi selama satu minggu untuk siap dipakai.

Cara membuat media dengan komposisi $\frac{1}{2}$ (MS+VMW) adalah dengan ditimbang semua takaran hara makro, mikro dan vitamin menjadi setengah atau dengan diencerkannya larutan media komposisi penuh sebanyak 500 mL menjadi 1000 mL dengan ditambahkan akuades. Proses

pembuatan media alginat sama dengan media inkubasi, perbedaannya adalah pada tahap ditambahkan serbuk alginat sebesar 3% (30 gL^{-1}) setelah larutan media ditera menjadi 1000 mL .

4. Pembuatan Enkapsulasi eksplan

Eksplan enkapsulasi berasal dari tunas *in vitro* steril yang diisolasi bagian bukannya. Eksplan buku satu tunas jeruk JC berukuran kurang dari 5mm. Enkapsulasi eksplan dilakukan dengan metode tetes di dalam LAFC (*Laminar air flow cabinet*). Eksplan dimasukan kedalam media alginat. Eksplan diambil dari media alginat menggunakan pipet plastik steril yang sudah dimodifikasi, dengan memotong bagian runcingnya, lalu media ditetes ke dalam larutan kalsium klorida ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Tetesan-tetesan tersebut direndam pada larutan selama 30 menit, sehingga tetesan mengeras dan membentuk bulatan kapsul. Kapsul kemudian dipindahkan menggunakan spatula steril ke dalam media inkubasi. Media Inkubasi selanjutnya disimpan pada suhu 26°C , Fotoperiodisitas 16 jam terang dan intensitas 800-1000 lux.

5. Regenerasi eksplan setelah penyimpanan dan enkapsulasi

Eksplan yang telah disimpan dan dienkapsulasi kemudian dikecambahkan (dilepas dari kapsul alginat) dan ditanam ke media regenerasi. Eksplan diamati pertumbuhannya setiap satu minggu sekali. Eksplan juga di subkultur sebulan sekali pada media yang sama seperti sebelumnya. Data hasil regenerasi eksplan ini akan dibandingkan dengan eksplan kontrol (eksplan yang tidak disimpan dalam kapsul) untuk mengetahui kemampuan regenerasinya setelah disimpan.

E. Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data pada percobaan dalam bentuk lembaran pengamatan dan dokumentasi. Pada percobaan pendahuluan meliputi : lembaran pengamatan jumlah tunas dan akar, panjang akar, tinggi tunas dan waktu inisiasi tunas dan akar pada tahap perkecambahan biji JC (Japansche Citroen), Optimasi media regenerasi, dan regenerasi eksplan. pengamatan tersebut dilakukan selama 12 minggu. lembaran pengamatan skoring percobaan pengaruh jenis alginat terhadap bentuk kapsul dan pengaruh penambahan jenis zat osmoregulator pada media enkapsulasi. Pada percobaan 1 data dikumpulkan berupa lembaran pengamatan presentase eksplan hijau, coklat dan tumbuh selama 1 bulan sekali. Pada percobaan 2 data dikumpulkan berupa lembaran pengamatan waktu inisiasi tunas dan akar, jumlah daun dan akar, panjang akar dan tinggi tunas selama 12 minggu.

F. Teknik Analisis Data

Jumlah tunas dan akar, waktu inisiasi tunas dan akar diolah secara statistik deskriptif dengan menghitung rerata dan standar error. Nilai skoring, panjang akar dan tinggi tunas diolah dengan ANOVA dan jika ada perbedaan dilanjutkan dengan uji DMRT (Duncan Multiple Range Test) dengan taraf 5 %

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Enkapsulasi merupakan pembungkusan bibit tanaman dengan bahan selubung khusus guna menyimpan eksplan selama periode tertentu. Serangkaian percobaan yang dilakukan memberikan gambaran umum bahwa teknik enkapsulasi dengan penambahan zat osmoregulator dapat menyimpan eksplan buku satu tunas jeruk JC selama periode lima bulan. Penyimpanan dengan teknik enkapsulasi juga memungkinkan eksplan tersebut tetap tumbuh normal setelah di tanam pada media regenerasi.

A. Percobaan pendahuluan

1. Perkecambahan biji JC (Japansche Citroen) secara *in vitro*

Perkecambahan dilakukan secara *in vitro* untuk mendapatkan tunas-tunas *in vitro* steril yang akan digunakan bagian buku atau nodus untuk sumber eksplan percobaan berikutnya. Sumber eksplan berupa biji buah jeruk JC. buah jeruk JC berasal dari Balitjestro (Balai Penelitian Tanaman jeruk dan Buah Subtropika), Malang. Rerata ukuran buah yang dipakai adalah 4.5 cm.

Penambahan asam giberelat pada media dikarenakan dapat memicu pematangan masa dormansi biji dan menyebabkan perkecambahan lebih cepat. asam giberelat eksternal yang diberikan akan mengubah level atau tingkat asam giberelat internal yang terdapat dalam biji, level inilah yang

merupakan faktor pemicu untuk terjadinya proses perkecambahan. Menurut Kamil (1982), asam giberelat didifusikan ke lapisan aleuron, dimana disintesa enzim-enzim hidrolitik seperti α -amilase, protease, beta glukonase, fosfatase. Enzim-enzim hidrolitik ini kemudian berdifusi ke endosperm, merubah kadar gula dan asam-asam amino. Zat-zat ini yang memicu perkecambahan embrio biji. Wilkins (1989) menyatakan asam giberelat meningkatkan aktifitas enzim proteinase yang mengubah protein menjadi asam amino serta enzim lipase yang mengubah lemak menjadi asam lemak dan gliserol sehingga, embrio pada biji dapat segera menjalankan fungsi metabolismenya. Perubahan cadangan makanan menjadi zat-zat yang lebih mobil menyebabkan pengangkutan merata keseluruhan bagian embrio sehingga benih dapat berkecambah (Goldworthy dan Fisher 1996). Kusumo (1984) menyatakan bahwa pembentukan enzim α -amylase terjadi pada saat permulaan perkecambahan oleh asam giberelat internal.

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Tabel 5, diketahui bahwa efek penambahan asam giberelat pada parameter waktu inisiasi akar, inisiasi tunas, panjang akar dan tinggi akar tidak berbeda nyata, tetapi penambahan asam giberelat dengan konsentrasi 3 mgL^{-1} merupakan perlakuan yang lebih memaksimalkan perkecambahan dibanding perlakuan lainnya. Hasil menunjukkan waktu berakar yang paling cepat adalah pada media dengan penambahan asam giberelat 3 mgL^{-1} dengan waktu rata-rata berakar 4.11 hari. Adanya penambahan asam giberelat eksternal menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah asam giberelat di dalam benih (Asra, 2014). Kusumo (1984), menyatakan bahwa asam giberelat internal berada dalam

jumlah terbatas atau belum aktif maka proses perkecambahan berjalan lambat. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian dimana penambahan asam giberelat dengan konsentrasi paling sedikit yaitu 1 mgL^{-1} mempunyai nilai waktu inisiasi terlama yaitu 5.11 hari. Penambahan asam giberelat 5 mgL^{-1} tidak terlalu baik, mungkin dikarenakan konsentrasi tersebut terlalu tinggi. Wilson (1983), menyatakan bahwa kelebihan asam giberelat dapat mempengaruhi pertumbuhan dan diferensiasi akar. Swaraz *et al.*, 2014 melaporkan perkecambahan biji jeruk besar (*Citrus grandis* L. Osbeck) secara kultur *in vitro* membutuhkan waktu 3-4 minggu dan secara *in vivo* membutuhkan waktu 5-7 minggu. Penelitian lain menyatakan, penambahan asam giberelat dalam perkecambahan biji jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.) secara *in vitro* mempercepat waktu berakar (Rahman *et al.*, 2007; Jajoo 2010).

Tabel 5. Perkecambahan jeruk JC secara *in vitro* pada media dasar MS + VMW dan ditambahkan asam giberelat (GA_3) 6 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan	Rerata			
	Waktu Berakar (Hari) \pm SE	Waktu Bertunas (Hari) \pm SE	Tinggi tunas (Cm) \pm SE	Panjang akar (Cm) \pm SE
GA_3 1 mgL^{-1}	5.11 ^a \pm 0.533	17.89 ^b \pm 0.633	4.31 ^a \pm 0.386	4.28 ^a \pm 0.629
GA_3 3 mgL^{-1}	4.11 ^a \pm 0.351	15.78 ^a \pm 0.618	6.12 ^b \pm 0.344	5.98 ^b \pm 0.328
GA_3 5 mgL^{-1}	4.78 ^a \pm 0.760	16.22 ^{ab} \pm 0.618	5.02 ^{ab} \pm 0.538	5.22 ^{ab} \pm 0.549

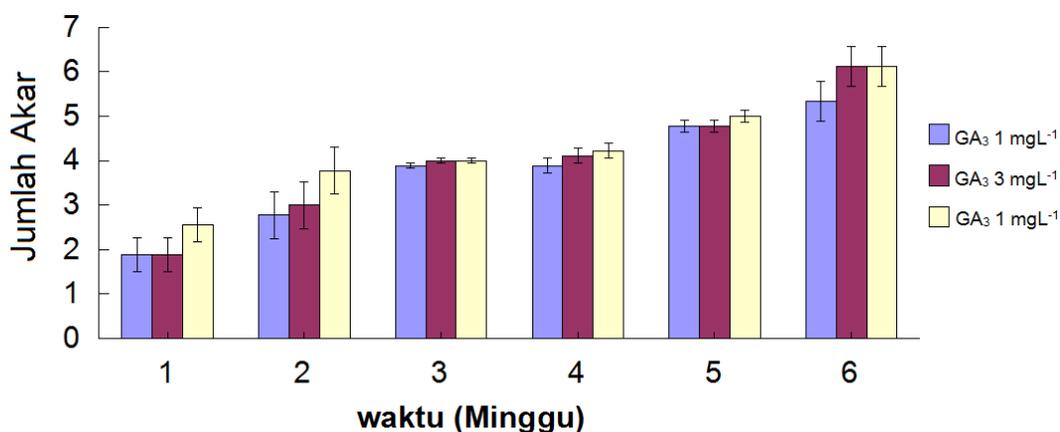
Ket : GA_3 = asam giberelat

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada $\alpha = 0,05$ uji Duncan.
(Mean \pm SE)

Hasil dari percobaan juga menunjukkan jika penambahan asam giberelat pada media meningkatkan presentase perkecambahan. Percobaan ini memiliki persentase perkecambahan biji sebesar 100 %. Putra (2015),

menyatakan jika penambahan asam giberelat ditingkatkan, maka perkecambahan meningkat hingga 71 % pada jeruk keprok. Perkecambahan kacang (*Calopogonium caeruleum*) yang ditambahkan asam giberelat 500 ppm meningkatkan persentase perkecambahan yang tinggi (Asra, 2014).

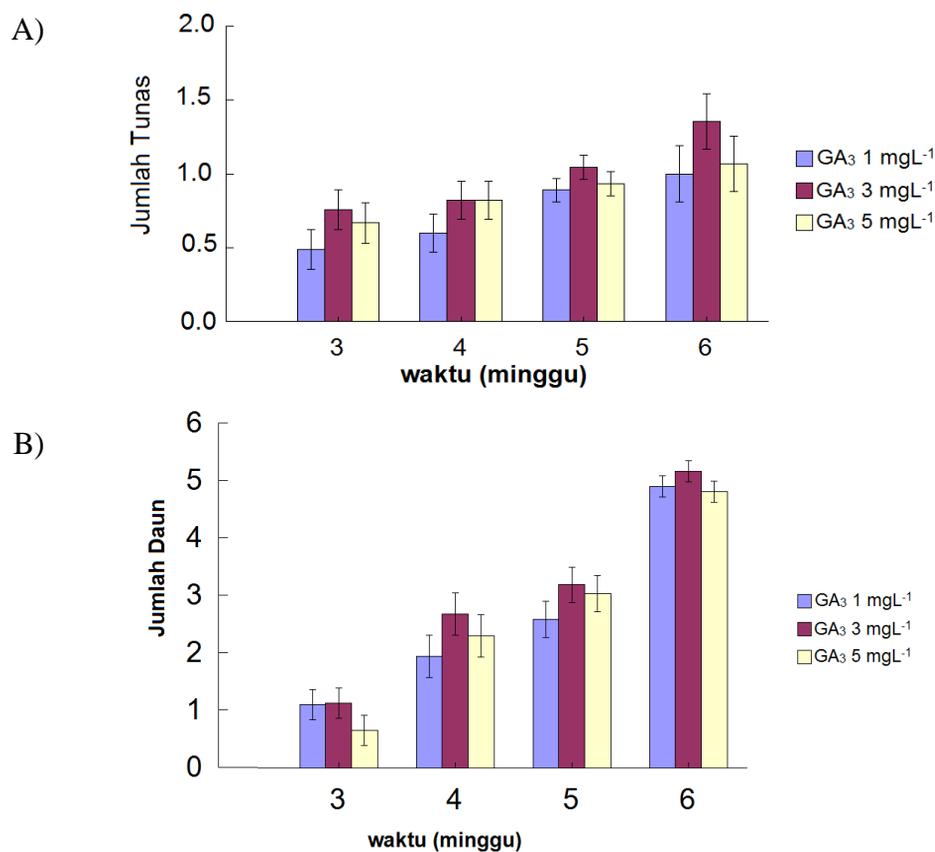
Hasil pengamatan parameter waktu rata-rata inisiasi tunas (15.78 hari), tinggi tunas (6.12 cm) dan panjang akar (5.98 cm) juga menunjukkan jika nilai yang tertinggi pada media dengan penambahan asam giberelat 3 mgL^{-1} . Hal ini dikarenakan waktu inisiasi akar yang lebih dahulu dan jumlah akar yang lebih banyak, sehingga hara terserap dengan lebih cepat ke seluruh bagian tanaman (Gambar 9). Samanhudi, (2010) menyatakan akar merupakan organ vegetatif utama yang memasok air, mineral, dan bahan yang penting lainnya untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sehingga semakin cepat munculnya akar maka semakin cepat pula air diserap oleh biji.



Gambar 9. Rerata jumlah akar pada perkecambahan jeruk JC secara *In vitro*

Grafik jumlah kecambah memperlihatkan jika setiap biji yang dikecambahkan dapat menghasilkan rerata 1.4 kecambah pada minggu ke-6 MST (Gambar 10). Hal ini menunjukkan bahwa biji jeruk JC tergolong jeruk

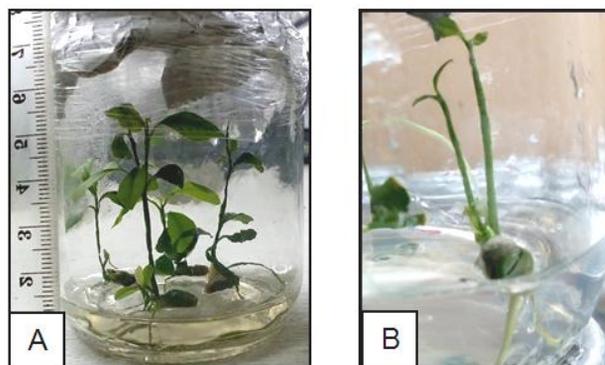
yang bersifat poliembrioni. Poliembrioni adalah perkembangan lebih dari satu embrio dalam benih yang sama (Hakim dan Anis, 2008). Setiono dan Supriyanto (2005), menyatakan bahwa biji jeruk bila dikecambahkan menghasilkan dua macam anakan yaitu anakan generatif yang berasal dari fertilisasi dan anakan vegetatif atau anakan nuselar.



Gambar 10. (A) Rerata jumlah tunas, (B) Rerata jumlah daun pada perkecambahan biji jeruk JC secara *In vitro*

Jumlah embrio nuselar pada biji jeruk dapat menjadi 12 embrio, tetapi yang mampu tumbuh rata-rata 4 semaian (Chanana dan Gill, 2008). Adanya embrio nuselar memungkinkan anakan yang tumbuh dari sel somatik yang mempunyai sifat sama dengan induknya. Jumlah daun rata-rata untuk kecambah adalah 6 daun, dimana tiap satu daun keluar dari buku satu.

Hasil memperlihatkan bahwa 1 biji jeruk yang dikecambahkan mampu menghasilkan dua anakan (Gambar 11). Pengamatan data perkecambahan dilakukan selama 6 minggu karena tinggi tanaman sudah tinggi maksimal. Lebih dari 6 minggu tanaman mulai mengalami klorosis karena kekurangan cahaya. Tinggi maksimal yang dimaksud adalah tinggi tanaman yang sudah setinggi botol kultur sehingga bagian pucuk yang tidak terkena cahaya mengalami pencoklatan.



Gambar 11. Kecambah steril hasil perkecambahan jeruk secara *in vitro*. (A) 1 biji menghasilkan 1 anakan (B) 1 biji menghasilkan 2 anakan

2. Optimasi media regenerasi tunas buku jeruk JC

Optimasi media regenerasi dilakukan pada 3 jenis sitokinin (2iP, BAP dan Kinetin) dan 2 media dasar (MT dan MS+VMW). Berdasarkan hasil pengamatan terlihat jika tunas lebih dahulu muncul dibandingkan akar. Eksplan hasil beberapa kombinasi media bahkan tidak menghasilkan akar sehingga memiliki nilai 0. Berdasarkan hasil pengamatan diketahui bahwa media MS+VMW+Kin 0.3 mgL^{-1} merupakan media yang optimum untuk regenerasi eksplan karena mampu menghasilkan nilai tertinggi pada parameter tinggi tunas (4.05 cm), panjang akar (2.63 cm), dan nilai waktu inisiasi akar (32.25 hari) dan inisiasi tunas (6.25 cm) tercepat serta

menstimulasi pertumbuhan tanaman menjadi planlet (Tabel 6), sehingga media ini digunakan untuk meregenerasikan buku satu tunas pada yang sudah disimpan dan dienkapsulasi.

Tabel 6. Regenerasi eksplan buku satu tunas jeruk JC setelah 12 MST

Perlakuan	Parameter Pengamatan			
	Inisiasi akar (Hari)	Inisiasi tunas (Hari)	Tinggi tunas (Cm)	Panjang akar (cm)
MS+VMW + Kin 0.3 mgL ⁻¹	32.25 ^b ± 3.028	6.25 ^a ± 0.861	4.05 ^a ± 0.166	2.63 ^a ± 0.263
MS+VMW + 2iP 0.3 mgL ⁻¹	41.25 ^a ± 1.508	7.88 ^a ± 1.355	2.79 ^c ± 0.114	2.13 ^b ± 0.295
MS+VMW + BAP 0.3 mgL ⁻¹	0 ^c ± 0.000	8.25 ^a ± 1.048	2.66 ^c ± 0.110	0 ^c ± 0.000
MT + Kin 0.3 mgL ⁻¹	0 ^c ± 0.000	15.38 ^b ± 2.692	1.89 ^d ± 0.063	0 ^c ± 0.000
MT + 2ip 0.3 mgL ⁻¹	0 ^c ± 0.000	15.75 ^b ± 2.852	2.19 ^d ± 0.091	0 ^c ± 0.000
MT + BAP 0.3 mgL ⁻¹	0 ^c ± 0.000	15.00 ^b ± 0.462	3.53 ^b ± 0.161	0 ^c ± 0.000

Ket : VMW = Vitamin Morel dan Wetmore; MS = Mushirage dan Skoog; MT= Murashige dan Tucker, 1969. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$ uji Duncan. (Mean±SE)

Komposisi media kultur mempengaruhi pertumbuhan jaringan dan organ tanaman. Hasil pada parameter pengamatan menunjukkan jika MS+VMW merupakan media yang lebih baik dibandingkan media MT. Kedua media dasar ini memiliki kandungan dan komposisi hara makro dan mikro yang sama, tetapi jumlah vitaminnya berbeda.

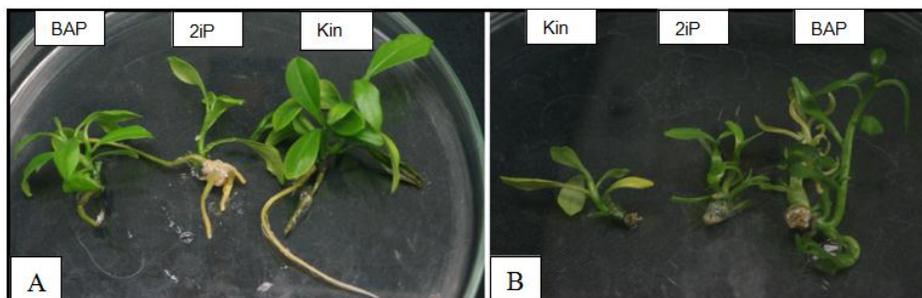
Vitamin berperan dalam proses pertumbuhan sebagai katalisator dalam proses metabolisme. Vitamin yang paling sering digunakan dalam kultur *in vitro*, antara lain tiamin (vitamin B1), piridoksin (vitamin B6), dan asam nikotinat (vitamin B3). Tiamin merupakan vitamin yang esensial pada kultur *in vitro*, zat ini berfungsi untuk mempercepat pembelahan sel (Widiastoety *et al.*, 2008). Tiamin berfungsi sebagai koenzim dalam metabolisme karbohidrat serta meningkatkan aktivitas ZPT yang terdapat dalam jaringan

tanaman, selanjutnya ZPT tersebut akan mendorong pembelahan sel-sel baru (Mead dan Bulard, 1979). Asam nikotinat atau yang umum dikenal dengan niasin berfungsi sebagai komponen koenzim Nikotinamida Adenin Dinukleotida (NAD) dan Nikotinamida Adenin Dinukleotida Fosfat (NADP) yang berada di semua sel dan berperan sebagai faktor berbagai oksidoreduktase yang terlibat dalam glikolisis dan metabolisme asam lemak (Hossain *et al.*, 2010). Piridoksin berperan penting dalam reaksi biokimia, khususnya dalam metabolisme asam amino.

Media dasar MS+VMW memiliki kandungan vitamin dengan penambahan Biotin (Vitamin H). Biotin bekerja sebagai kofaktor enzim karboksilase. Enzim karboksilase meliputi asetil Co-A yang membantu sintesis asam lemak, propionil Co-A karboksilase untuk metabolisme asam amino (Hildebrdan *et al.*, 2005). Piridoksin dengan asam nikotinat dan biotin mampu memacu proses perkecambahan dan pertumbuhan anggrek (*Dendrobium laxiflorum*) (Amalia *et al.*, 2013). Penelitian pada kultur jeruk keprok (*Citrus reticulata*) menunjukkan biotin secara signifikan mempengaruhi koenzim bagi piruvat karboksilase, salah satu jenis enzim yang berperan dalam metabolisme energi (Prihastanti *et al.*, 2016). Diab (2015), menyatakan adanya asam esensial organik seperti asam folat dan biotin dalam media kultur memainkan peran penting dalam mengarahkan dan mengangkut sitokinin. Biotin dan tiamin dalam media kultur juga dapat meningkatkan ketinggian sawit (Al-Khayri, 2011). Hutami *et al.*, (1999) menyatakan bahwa perbanyakkan *in vitro* tanaman nilam khimera melalui proliferasi tunas aksiler pada media dasar MS yang ditambah dengan

vitamin Morel dan Wetmore merupakan media optimum untuk memacu proliferasi tunas tanaman.

Bedasarkan hasil pengamatan terlihat jika visualisasi tunas yang tumbuh pada media dasar MT berbatang hijau muda, tekstur lunak dan daun lebih kecil dibanding media dasar MS+ VMW (Gambar 12). Hal ini disebabkan oleh konsentrasi vitamin pada media dasar MT (Murashige & Tucker, 1969) yang 10 kali lebih banyak dari media MS. Wattimena (1992), menyatakan bahwa vitamin pada media kultur dibutuhkan organisme dalam jumlah sedikit untuk regulasi. Senyawa vitamin digunakan tubuh untuk dapat bertumbuh dan berkembang secara normal (Gardner *et al.*, 1991).

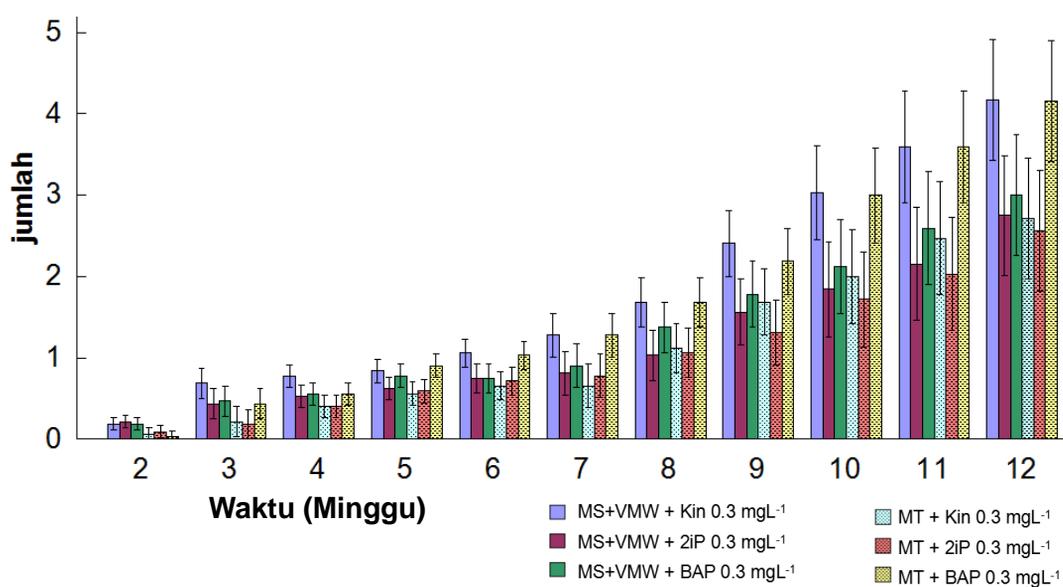


Gambar 12. Keragaman performa tunas hasil regenerasi dari eksplan buku satu tunas jeruk JC. (A) tunas pada media dasar MS+VMW, (B) tunas pada media dasar MT

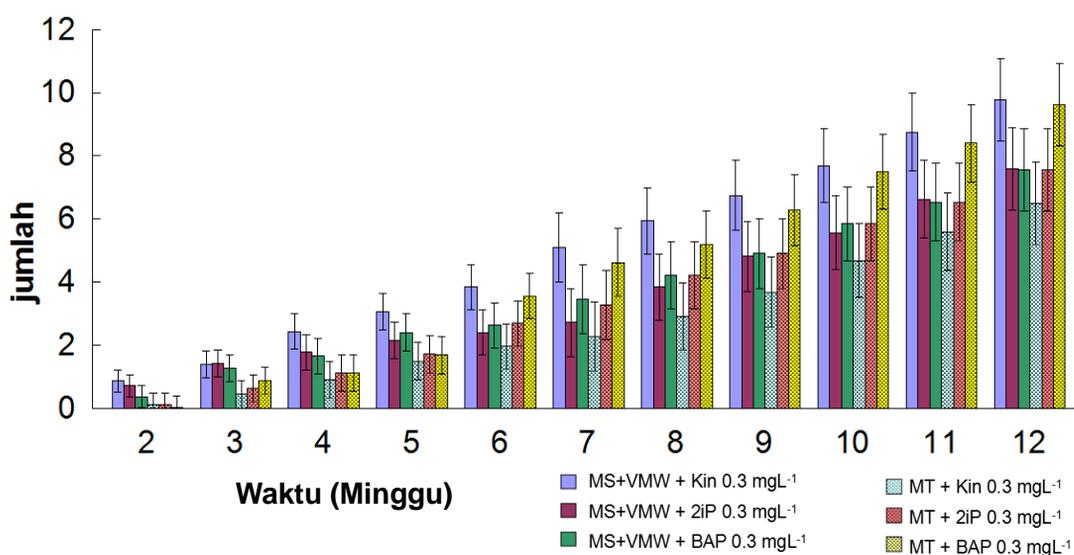
Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) berfungsi untuk mempercepat regenerasi eksplan. ZPT yang digunakan adalah sitokinin dan merupakan golongan turunan adenin. Golongan ini sangat penting dalam pengaturan pembelahan sel, organogenesis dan morfogenesis. Proliferasi tunas *in vitro* dan multiplikasi sebagian besar didasarkan pada formulasi media yang mengandung sitokinin (Mamidala dan Nanna, 2009; Hoque, 2010).

Hasil pengamatan jumlah tunas selama 12 MST diketahui jika terdapat multiplikasi tunas eksplan. Multiplikasi tertinggi terdapat pada media

MS+VMW + Kin 0.3 mgL^{-1} dengan jumlah 4.18 tunas dan terendah pada media MT + 2iP 0.3 mgL^{-1} dengan jumlah 2.56 tunas (Gambar 14). Purnamaningsih dan Lestari (2002), menyatakan bahwa hasil pertumbuhan yang optimum tergantung penggunaan media dasar dan zat pengatur tumbuh yang tepat sehingga, meningkatkan aktivitas pembelahan sel dalam proses morfogenesis dan organogenesis.



Gambar 13. Rerata jumlah tunas eksplan buku satu tunas jeruk



Gambar 14. Rerata jumlah daun eksplan potongan buku jeruk

Aktivitas ZPT di dalam regenerasi tanaman tergantung dari jenis, struktur kimia, konsentrasi, genotipe tanaman serta fase fisiologi tanaman (Dodds dan Roberts, 1982; George, 1993; Satyavathi *et al.*, 2004). Proses pembentukan organ seperti tunas atau akar terjadi karena ada interaksi antara zat pengatur tumbuh eksogen yang ditambahkan ke dalam media dengan zat pengatur tumbuh endogen yang diproduksi oleh jaringan tanaman (Winata, 1987). Penambahan auksin atau sitokinin ke dalam media kultur dapat meningkatkan konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen di dalam sel, sehingga menjadi “faktor pemicu” dalam proses tumbuh dan perkembangan jaringan (Poonsapaya *et al.*, 1989).

Hasil percobaan menunjukkan bahwa media MS+VMW + Kin 0.3 mgL^{-1} adalah yang paling optimum untuk regenerasi eksplan buku satu tunas jeruk JC. Konsentrasi ideal sitokinin berbeda antara tiap spesies dan perlu diperkirakan secara akurat untuk mencapai multiplikasi (Gomes *et al.*, 2010). Sitokinin yang sering digunakan dalam kultur jaringan adalah BAP dan Kinetin (George dan Sherrington, 1984). Keaktifan molekul sitokinin akan meningkat jika rantai samping pada molekul adenin memiliki satu atau lebih ikatan ganda. Kinetin (6-Furfuril Amino Purine) dan BAP (6-Benzyl Amino Purine) memiliki rantai samping lebih dari satu ikatan ganda, dan 2iP (N6-2-Isopentanyl adenin) memiliki satu ikatan ganda pada rantai samping sehingga, secara teoritis Kinetin dan BAP lebih aktif dari 2iP. Faktor lain yang dapat mempengaruhi regenerasi adalah pemilihan eksplan diantaranya organ sumber eksplan, umur organ, musim, ukuran dan kualitas tanaman induk (Nurwahyuni, 2001).

Kinetin dan BAP telah banyak diterapkan untuk regenerasi berbagai tanaman. Goswami *et al.*, (2013) melaporkan regenerasi eksplan tunas jeruk lemon (*Citrus x limon* L. cv. Kaghazi Kalan) optimum pada media BAP $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ atau kinetin $0,5 \text{ mgL}^{-1}$. Jumlah maksimum tunas jeruk (*Citrus megaloxycarpa*) diinduksi pada medium yang mengandung $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ BAP dan $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ kinetin (Haripyaree *et al.*, 2013).

Media yang ditambahkan 2iP, mengalami pembentukan kalus. Hal ini menunjukkan terjadi organogenesis tidak langsung. Lestari (2008) menyatakan bahwa pada pembentukan organ secara tidak langsung, eksplan akan tumbuh menjadi kalus meristematik terlebih dahulu sebelum membentuk tunas. Pada banyak jenis tanaman zat pengatur tumbuh 2iP merupakan sitokinin yang mempunyai daya aktivitas lebih lemah dibandingkan dengan sitokinin lainnya sehingga jarang digunakan. Pada tanaman nilam penggunaan 2iP menghasilkan tunas yang lemah dan kurus (Seswita *et al.*, 1996).



Gambar 15. Kalus yang terbentuk pada media regenerasi dengan penambahan ZPT 2iP setelah 12 MST.

3. Pengaruh jenis terhadap bentuk kapsul

Bubuk alginat yang diproduksi pabrik mengandung sejumlah komponen kimia. Masing-masing bahan kimia yang digunakan bervariasi sesuai dengan jenis bahan mentah yang digunakan. Berdasarkan hasil diketahui penambahan 3% (30 gL^{-1}) alginat menghasilkan nilai skoring 2, yang artinya 100% kapsul bulat terbentuk pada media alginat kepadatan tinggi (*high viscosity*). Media alginat kepadatan rendah (*low viscosity*) menghasilkan nilai skoring 1 yang artinya media tidak dapat menghasilkan kapsul bulat (Gambar 16). Bentuk bulat terjadi karena molekul natrium pada alginat digantikan dengan kalsium saat perendaman pada kalsium klorida sehingga membentuk sol kalsium alginat.



Gambar 16. Kategori skoring bentuk kapsul alginat. (a) Skoring 1, kapsul tidak bulat sempurna (b) Skoring 2, kapsul bulat sempurna

Prakash *et al.*, (2004), menyatakan bahwa perbandingan yang bervariasi dari ketiga segmen residu asam pada alginat menyebabkan perbedaan sifat produk yang dihasilkan. Alginat dengan kandungan asam guluronat tinggi akan mempunyai struktur yang kaku (*rigid*) serta mempunyai porositas yang besar, sedangkan yang mengandung asam manuronat tinggi mempunyai struktur yang kenyal (Morris *et al.*, 1978). Alginat dengan kandungan

Guluronat yang tinggi akan lebih kuat dibandingkan dengan alginat dengan kandungan mannuronat yang tinggi (McHugh, 2003). Alginat dengan kepadatan rendah berasal dari alga *Macrocytis pyrifera*. Inukai dan Masakatsu (1999), melaporkan bahwa *Macrocytis pyrifera* memiliki kandungan asam Guluronat 40% dan asam mannuronat 60%.

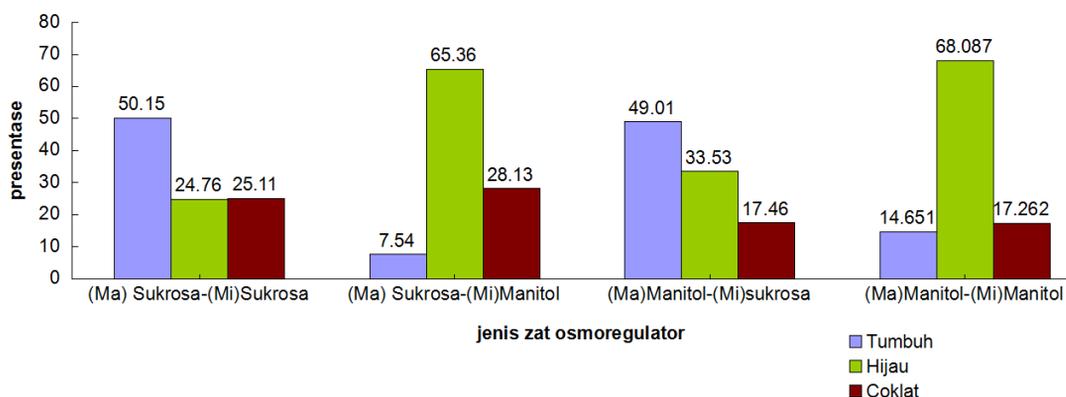
4. Pengaruh penambahan jenis zat osmoregulator pada media enkapsulasi

Hasil pengamatan pada eksplan terlihat jika persentase eksplan tetap hijau terbesar terdapat pada kombinasi media yang menggunakan zat osmoregulator (Ma)Manitol-(Mi)Manitol dan (Ma) Sukrosa-(Mi)Manitol dengan nilai 68.08 dan 65.36. Presentase eksplan hijau terendah pada (Ma)sukrosa-(Mi)Sukrosa dengan nilai 24.76. Pemberian manitol dengan beberapa konsentrasi yang berbeda pada media menyebabkan terjadinya cekaman osmotik yang berbeda pada eksplan. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), cekaman osmotik dapat menyebabkan potensial osmotik medium rendah sehingga sel sedikit mendapatkan air. Akumulasi manitol pada tanaman meningkat ketika kondisi potensi air rendah. Manitol mengatur kondisi ini dalam hal meningkatkan toleransi terhadap stres defisit air terutama melalui penyesuaian osmotik (Loester *et al.*, 1992).

Manitol dapat berfungsi sebagai sumber karbon dan regulator osmotik. Sebagai sumber karbon, manitol dapat mendukung pertumbuhan kultur, namun sebagai regulator osmotik, manitol dapat meningkatkan osmolaritas media atau potensial osmotik media sehingga nutrisi yang mengalir ke

dalam jaringan tanaman berjalan lambat. Lambatnya aliran nutrisi dapat menyebabkan penghambatan terhadap pertumbuhan kultur eksplan (Roostika *et al.*, 2008).

Sukrosa digunakan sebagai sumber energi dalam media kultur, karena umumnya eksplan yang dikulturkan tidak autotrof dan mempunyai laju fotosintesis yang rendah. Menurut Gautheret dalam Gunawan (1992), sukrosa adalah sumber karbohidrat penghasil energi yang terbaik melebihi glukosa, maltosa, rafinosa. Sukrosa merupakan sumber karbohidrat yang paling sering digunakan pada kultur jaringan tanaman karena atom karbon anomernya berada dalam keadaan terikat, jadi melindungi sukrosa dari serangan oksidatif atau hidrolitik oleh enzim-enzim tanaman sampai molekul ini mencapai tujuan akhirnya di dalam tanaman (Lehninger, 1982).

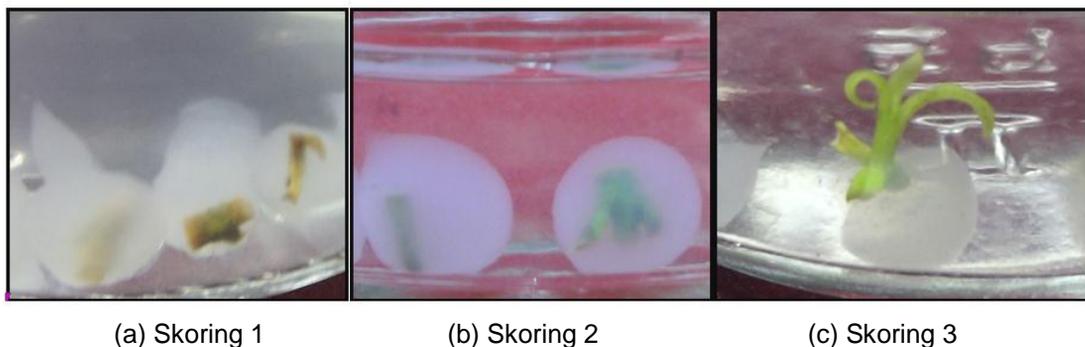


Gambar 17. Rerata kondisi eksplan pada berbagai kombinasi zat osmoregulator

B. Enkapsulasi eksplan buku satu tunas jeruk JC (Japansche Citroen) dengan penambahan manitol

Eksplan yang telah dibentuk kapsul dan dimasukkan ke media cair atau media inkubasi. Perkembangannya diamati dengan mengamati kondisi

eksplan selama masa penyimpanan. Kondisi ini dibagi menjadi tiga kategori yaitu jumlah eksplan yang coklat (nilai 1), hijau (nilai 2) dan tumbuh (nilai 3) (Gambar 18). Penggunaan bagian buku dikarenakan terdapat bakal tunas yang merupakan jaringan meristem.



Gambar 18. Katogeri skoring nilai kondisi eksplan selama masa penyimpanan. (A) eksplan coklat (B) Hijau (C) Tumbuh. Gambar diambil pada kombinasi media M3%(Ma) – M3%(Mi) dengan masa simpan 3 bulan.

Media merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan pelaksanaan kerja kultur jaringan (Yusnita, 2003). Prinsip media yang diberikan kepada sel-sel tanaman *in vitro* adalah memberikan nutrisi sesuai dengan kebutuhan sel-sel tanaman tersebut secara alami sebagai tanaman utuh yang tumbuh di alam. Tumbuhan di alam bebas bersifat autotrof, memerlukan nutrisi sederhana yang terdapat didalam tanah berupa garam-garam mineral dan air untuk meneruskan siklus hidupnya. Hal ini dapat dipahami karena sebagian terbesar tubuh tumbuhan tersusun atas unsur-unsur penyusun zat anorganik tersebut. Eksplan kultur *in vitro* juga memerlukan nutrisi yang komposisinya jauh lebih kompleks karena eksplan sedikit banyak telah kehilangan sifat autotrofnya (Wattimena, 1992). Pentingnya media untuk

eksplan ini menjadi alasan kenapa pada media alginat (Ma), alginat perlu dilarutkan kedalam media MS + VMW.

Natrium alginat digunakan sebagai agen enkapsulasi karena kelarutannya di suhu kamar dan kemampuannya untuk membentuk gel dengan kalsium klorida ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Datta *et al.*, 1999). Perendaman selama minimal 30 menit pada 100mM larutan kalsium klorida diperlukan untuk menghasilkan kapsul dengan bentuk yang bulat dan gelasi (kekerasan) yang lengkap (Ipekci dan Gozukirmizi 2003; Daud *et al.*, 2008; Geetha *et al.*, 2009; Sarmah *et al.*, 2010). Pada percobaan ini diameter rata-rata kapsul yang dihasilkan adalah 5 mm dikarenakan eksplan memiliki ukuran kurang dari ukuran tersebut. Theim (2011), menyatakan bentuk bulat pada proses enkapsulasi terjadi karena pertukaran ion antara Na^+ Pada natrium alginat dengan Ca^{2+} pada larutan kalsium klorida. Eksplan yang sudah membentuk kapsul disimpan pada media inkubasi. Media inkubasi dibuat tanpa penambahan agar sehingga media menjadi cair. Hal ini bertujuan untuk menjaga kelembaban kapsul.

Berdasarkan hasil skoring pada tabel 7 diketahui ada dua perlakuan enkapsulasi yang dapat menyimpan eksplan selama 5 bulan tanpa merubah kondisi eksplan (eksplan tetap hijau). Perlakuan pertama adalah MS+VMW Manitol 3% (Ma) – ½ MS+VMW Manitol 3% (Mi) dan perlakuan kedua adalah MS+VMW Manitol 4% (Ma) – ½ MS+VMW Manitol 4% (Mi). Kedua perlakuan ini memiliki rerata nilai skoring 2.00 yang artinya kondisi 100% eksplan yang ada dalam perlakuan tersebut adalah tetap hijau (Gambar 19) .

Pada kedua komposisi terdapat persamaan yaitu komposisi nutrisi penuh pada media alginat (Ma) dan nutrisi setengah pada media inkubasi (Mi).

Tabel 7. Skoring kualitas kapsul setelah masa penyimpanan selama 5 bulan

Media Alginat (Ma)		Media inkubasi (Mi)			
		manitol 3%		manitol 4%	
		MS + MW	½ (MS + VMW)	MS + MW	½ (MS + VMW)
Manitol 3%	MS +VMW	1.58 ± 0.149	2.00 ± 0.000	1.58 ± 0.149	1.58 ± 0.149
	½ (MS + VMW)	1.50 ± 0.151	1.58 ± 0.149	1.67 ± 0.142	1.42 ± 0.149
Manitol 4%	MS +VMW	1.42 ± 0.149	1.42 ± 0.149	1.58 ± 0.149	2.00 ± 0.000
	½ (MS + VMW)	1.50 ± 0.151	1.50 ± 0.151	1.42 ± 0.149	1.58 ± 0.149

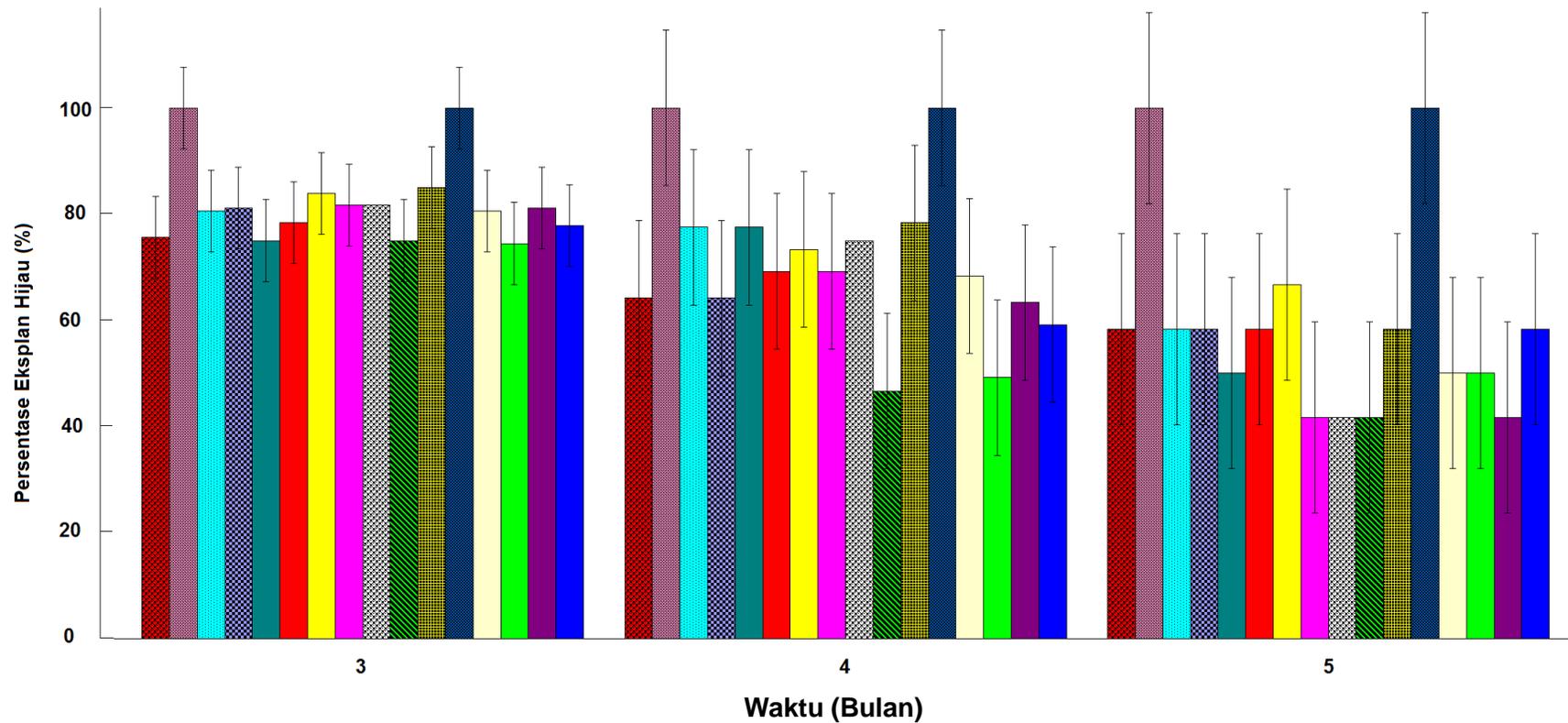
Ket : MS+VMW = Mushirage dan skoog+Vitamin Mushirage dan Wetmore. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$ uji Duncan. (Mean±SE).

Eksplan tidak mengalami pertumbuhan dan tetap hijau mungkin dikarenakan media masih menyediakan hara dan air untuk eksplan tapi tidak cukup untuk pertumbuhan. Aslani, (1996) menyatakan bahwa alginat merupakan hidrogel yang mengandung 85 % air. Air tersebut rentan terhadap distorsi yang terkait dengan imbibisi (penyerapan air) atau dengan sineresis (penguapan air). Carden, (2003) menyatakan apabila hasil cetakan alginat dibiarkan di udara terbuka, air dalam alginat akan menguap dan menyebabkan hasil cetakan mengkerut yang disebut sebagai peristiwa sineresis. Pada percobaan ini kapsul yang dibiarkan (tanpa direndam cairan) mengalami pengkerutan setelah 6 hari. Hasil cetakan alginat yang direndam dalam larutan menyebabkan terjadinya penyerapan air yang disebut imbibisi.

Kemungkinan air pada percobaan berasal dari peristiwa imbibisi dari

media. Air pada fase absorpsi dapat terikat (contoh padat, dimana air terperangkap) maupun tidak terikat atau bebas (air bergerak). Keberadaan fisik air pada polimer hidrogel biasanya dalam bentuk padat, cair, dan uap. Fellows dan Thomas mengatakan bahwa air yang keluar pada alginat berupa air yang bebas dan terikat. Air bebas dalam hidrogel disebut sebagai *plasticizing* (air yang membuat gel menjadi bersifat plastik) dengan menyatu pada partikel polimer dan membuat stabilitas yang lebih tinggi.

Tendensi perkembangan eksplan setelah 5 bulan masa penyimpanan adalah mengalami penurunan jumlah eksplan hijau (Gambar 19). Hal ini dikarenakan semakin lama penyimpanan, eksplan mengalami pencoklatan atau klorosis. Terjadinya klorosis merupakan indikasi dari defisiensi unsur hara. Faktor-faktor yang menyebabkan kemudahan penyerapan unsur hara adalah kelarutan, pH, O₂, dan kapasitas pertukaran ion. Tidak terpenuhinya faktor tersebut menyebabkan hara tidak terserap dengan baik dan tumbuhan mengalami pencoklatan. Alasan lain terjadinya pencoklatan dalam kultur jaringan adalah akumulasi polifenol oksidase yang dilepas atau disintesis jaringan dalam kondisi teroksidasi ketika sel dilukai (Hutami, 2008). Toksisitas fenol kemungkinan disebabkan oleh ikatan reversibel antara hidrogen dan protein. Penghambatan pertumbuhan tidak dapat diperbaiki terjadi ketika fenol teroksidasi menjadi senyawa quinon yang kemudian mengoksidasi protein menjadi senyawa melanat.



■ MS+VMW M3% (Ma) - MS+VMW M3% (Mi) ■ 1/2 MS+VMW M3% (Ma) - MS+VMW M3% (Mi) ■ MS+VMW M4% (Ma) - MS+VMW M3% (Mi) ■ 1/2 MS+VMW M4% (Ma) - MS+VMW M3% (Mi)
 ■ MS+VMW M3% (Ma) - 1/2 MS+VMW M3% (Mi) ■ 1/2 MS+VMW M3% (Ma) - MS+VMW M3% (Mi) ■ MS+VMW M4% (Ma) - 1/2 MS+VMW M3% (Mi) ■ 1/2 MS+VMW M4% (Ma) - MS+VMW M3% (Mi)
 ■ MS+VMW M3% (Ma) - MS+VMW M4% (Mi) ■ 1/2 MS+VMW M3% (Ma) - MS+VMW M4% (Mi) ■ MS+VMW M4% (Ma) - MS+VMW M4% (Mi) ■ 1/2 MS+VMW M4% (Ma) - MS+VMW M4% (Mi)
 ■ MS+VMW M3% (Ma) - 1/2 MS+VMW M4% (Mi) ■ 1/2 MS+VMW M3% (Ma) - 1/2 MS+VMW M4% (Mi) ■ MS+VMW M4% (Ma) - 1/2 MS+VMW M4% (Mi) ■ 1/2 MS+VMW M4% (Ma) - 1/2 MS+VMW M4% (Mi)

Gambar 19. Tendensi perkembangan jumlah eksplan hijau selama 5 bulan masa penyimpanan

C. Regenerasi eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan

Eksplan buku satu tunas yang dienkapsulasi dan telah disimpan selama lima bulan dipindahkan ke media regenerasi optimum hasil percobaan pendahuluan yaitu MS+VMW+Kin 0.3 mgL^{-1} . Pertumbuhan atau regenerasi eksplan diamati selama 12 minggu. Nilai regenerasi tersebut dibandingkan dengan pertumbuhan eksplan kontrol (buku yang tidak dienkapsulasi dan disimpan), sehingga dapat terlihat variasi apabila terjadi perubahan atau penurunan kemampuan regenerasi eksplan dan selama penyimpanan.

Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa eksplan yang dienkapsulasi dan disimpan pada media alginat (Ma) dengan komposisi $\frac{1}{2}$ media dasar MS+VMW dan penambahan Manitol 3% dan Manitol 4% tidak mengalami regenerasi. Hal ini dikarenakan saat subkultur ke-2 eksplan telah mengalami pencoklatan. Tang dan Newton (2004) juga melaporkan bahwa pencoklatan jaringan sangat menurunkan regenerasi secara *in vitro* dari kultur melalui jalur organogenesis pada beberapa tanaman berkayu.

Regenerasi terjadi pada eksplan yang dibungkus media alginat (Ma) dengan komposisi media dasar MS+VMW dan penambahan Manitol 3% dan Manitol 4%. Pengamatan terhadap parameter waktu bertunas dan berakar serta jumlah akar eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan berbeda secara sangat signifikan dengan eksplan kontrol (Tabel 8). eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan membutuhkan waktu bertunas 31.67 - 33.17 hari, eksplan kontrol hanya membutuhkan waktu rerata 6.25 hari. Waktu berakar eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan adalah 45.83 - 51.83, sedangkan eksplan kontrol 35.83 hari.

Tabel 8. Perbandingan regenerasi eksplan buku satu tunas hasil enkapsulasi dan penyimpanan dengan eksplan kontrol setelah 12 MST

PERLAKUAN			RERATA						
(Ma) MS+VMW Dengan penambahan	(Mi)* Media Inkubasi	Jumlah ulangan (N)	Inisiasi tunas (Hari±SE)	Inisiasi akar (Hari±SE)	Jumlah daun (Jumlah±SE)	Jumlah akar (Jumlah±SE)	Jumlah tunas (Jumlah±SE)	Tinggi tunas (Cm±SE)	Panjang akar (Cm±SE)
M 3%	1 M3%	7	32.67 ^a ±0.494	51.33 ^a ± 0.421	8.00 ^{bcd} ±0.365	1.33 ^b ±0.210	2.33 ^c ±0.210	3.73 ^a ± 0.145	4.87 ^a ± 0.176
	½ M3%	12	32.83 ^a ±0.600	51.83 ^a ± 0.167	9.67 ^a ±0.210	2.67 ^a ±0.210	3.50 ^{ab} ±0.341	3.90 ^a ± 0.126	4.88 ^a ± 0.130
	1 M4%	7	32.33 ^a ±0.614	47.33 ^b ± 1.476	8.67 ^{ab} ±0.333	1.67 ^b ±0.210	3.50 ^{ab} ±0.341	3.93 ^a ± 0.049	4.90 ^a ± 0.131
	½ M4%	7	33.17 ^a ±0.477	51.33 ^a ± 0.421	8.33 ^{bc} ±0.210	1.67 ^b ±0.210	3.33 ^b ±0.210	3.97 ^a ± 0.117	4.83 ^a ± 0.105
M 4%	1 M3%	5	33.00 ^a ±0.632	45.83 ^b ± 0.307	7.50 ^{cd} ±0.223	1.50 ^b ±0.223	3.67 ^{ab} ±0.210	3.85 ^a ± 0.143	4.88 ^a ± 0.130
	½ M3%	5	33.00 ^a ±0.632	51.33 ^a ± 0.494	8.00 ^{bcd} ±0.516	1.33 ^b ±0.210	3.50 ^{ab} ±0.341	3.90 ^a ± 0.063	4.68 ^a ± 0.252
	1 M4%	7	32.00 ^a ±0.516	51.33 ^a ± 0.494	7.17 ^d ±0.609	1.33 ^b ±0.210	3.67 ^{ab} ±0.210	3.88 ^a ± 0.079	4.55 ^a ± 0.138
	½ M4%	12	31.67 ^a ±0.494	51.00 ^a ± 0.365	9.67 ^a ±0.333	2.50 ^a ±0.223	3.83 ^{ab} ±0.166	3.97 ^a ± 0.033	4.58 ^a ± 0.153
Kontrol		8	6.25 ^b ±0.861	35.83 ^c ± 1.759	9.48 ^a ±0.296	2.62 ^a ± 0.000	4.12 ^a ± 0.001	4.05 ^a ± 0.166	4.60 ^a ± 0.263

Ket : M = Manitol; Ma = media alginat ; Mi = media inkubasi

* Angka ½ menunjukkan komposisi media dasar MS+VMW adalah *half strenght* dan angka 1 komposisi media dasar penuh MS+VMW

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$ uji Duncan. (Mean±SE).

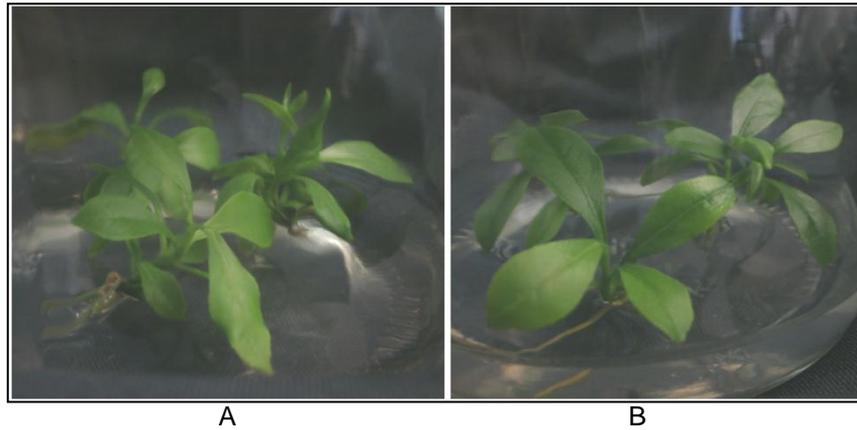
Enkapsulasi dengan kombinasi kapsul ½ M3% dan ½ M4% tidak ditampilkan dikarenakan eksplan tidak beregenerasi.

Jumlah akar eksplan hasil enkapsulasi adalah 1.33 - 2.67 dan eksplan kontrol adalah 2.62. Perbedaan waktu inisiasi eksplan terjadi karena penyesuaian metabolisme. Peristiwa ini dikenal dengan nama efek residu. Eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan mempunyai metabolisme lebih lambat, dibuktikan dengan tidak tumbuhnya eksplan selama masa penyimpanan. Penelitian pada tanaman porwoceng (*Pimpinella pruatjan*) menunjukkan bahwa pemberian osmoregulator yang tinggi, membuat pertumbuhan tanaman menjadi abnormal setelah tahap regenerasi pasca penyimpanan (Roostika *et al.*, 2009). Mariska *et al.*, (1996) menyatakan bahwa respon tiap-tiap jenis tanaman terhadap zat pengatur dan penghambat tumbuh dapat berbeda-beda, bahkan sampai ke tingkat varietas.

Tanaman jeruk JC hasil enkapsulasi dan penyimpanan tidak memiliki akar primer tetapi memiliki akar adventif. Hal ini menyebabkan tanaman tidak dapat digunakan sebagai batang bawah pada teknik okulasi, namun tanaman tersebut tetap dapat dikoleksi secara *in vitro* dengan lebih efektif dan digunakan kembali untuk sumber biji jeruk JC.

Parameter tinggi tunas, panjang akar dan jumlah daun menunjukkan tidak ada perbedaan antara eksplan hasil enkapsulasi penyimpanan dan kontrol (Tabel 8). Tinggi tunas eksplan hasil enkapsulasi penyimpanan adalah 3.97-3.73 dan kontrol adalah 4.05. Tidak adanya perbedaan nilai pada tinggi tunas menunjukkan jika aktifitas respirasi dalam jaringan eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan berjalan normal (Widyasoety *et al.*, 2008). Parameter jumlah daun memiliki nilai perbedaan yang bervariasi antara kontrol dan setiap perlakuan enkapsulasi. Hal ini dimungkinkan karena adanya bias

dalam pengamatan. Bias pengamatan yang dimaksud adalah tidak dihitungnya daun yang mencoklat atau layu dan hanya dihitung bagian yang masih hijau saja.



Gambar 20. Performa regenerasi eksplan. A) hasil enkapsulasi dan penyimpanan B) kontrol

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Kombinasi media alginat MS+VMW Manitol 3% dengan media inkubasi $\frac{1}{2}$ (MS+VMW) Manitol 3% dan media alginat MS+VMW Manitol 4% dengan media inkubasi $\frac{1}{2}$ (MS+VMW) Manitol 4% (Mi) dapat menyimpan eksplan buku satu tunas jeruk Japansche Citroen (JC) selama lima bulan dengan skoring kualitas $2.00^a \pm 0.000$ yang artinya kondisi eksplan semua hijau.
2. Media pertumbuhan yang cocok untuk regenerasi eksplan buku satu tunas jeruk JC adalah MS dan penambahan VMW Kin 0.3 mgL^{-1} .
3. Teknik enkapsulasi dapat diterapkan pada eksplan buku satu tunas jeruk JC karena eksplan dapat mempertahankan kualitasnya selama masa penyimpanan dan dapat beregenerasi dengan baik. Hal ini dibuktikan dengan nilai karakter pertumbuhan yang sama setelah 12 MST, meskipun eksplan hasil enkapsulasi dan penyimpanan memiliki waktu bertunas dan berakar lebih lama dibanding dengan eksplan kontrol.

B. Saran

1. Dilakukan penelitian penyimpanan jangka panjang pada kombinasi media M3% (Ma) – $\frac{1}{2}$ Manitol 3% (Mi) dan Manitol 4% (Ma) – $\frac{1}{2}$ Manitol 4% (Mi) karena kombinasi ini dapat menyimpan eksplan dengan kondisi eksplan yang baik selama lima bulan.
2. Perlu dilakukan pengukuran tekanan osmotik pada setiap larutan enkapsulasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Bahrany, A. M. 2001. Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Sci Hort.* 95 : 285–295
- Al-Khayri, J.M. 1982. Effect of some somatic embryogenesis of growth substances vitamins dan ultraviolet radiation. *Am J Biochem Biotechnol.* 7(1): 32- 42
- Amalia., R, A. Tutik, N. Siti. 2013. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Vitamin terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith secara In Vitro. *J Sains Seni Pomits.* 1(1): 1-6
- Anderson, P.G. 1987. Micropropagation of woody plants. In P.G. Alderson and W.M. Dullforce (eds.) *Micropropagation in Horticulture, Practice and Commercial Problems.* The Univ. Nottingham Trent Print Unit. hlm. 37-52
- Andrini, T.K., Suharsi, M. Surahman. 2013. Studi Poliembrioni dan Penentuan Tingkat Kemasakan Fisiologis Benih Japansche Citroen Berdasarkan Warna Kulit Buah. *J Hort.* 23 (3): 195-202
- Antonietta, G.M., P. Emanuele, S. Alvaro, 1999. Effect of encapsulation on *Citrus reticulata* Blanco somatic embryo conversion. *Plant Cell Tissue Org Cult.* 55: 235
- Aslani, P., A.K. Ross. 1996. Diffusion in alginate gel. Effec of cross linking with calcium or zinc ions in diffusion acetamnophem, controed release 42: 75-82
- Asra, R. 2014. Pengaruh Hormon Giberelin (GA3) Terhadap Daya Kecambah dan Vigoritas *Calopogonium caeruleum*. *Biospecies.* 7 (1) : 29–33
- Bachtiar, A. S., E. Sudarmonowati. 1994. Produksi Biji Buatan : Enkapsulasi Tunas Pucuk *Acacia Mangium*. *Proceeding Seminar Nasional Hasil-hasil Penelitian dan pengembangan Bioteknologi II.* hlm. 25-30
- Bapat, V.A., M. Mhatre, P.S. Rao. 1987. Propagation of *Morus indica* L. (Mulberry) by encapsulated shoots buds. *Plant Cell Rep.* 6: 393-395.
- Borges, M., W. Ceiro, S. Meness, N. Aguilera, J. Vazquez, Z. Infante, M. Fonseca. 2004. Regeneration dan multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained in vitro. *Plant Cell Tissue Org.* 76: 87-90.
- Buchanan, B. W., Gruisem, R. L. Jones. 2006. *Biochemistry dan Molecular Biology of Plants.* USA : *Am Soc of Plan Biol.* hlm. 1367

- Cardens, A. 2003. Diffusion through membranes of polyelectrolyte complex of chitosan and alginate. *Macromol Bioesi.* 3 (10): 535-539
- Carpenter, J. B., P. C Reece. 1970. Catalog of Genera, Spesies, dan Subordinate Taxa In The Orange Subfamily Aurantioideae (Rutaceae). U.S : Agricultural Research Service, U.S Departemen of Agriculture
- Charoensub, R., S. Phansiri. 2004. In vitro conservation of rose coloured lead wort: Effect of mannitol on growth of plantlets. *Kasetsart J Nat Sci.* 38: 97-102
- Chanana, K., R. Gill. 2008. Regeneration of plants from potato meristem . Euphytica. *J Nat Sci.* 30: 141-145
- Cry, R. 2000. Effect of Thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Willd in vitro. Plant Growth Regulation. *Kluwer Acad Publ.* 30: 171-175.
- Daud, N., R.M Taha, N.A Hasbullah. 2008. Artificial seed production from encapsulated micro shoots of *Saintpaulia ionantha* W endl. (African violet). *J Appl Sci.* 8(24): 4662-4667.
- Davies, P. J. 2004. *Plant Hormones*. Dordrecht : Kluwer Academic Publisher.
- Datta, K.B., B. Kanjilal, D. Sarker. 1999. Artificial seed technology: Development of a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr An endangered orchid. *Curr. Sci.* 76: 1142-1145.
- Dewi. 2002. Konservasi in vitro jeruk besar (*Citrus maxima*) cv. Sinyonya menggunakan osmotikum dan retardan. *J agrobiogen.* 6(2): 84-90
- Dewitte, W., J.A. Murray. 2003. The plant cell cycle. *Ann Rev Plant Biol.* 54: 235-264.
- Diab, M. I. 2015. In vitro Propagation of the Endangered Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Ghazal cv. 1-Effect of Folic Acid dan Biotin on Callus Formation dan Differentiation. *Am-Eur J Agric & Environ Sci.* 15(3): 284-290
- Dodds, J., W. Roberts. 1987. *Plant Tissue Culture*. Sidney : Cambridge University Press. hlm. 210
- Dodds, J. H., L. W. Roberts. 1995. *Experiments in Plant Tissue Culture*. London : Cambrigde University Press.

- Euwens, C. J., S. Lord, C. R. Donough, V. Rao, G. Vallejo, Nelson. 2002. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of mantled flowering in clonally propagated oil palm. *Plant Cell Tissue Org Cult.* 70 hlm. 311
- Ganaphati, T. R., P. Suprasanna, V. A. Bapat, P. S. Rao. 1992. Propagation of through encapsulated shoot tips. *Plant Cell Rep.* 11 : 571-575.
- Gardner, F.P., R.B. Perace, R.L. Mitchell. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya.* Jakarta : UI Press.
- Geetha, R., G. V. Gopal, M. H. Niranjana. 2009. In vitro response of encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella*. *J Basic Appl Biol* 3(2): 82-86
- George, E.P., P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories: Exigetic Limited Eversley.*
- George, E. F. 1983. *Plant propagation by tissue culture.* 3rd edition. Netherlands : Dordrecht.
- Gholami, A. A., S. Alavi, V. Majd, A. Fallahian. 2013. Plant regeneration and cold preservation of Eureka lemon (*Citrus limon* [L.] Burm. f. ['Eureka']) by using sodium alginate-encapsulated shoot tips. *Ann of Biol Res.* 4 (5):279-285
- Grasdalen, H., O. M. Smids, M. W. Anthonsen. 1979. High Field Spectroscopy of Partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans) Determination of the Degree of N-Acetylation and the Distribution of N-Acetyl Groups in Partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans) by High-Field Nmr-Spectroscopy. *Carbohydrate Res.* 211(1): 17-23.
- Goksungur, Y., N. Zorlu . 2001. Production of ethanol from beet molasses by ca-alginate immobilized yeast cell in a packed-bed bioreactor. *Turk J Biol.* 25: 265-275.
- Goldsworthy, P. R., N. M. Fisher. 1996. *Fisiologi Tanaman Budidaya Tropik.* Yogyakarta : Gajah Mada University Press .
- Goswami, K., R. Sharma, P. K. Singh, Govind Singh. 2013. Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD marker. <http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC3550687>. Diakses pada 19 november 2016.
- Gunawan, L. W. 1992. *Tehnik Kultur Jaringan Tanaman.* Bogor : Depdikbud Dirjen Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas IPB. hlm. 165

- Gomes, F., M. Simões, M. L. Lopes, M. Canhoto. 2010. Effect of plant growth regulators dan genotype on the micropropagation of adult trees of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). *New Biotechnol.* 1: 15-26
- Gon, Y., J. L. Guardiola, L. Garcia. 1990. Genotype affects the morphogenic response of in vitro epicotyl segments of Citrus rootstocks. *Ann Bot.* 86: 159-166
- Gray, A. 2005. In vitro propagation of *Citrus* Rootstocks. *J Hort Sci.* Hlm 21-30.
- Grou, B. 1990. In vitro conservation of tropical plant germplasm. *Euphytica.* 57: 227-243
- Hariyaree, A., Kshetrimayum., S. Huidrom, D. Maibam. 2011. In vitro propagation of *Citrus megaloxycarpa*. *Environ Exp Biol.* 9: 129–132
- Hakim, R., A. Anis. 2005. Induksi Embrio Somatik Kacang Tanah pada Berbagai Macam Vitamin dan Sukrosa. *J Ilmu Pertanian.* 12 (1): 43-50.
- Hassan, N. A., A. A. El-Halwagi, A. Gaber, M. El-Awady, A. Khalaf. 2007. Slow growth in vitro conservation of garlic cultivars grown in Egypt: Chemical characterization and molecular evaluation. 2(2): 67-75
- Hassan, N.S. 2003. In Vitro Propagation of Jojoba (*Simmondsia chinensis* L.) through Alginate-encapsulated Shoot Apical and Axillary Buds Botany. *Int J Agri Biol.* 5(4): 78-88
- Hendaryono, D. P. S., A. Wijayani. 1984. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta : Kanisius
- Hildebrand, D.F., C.K. McCracken, S.S. Rao. 2005. Fatty acid manipulation. In *Plant Lipids: Biology, Utilisation dan Manipulation*. (D.J. Murphy (Ed) Blackwell Publishing
- Hossain, M.M., Madhu S., Jaime, A. Teixeira, Silva, Promila. 2010. Seed Germination and Tissue Culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. Bangladesh: Department of Botany University of Chittagong.
- Hutami, S. 2008. Multiplikasi Tunas dan Induksi Perakaran pada Ubi Kelapa (*Dioscorea alata* L.) dan Gembili (*Dioscorea esculenta* L.) Secara In Vitro. *J AgroBiogen.* 10(2):53-60
- Husni, A., M. Kosmiatin, I. Mariska, dan A. Purwito. 2008. Penerapan teknologi fusi protoplas dalam perakitan jeruk lokal tipe baru. Laporan Hasil Penelitian Program Riset Insentif Terapan Tahun Anggaran 2007. BB-Biogen. Kementerian Riset dan Teknologi.

- Hoque, M. E. 2010. In vitro tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plan Omics*. 3 (1): 7-11
- Imelda, W., Solichatun, A. D. Setyawan. 1992. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. Pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Biofarmasi*. 2(1): 35-43
- Inukai, M., Y. Makatsu. 1999. Effect of change density on drug permeability through alginate gel membranes. *Chem Pharm Bul*. 48 (8): 59-63
- Ipekci Z, Gozukirmizi N. 2003. Direct somatic embryogenesis dan synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Rep*. 22 : 16-23
- Jajoo, C. S. 2010. Effects of growth regulators on direct flow ering of isolated ginseng buds in vitro . *Plant Cell Tissue Org Cult*. 83: 241-244
- Jayanti, D. A. M, Agus S, Moch. Roviq, dan Moch. Dawam M. 2015. Kompatibilitas Tujuh Varietas Calon Interstock Tanaman Jeruk pada Batang Bawah Japansche Citroen (JC). *J Produksi Tanaman*. 5 (5) : 12-21
- Jain, S.M, S. J. Ochatt. 2010. Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. Springer protocols. Humana press.
- Jameison, T, O., Tallon, C., Porras, I. 2012. An efficient protocol for micropropagation of lemon from mature nodal segments. *Plan Cell Tissue Org Cult*. 100: 263-271
- Kamil, J. 1982. *Teknologi Benih*. Bandung : Angkasa.
- Kitto, S.L., J. Janick. 1985. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J Am Soc Hort Sci*. 110 (2) : 277-282.
- Kumar, A., A. Sood, U. T. Palni, A. K. Gupta, L. M. S. Palni. 2001. Micropropagation of *Rosa damascena* Mil from mature bushes using thidiazuron. *J Hort Sci Biotechnol*. 76 (1): 30-34
- Kusumo, S. 1984. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Edisi 1. Jakarta : Yasaguna
- Lakitan, B. 1995. *Dasar-dasar Fisiologi Pertumbuhan dan Perkembangan. Tumbuhan*. Jakarta : Rajawali Press.
- Lehninger, J. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid II*. Jakarta : Erlangga.

- Leunufna, S. 2004. Improvement of the in vitro maintenance dan cryopreservation of yams (*Dioscorea* spp.). Martin Luther Universitat Halle-Wittenberg. Berlin. 120 p. [Dissertation]
- Lestari, E. G. 2008. Penyimpanan in vitrotanaman obat daun dewa melalui partumbuhan minimal. *J Agrobiogen* . 1 (2): 66-72
- Loester, A. P., A. Droste, Aorbes. 1992. Carbon source and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. *Pesq Agropec Bras.* 40(3): 211- 216
- Malaurie, B., O. Pungu, R. Dumont, dan M.F. Trouslot. 1993. The creation of in vitro germplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.) for genetic resources preservation. *Euphytica*. 68:113-122.
- Mamidala, P., R. S. Nanna. 2009. Efficient in vitro plant regeneration, flowering and fruiting of dwarf tomato cv. Micro-Msk. *Plan Omics*. 2 (3): 98-102
- Mariska, I., Suwarno, S. Djoko, Damardjati. 1996. Pengembangan konservasi in vitro sebagai salah satu bentuk pelestarian plasma nutfah di dalam bank gen. Seminar Penyusunan Konsep Pelestarian Ex Situ Plasma Nutfah Pertanian. Bogor : Balitbio.
- McHuhg, D.J. 2003. *A guide to the seaweed industry*. Rome : food and algiculture organization of the united nations
- Mead, J. W., C. Bulard. 1979. Vitamins and Nitrogen Requirements of *Orchis laxiflora* Lamk, France: Laboratoire de Physiologie Vegetale Universite de Nice 28 Avenue Valrose 06034 Nice Cedex
- Morris, O., P. Ollitrault, V. Allent, F. Luro. 1998. Production of haploid embryogenic calli of clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after in situ parthenogenesis induction by irradiated pollen. *Proc Int Soc Cult.* hlm 913-917
- Morel, G., R.M. Wetmore. 1951. Fern callus tissue culture. *Am J Bot.* 38: 141-143
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 473-397
- Murashige, T., D. P. H. Tucker. 1969. Growth Factor Requirements Of *Citrus* Tissue Culture. In: International Citrus symposium. Riverside Proc. Riverside: University Of California. hlm 1155-1161.

- Mulyanto, W. 2014. Pengaruh Sukrosa dan Fotoperiode terhadap Embriogenesis Somatik Jeruk Keprok Batu 55 (*Citrus reticulata* Blanco.). *J Hort Indonesia*. 4(1):44-53
- Nurwita., Dewi, S. Iswari, Dewi, I. Roostika. 2014. Pemanfaatan Teknik Kultur In Vitro untuk Konservasi Plasma Nutfah Ubi-ubian. *J AgroBiogen*. 10(1): 34-44
- Nurwahyuni, E. 2001. Kajian Macam Media dan Konsentrasi BAP terhadap Multiplikasi Tanaman Manggis (*Garcinia mangostana* L.) secara In Vitro. Fakultas Pertanian UNS. Surakarta. [Skripsi]
- Patel, A.V., Pusch, I., Vorlop, K.D., 2000. A novel encapsulation technique for the production of artificial seed. *Cell Biology and Morphogenesis. Plan Cell Rep*. 19: 868-874.
- Prakash, S., Hanh, S. Lin. 2004. Strategy for cell therapy : Polymers for live cell encapsulation and delivery. *Biomater Artif Organs*. 3 : 56-7
- Pookmanee, T., R. Amphawan, N. Topoonyamont, N. Wichit. 2001. In vitro germplasm preservation of *Amorphophallus oncophyllus* Prain ex Hook. F. p. 145-155. Proc of the 3rd Maejo University Annual Conference. Thailand : Maejo University
- Purnamaningsih, R. 2003. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Bul AgroBio*. 5(2): 51-58.
- Purnamaningsih, R., E. Lestari. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *J. Agrobiogen*. 5(2) : 51-58
- Purwito, A. Husni, D. Dinarti. 2015. Induksi Tetraploid Tunas Pucuk Jeruk Siam Simadu (*Citrus nobilis* Lour) Menggunakan Kolkisin secara In Vitro. *J. Agron*. Indonesia 43 (1) : 66 - 71
- Prihastanti, E., E. D. Hastuti, S. W. Agung. Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan Jeruk Keprok Tawangmangu (*Citrus reticulata* cv. Tawangmangu) Secara In Vitro. Proc Seminar Nasional Sains dan Entrepreneurship II. Hlm 536-539
- Putra, M., M. Prayogi, A. Husni. 2015. Somatic Embryogenesis of Mann Citrus (*Citrus reticulata* cv. Batu 55) from Callus Derived from Colchicine Treatment. *J. Hort*. 6(3): 161-17
- Pusdatin [Pusat data dan sistem informasi pertanian]. 2015. Outlook jeruk, komodias pertanian subsektor hortikultura jeruk. Jakarta: Direktorat Jenderal Hortikultura. ISSN 1907-1507. Hlm 78

- Rahman, A., A. Niari, Andosra. 2007. Pengaruh Macam Eksplan dan Konsentrasi 2,4-DDichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) terhadap Pertumbuhan Anthurium (*Anthuriumm plowmanii* Croat) pada Medium MS.
- Redenbaugh, K., 1985. Synseeds Applications of Synthetic Seeds To Crop Improvement. London : CRC Press Inc. Hlm. 481
- Rao, P. S., T. R. Ganapathi, P. Suprasanna, V. A. Bapat. 1993. Encapsulated Shoot Tips of Banana : a new propagation dan delivery system. *Info Musa*. 2 (2) : 4- 5.
- Raymond, R. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London : Pharmaceutical Press. hlm. 11–12.
- Robinson, 1987. Food biochemistry nutritional. New York
- Roostika, I., S. Novianti, M. Ika. 2005. Mikropropagasi Tanaman Manggis (*Garcinia mangostana* L). *J AgroBiogen*. 1 (1): 20-25.
- Roostika, I., D. Ireng, M. Ika . 2008. Regeneration of Pruatjan (*Pimpinella pruatjan* Molk): Axillary Bud Proliferation dan Encapsulation. *J AgroBiogen*. 2(2): 68-73.
- Roostika, I., R. Purnamaningsih, Darwati. 2009. in vitro preservation of Pruatjan (*Pimpinella pruatjan* Molk.) using dilution dan paclobutrazo. *AgroBiogen*. 15(2): 84 - 90
- Roostika, I., Purnamaningsih, Y. Suprianti, I. Mariska, N. Khumaida, G.A. Wattimena. 2012. Pembentukan benih sintetik tanaman nenas. *J Hort*. 22(4):316-326
- Roostika, I. 2013. Perkembangan Aplikasi Teknik Kriopreservasi untuk Konservasi dan Mendukung Program Pemuliaan Tanaman. *J. AgroBiogen*. 9(1): 39-48
- Salisbury, F. B., C. W. Ross. 1992. *Fisiologi Tumbuhan Jilid III*. Bandung : ITB
- Samanhudi. 2010. Penggunaan Benzil Amino Purine pada Pertumbuhan Kalus Kapas Secara In Vitro. *Bul Teknik Pertanian*. 8(1): 8-10
- Sarmah, D. K., M. Borthakur , P. K. Borua . 2010. Artificial seed production from encapsulated PLBs regenerated from leaf base of *Vdana coerulea* Griff. ex. Lindl endangered orchid. *Curr Sci*. 98(5): 686-690

- Satyavathi, A., I. Yuliasti, Masrizal. 2004. Konservasi Plasma Nutfah Galur Mutan Nilam Secara *In Vitro* pada Konsentrasi Media Dasar yang Berbeda. Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional. Hlm 65-69.
- Setiono, S. F., Supriyanto. 2005. Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan dan pertumbuhan serta kandungan sinensetin dalam kalus pada tanaman kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*). *J Littri*. 4: 99-103.
- Shawky, B., U. I. Aly. 2007. In vitro conservation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) germplasm. *Int J Agri Biol*. 9(3): 404-407
- Senaratna, T. 1992. Artificial seeds. *Biotechnol Adv*. 10 (3): 379-392.
- Seswita, D., Amalia, E. Hadipoentyanti. 1996. Konservasi In Vitro Panili (*Vanilla planifolia*) Melalui Pertumbuhan Minimal. *Bul TRO*. 17 (1): 88-97
- Shu, W., 2001. Artificial Plant Seed Production. Singapore Polytechnic School of Chemical & Life Sciences. www.sp.edu.sg/schools. Diakses : 9 oktober 2016
- Sirchi M. H. T., M. A. Kadir Aziz, Rashid. 2008. Plant regeneration as affected by plant growth regulators (PGRs) in mangosteen. *Afr J Biotechnol* 7: 2693-2701
- Sudarmonowati, E., A. S. Bachtiar. 1994. Produksi biji buatan enkapsulasi tunas pucuk pucuk *Accasia mangium*. *Jerami*. hlm. 25-30.
- Sofia, D., Bangun, M. K. Lince, RP. 2005. Respon Pertumbuhan Eksplan Jeruk Maga (*Citrus nobilis*) Terhadap Pemberian IAA dan BAP Secara in vitro. *Stigma Agric Sci J*. 8(4) : 23-30
- Suryowinoto, M. 1989. Fusi protoplas. Yogyakarta : PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada. Hlm. 301.
- Suryowinoto, M. 2000. Petunjuk laboratorium, pemuliaan tanaman secarain vitro. Yogyakarta : PAU Universitas Gadjah Mada. hlm. 213-234,
- Suryowinoto, M. 1996. Prospek kultur jaringan dalam per-kembangan pertanian modern. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada. hlm. 21
- Swaraz, A. M., S. Khatun, F Akter, S.M. Khaledur. 2014. In vitro growth responses of two citrus species, i.e. Pummelo (*Citrus grandis* L.) and Key lime (*Citrus aurantifolia* Crism.) in various sucrose concentrations. *Int J Biosci*. 5 (12): 518-524

- Tang, G., D. Newton. 2001 Spinach or carrot can supply significant amounts of vitamin A as assessed by feeding with intrinsically deuterium-labeled vegetables. *Am J Clin Nutr.* 82: 821-8.
- Theim, B. 2011. Alginate-encapsulated shoot tips dan nodal segments in micropropagation of medicinal plants. [review.]
- Tyas, K.N., S. Susanto, I.S. Dewi, dan N. Khumaida. 2013. Konservasi in vitro pamelo (*Citrus maxima* [Burm.] Merr.) melalui pertumbuhan lambat. *J. Agron. Indonesia* 41(1):32-39.
- Towill, L.E. dan R.L. Jarret. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) shoot by vitrification. *Plant Cell Rep.* 11:175-178.
- Wang, B. S. P., P. J. Charest dan B. Downie. 1993. Ex Situ Storage of Seeds, Pollen dan In Vitro Cultures of Woody Plant Species. Italy : FAO.
- Warnita, I. Suliansyah. 2006. Pertanaman dan Ketahanan Bibit Makro Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Enkapsulasi pada Beberapa Konsentrasi Alginat. *Jerami.* 1 (3) : 139-146
- Wattimena, G. A. 1988. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman. Bogor : Pusat Antar Universitas IPB. hlm. 145
- Wattimena, G. A. 1992. *Bioteknologi Tanaman.* PAU Bioteknologi. Bogor.
- Webber, H. J., L. B. Dexter. 1989. *The Citrus Industry, Vol. 1 :History, Botani, dan Breeding.* California : University Of California Press
- Widiastoety, D. Syafril. Suli, A. 2008. Pengaruh Air Kelapa terhadap Pertumbuhan Protocorm Like Bodies Anggrek *Dendrobium.* *Bul Tanaman Hias.* 3: 20-26
- Widyastuti, N. 2000. Pelestaria Tanaman Panaga dengan Teknik Kultur In Vitro. *J. Teknologi Lingkungan.* 1(3): 206-211
- Wilkins, M.B. 1989. *Fisiologi Tumbuhan I.* Jakarta : Bina Aksara
- Yulianti, F., A. Purwito, A. Husni, D. Dinarti. 2015. Induksi tetraploid tunas pucuk jeruk siam Simadu (*Citrus nobilis* L.) menggunakan kolkisin secara in vitro. *J. Agron.* 42(2): 144-150
- Yeoman, T.A. 1986. Micropropagation of softwood and hard woods. *Proc Tissue Cult Forest Species.* hlm 140-148

LAMPIRAN 1. PERCOBAAN PENDAHULUAN TAHAP KE- 4

Media Kapsul	Media Cair	Ulangan	Kategori				Total
			Tumbuh	Tumbuh Menembus kapsul	Hijau	Coklat	
$\frac{1}{2}$ VMW S 4%	$\frac{1}{2}$ VMW S 3%	1	0	100	0	0	100
		2	0	60	20	20	100
	$\frac{1}{2}$ VMW S 4%	1	0	0	0	100	100
		2	0	50	33.33	16.67	100
	$\frac{1}{2}$ VMW M 4%	1	0	0	0	100	100
		2	0	0	40	60	100
	$\frac{1}{2}$ VMW M 3%	1	0	0	0	100	100
	VMW S 4%	1	0	0	20	80	100
	VMW S 3%	1	0	20	0	80	100
	VMW M 4%	1	0	0	80	20	100
VMW M 3%	1	0	0	57.14	42.86	100	
$\frac{1}{2}$ VMW S 3%	$\frac{1}{2}$ VMW S 4%	1	0	62.5	37.5	0	100
		1	0	71.43	28.57	0	100
	$\frac{1}{2}$ VMW M 3%	1	0	0	87.50	12.	100
	$\frac{1}{2}$ VMW M 4%	1	0	0	100	0	100
	VMW S 4%	1	16.67	0	83.33	0	100
	VMW S 3%	1	14.29	71.43	0	14.29	100
	VMW M 3%	1	0	0	66.67	33.33	100
	VMW M 4%	1	0	0	83.33	16.67	100
$\frac{1}{2}$ VMW M 4%	$\frac{1}{2}$ VMW S 4%	1	14.29	57.14	14.29	14.29	100
		2	0	57.14	14.29	28.57	100
	$\frac{1}{2}$ VMW M 4%						
	$\frac{1}{2}$ VMW M 3%					kontaminasi	
	VMW S 3%	1	0	0	71.43	28.57	100
	VMW S 4%	1	0	57.14	14.29	28.57	100
	VMW M 4%	1	0	28.57	14.29	57.14	100
	VMW M 3%	1	0	0	85.71	14.29	100
		1	0	0	50	50	100
		2	0	0	100	0	100
$\frac{1}{2}$ VMW M 3%	$\frac{1}{2}$ VMW S 4%	1	42.86	42.86	0	14.29	100
		1	28.57	71.43	0	0	100
	$\frac{1}{2}$ VMW M 4%	1	11.11	0	55.56	33.33	100
	$\frac{1}{2}$ VMW M 3%	1	0	0	85.71	14.29	100
	VMW S 4%	1	14.29	57.14	0	28.57	100
	VMW S 3%	1	0	42.86	57.14	0	100

Media Kapsul	Media Cair	Ulangan	Kategori				Total
			Tumbuh	Tumbuh Menembus kapsul	Hijau	Coklat	
	VMW M 4%	1	0	0	83.33	16.67	100
	VMW M 3%	1	0	0	50	50	100
	½ VMW S 4%	1	12.5	12.5	0	75	100
	½ VMW S 3%	1	28.57	57.14	0	14.29	100
	½ VMW M 4%	1	0	0	66.67	33.33	100
VMW S 4%	½ VMW M 3%	1	0	0	85.71	14.29	100
	VMW S 4%	1	0	50	12.5	37.5	100
	VMW S 3%	1	42.86	42.86	0	14.29	100
	VMW M 4%	2	0	0	66.67	33.33	100
	VMW M 3%	1	0	0	87.5	12.5	100
	½ VMW S 4%	1	33.33	16.67	50	0	100
	½ VMW S 3%	1	40	0	60	0	100
	½ VMW M 3%	1	40	0	60	0	100
VMW S 3%	½ VMW M 4%	1	50	16.67	50	0	100
	VMW S 4%	1	50	0	50	0	100
	VMW S 3%	1	50	0	50	0	100
	VMW M 3%	1	0	0	100	0	100
	VMW M 4%	1	20	0	80	0	100
	½ VMW S 4%	1	16.67	0	66.67	16.67	100
	½ VMW S 3%	1	28.57	28.57	42.86	0	100
	½ VMW M 3%	1	0	0	100	0	100
VMW M 3%	½ VMW M 4%	1	0	20	80	0	100
	VMW S 4%					kontaminasi	
	VMW S 3%	1	28.57	0	71.43	0	100
	VMW M 3%					kontaminasi	
	VMW M 4%					kontaminasi	
	½ VMW S 3%	1	0	83.33	16.67	0	100
	½ VMW S 4%	1	28.57	71.43	0	0	100
	½ VMW M 3%	1	0	0	57.14	42.86	100
VMW M 4%	½ VMW M 4%	1	0	16.67	83.33	0	100
	VMW S 3%	1	0	50	16.67	33.33	100
	VMW S 4%	1	0	66.67	33.33	0	100
	VMW M 3%	1	0	0	66.67	33.33	100
	VMW M 4%	1	0	0	66.67	33.33	100

LAMPIRAN 2. KANDUNGAN MEDIA DASAR

No	Garam Mineral	MS+ VMW	MT
	Makro	mgL ⁻¹	mgL ⁻¹
1	KNO ₃	1900	1900
2	NH ₄ NO ₃	1650	1650
3	MgSO ₄	180.5	180.5
4	KH ₂ PO ₄	170	170
5	CaCl ₂	332.02	332.02
	Mikro		
6	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8	27.8
7	Na ₂ EDTA	37.3	37.3
8	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.025
9	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.025
10	H ₃ BO ₃	6.2	6.2
11	KI	0.83	0.83
12	MnSO ₄ . H ₂ O	16.9	16.9
13	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	0.25
14	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6	8.6
	Vitamin		
15	Glycine	2	20
16	Myo inositol	100	100
17	Nicotinic acid	0.5	5
18	Pyridoxin HCl	0.5	5
19	Thiamine HCl	0.1	1
20	Biotin	0.01	—

LAMPIRAN 3. HASIL ANALISIS STATISTIK DENGAN SPSS 20.0

Tabel 1. Uji Anava satu arah pengaruh media dasar MS + VMW dan ditambahkan asam giberelat (GA) terhadap perkecambahan jeruk JC secara in vitro

ANOVA					
Waktu					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.667	2	2.333	.785	.467
Within Groups	71.333	24	2.972		
Total	76.000	26			

waktu_Tunas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.296	2	11.148	3.185	.059
Within Groups	84.000	24	3.500		
Total	106.296	26			

tinggi_tunas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.987	2	7.494	4.483	.022
Within Groups	40.120	24	1.672		
Total	55.107	26			

Panjang_akar					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.939	2	6.969	2.883	.076
Within Groups	58.027	24	2.418		
Total	71.965	26			

Keterangan $\alpha = 0.05$

H0 = tidak terdapat perbedaan antar perlakuannya.

H1 = terdapat perbedaan antar perlakuannya.

Kriteria :

Terima H0 jika $\alpha < \text{sig}$

Tolak H0 jika $\alpha > \text{sig}$

Tabel 2. Uji DMRT pengaruh media dasar MS + VMW dan ditambahkan asam giberelat (GA) terhadap perkecambahan jeruk JC secara in vitro

waktu_Tunas				
	konsentrasi_giberelin	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	giberelin5	9	15.7778	
	giberelin3	9	16.2222	16.2222
	giberelin1	9		17.8889
	Sig.		.619	.071

Waktu_Akar				
	konsentrasi_giberelin	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	
Duncan ^a	giberelin3	9		4.1111
	giberelin5	9		4.7778
	giberelin1	9		5.1111
	Sig.			.257

tinggi_tunas				
	Konsentrasi_Giberelin	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	Giberelin1	9	4.3111	
	Giberelin5	9	5.0222	5.0222
	Giberelin3	9		6.1222
	Sig.		.255	.084

Panjang_akar				
	Konsentrasi_Giberelin	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	Giberelin1	9	4.2778	
	Giberelin3	9	5.5222	5.5222
	Giberelin5	9		5.9778
	Sig.		.102	.540

Keterangan $\alpha = 0.05$

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$ uji Duncan

Tabel 3. Uji Anava dua arah Kondisi kapsul setelah masa penyimpanan selama 5 bulan

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: eksplan.hijau2					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5.911 ^a	15	.394	1.709	.053
Intercept	66.505	1	66.505	288.417	.000
media.inkubasi	.599	3	.200	.866	.460
media.algniat	1.016	3	.339	1.468	.225
media.inkubasi * media alginat	4.297	9	.477	2.070	.034
Error	40.583	176	.231		
Total	113.000	192			
Corrected Total	46.495	191			

$\alpha = 0.05$

H0 = tidak terdapat perbedaan antar perlakuannya.

H1 = terdapat perbedaan antar perlakuannya.

Kriteria :

Terima H0 jika $\alpha < \text{sig}$

Tolak H0 jika $\alpha > \text{sig}$

Kesimpulan : Terdapat interaksi antara media inkubasi dengan media alginat terhadap kondisi eksplan jeruk JC. $\alpha > \text{sig} = 0.05 > 0.01$, maka tolak H0 yang artinya terdapat perbedaan antar perlakuannya

Tabel 4. Uji DMRT Kondisi kapsul setelah masa penyimpanan selama 5 bulan

Jumlah Hijau			
Duncan			
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0.5Manitol3% (Ma)_0.5Manitol4%(Mi)	12	1.4167	
Manitol4%(Ma)_Manitol3%(Mi)	12	1.4167	
Manitol4%(Ma)_0.5Manitol3%(Mi)	12	1.4167	
0.5Manitol4%(Ma)_Manitol4%(Mi)	12	1.4167	
0.5Manitol4%(Ma)_Manitol3%(Mi)	12	1.5000	
0.5Manitol4%(Ma)_0.5Manitol3%(Mi)	12	1.5000	
Manitol3%(Ma)_Manitol4%(Mi)	12	1.5833	1.5833
Manitol3%(Ma)_0.5Manitol4%(Mi)	12	1.5833	1.5833
0.5Manitol3%(Ma)_0.5Manitol3%(Mi)	12	1.5833	1.5833
Manitol4%(Ma)_Manitol4%(Mi)	12	1.5833	1.5833
0.5Manitol4%(Ma)_0.5Manitol4%(Mi)	12	1.5833	1.5833
Manitol3%(Ma)_Manitol3%(Mi)	12	1.6667	1.6667
0.5Manitol3%(Ma)_Manitol4%(Mi)	12	1.6667	1.6667
0.5Manitol3%(Ma)_Manitol3%(Mi)	12	1.7500	1.7500
Manitol3%(Ma)_0.5Manitol3%(Mi)	12		2.0000
Manitol4%(Ma)_0.5Manitol4%(Mi)	12		2.0000
Sig.		.178	.081

Keterangan $\alpha = 0.05$ **Tabel 5.** Uji Anava dua arah regenerasi potongan buku jeruk JC

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: tinggi_tunas					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	26.128 ^a	5	5.226	40.857	.000
Intercept	395.361	1	395.361	3091.171	.000
HORMON	3.102	2	1.551	12.128	.000
MEDIA.DASAR	3.991	1	3.991	31.206	.000
HORMON * MEDIA.DASAR	18.624	2	9.312	72.807	.000
Error	5.372	42	.128		
Total	421.380	48			
Corrected Total	31.500	47			

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Panjang_akar					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	61.167 ^a	5	12.233	58.720	.000
Intercept	29.925	1	29.925	143.640	.000
HORMON	14.917	2	7.458	35.801	.000
MEDIA.DASAR	29.925	1	29.925	143.640	.000
HORMON * MEDIA.DASAR	14.917	2	7.458	35.801	.000
Error	8.750	42	.208		
Total	100.000	48			
Corrected Total	69.917	47			

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Inisiasi_akar					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14730.000 ^a	5	2946.000	193.030	.000
Intercept	7165.089	1	7165.089	469.475	.000
HORMON	3660.281	2	1830.141	119.916	.000
MEDIA.DASAR	7165.089	1	7165.089	469.475	.000
HORMON * MEDIA.DASAR	3660.281	2	1830.141	119.916	.000
Error	641.000	42	15.262		
Total	22574.000	48			
Corrected Total	15371.000	47			

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Inisiasi_tunas					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	771.917 ^a	5	154.383	6.005	.000
Intercept	6208.272	1	6208.272	241.489	.000
HORMON	8.607	2	4.303	.167	.846
MEDIA.DASAR	742.884	1	742.884	28.897	.000
HORMON * MEDIA.DASAR	10.988	2	5.494	.214	.808
Error	1079.750	42	25.708		
Total	8108.000	48			
Corrected Total	1851.667	47			

Tabel 6. Uji DMRT regenerasi potongan buku jeruk JC

Inisiasi_tunas			
Duncan			
PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
vmw_kin0.3	8	6.2500	
vmw_21p0.3	8	7.8750	
vmw_bap0.3	8	8.2500	
MT_BAP0.3	8		15.0000
MT_Kin0.3	8		15.3750
MT_2lp0.3	8		15.7500
Sig.		.463	.783

Inisiasi_akar				
Duncan				
PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
vmw_bap0.3	8	.0000		
MT_Kin0.3	8	.0000		
MT_2lp0.3	8	.0000		
MT_BAP0.3	8	.0000		
vmw_kin0.3	8		32.2500	
vmw_21p0.3	8			41.2500
Sig.		1.000	1.000	1.000

Panjang_akar				
Duncan				
PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
vmw_bap0.3	8	.0000		
MT_Kin0.3	8	.0000		
MT_2lp0.3	8	.0000		
MT_BAP0.3	8	.0000		
vmw_21p0.3	8		2.1250	
vmw_kin0.3	8			2.6250
Sig.		1.000	1.000	1.000

tinggi_tunas					
Duncan					
PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
MT_Kin0.3	8	1.8875			
MT_2lp0.3	8	2.1875			
vmw_bap0.3	8		2.6625		
vmw_21p0.3	8		2.7875		
MT_BAP0.3	8			3.5250	
vmw_kin0.3	8				4.0500
Sig.		.092	.477	1.000	1.000

Tabel 7. Uji Anova perbandingan regenerasi buku tunas antara kontrol dan hasil enkapsulasi

ANOVA					
jumlah.tunas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.101	8	1.513	4.084	.001
Within Groups	16.667	45	.370		
Total	28.768	53			

Keterangan $\alpha = 0.05$

H0 = tidak terdapat perbedaan antar perlakuannya.

H1 = terdapat perbedaan antar perlakuannya.

Kriteria :

Terima H0 jika $\alpha < \text{sig}$

Tolak H0 jika $\alpha > \text{sig}$

Kesimpulan : Terdapat perbedaan jumlah tunas antara eksplan hasil enkapsulasi dan kontrol. $\alpha > \text{sig} = 0.05 > 0.01$, maka tolak H0 yang artinya terdapat perbedaan antar perlakuannya

ANOVA					
jumlah.akar					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.083	8	2.010	8.224	.000
Within Groups	11.000	45	.244		
Total	27.083	53			

Keterangan $\alpha = 0.05$

ANOVA					
tinggi.tunas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.374	8	.047	.822	.587
Within Groups	2.557	45	.057		
Total	2.930	53			

Keterangan $\alpha = 0.05$

ANOVA					
panjang.akar					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.039	8	.130	.975	.467
Within Groups	5.995	45	.133		
Total	7.034	53			

Keterangan $\alpha = 0.05$

ANOVA					
jumlah.daun					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42.135	8	5.267	6.528	.000
Within Groups	36.307	45	.807		
Total	78.442	53			

Keterangan $\alpha = 0.05$

ANOVA					
inisiasi.tunas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3594.259	8	449.282	182.142	.000
Within Groups	111.000	45	2.467		
Total	3705.259	53			

ANOVA					
inisiasi.akar					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1310.037	8	163.755	38.547	.000
Within Groups	191.167	45	4.248		
Total	1501.204	53			

Keterangan $\alpha = 0.05$

Tabel 8. Uji DMRT perbandingan regenerasi buku tunas antara kontrol dan hasil enkapsulasi

jumlah.tunas				
Duncan				
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ma(m3%)-mi(m3%)	6	2.3333		
ma(m3%)-mi(0.5m4%)	6		3.3333	
ma(m3%)-mi(0.5m3%)	6		3.5000	3.5000
ma(m3%)-mi(m4%)	6		3.5000	3.5000
ma(m4%)-mi(0.5m3%)	6		3.5000	3.5000
ma(m4%)-mi(m3%)	6		3.6667	3.6667
ma(m4%)-mi(m4%)	6		3.6667	3.6667
ma(m4%)-mi(0.5m4%)	6		3.8333	3.8333
kontrol	6			4.1792
Sig.		1.000	.227	.100

jumlah.akar			
Duncan			
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ma(m3%)-mi(m3%)	6	1.3333	
ma(m4%)-mi(0.5m3%)	6	1.3333	
ma(m4%)-mi(m4%)	6	1.3333	
ma(m4%)-mi(m3%)	6	1.5000	
ma(m3%)-mi(m4%)	6	1.6667	
ma(m3%)-mi(0.5m4%)	6	1.6667	
ma(m4%)-mi(0.5m4%)	6		2.5000
kontrol	6		2.6250
ma(m3%)-mi(0.5m3%)	6		2.6667
Sig.		.315	.587

tinggi.tunas		
Duncan		
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05
		1
ma(m3%)-mi(m3%)	6	3.7333
ma(m4%)-mi(m3%)	6	3.8500
ma(m4%)-mi(m4%)	6	3.8833
ma(m4%)-mi(0.5m3%)	6	3.9000
ma(m3%)-mi(0.5m3%)	6	3.9000
ma(m3%)-mi(m4%)	6	3.9333
ma(m3%)-mi(0.5m4%)	6	3.9667
ma(m4%)-mi(0.5m4%)	6	3.9667
kontrol	6	4.0500
Sig.		.055

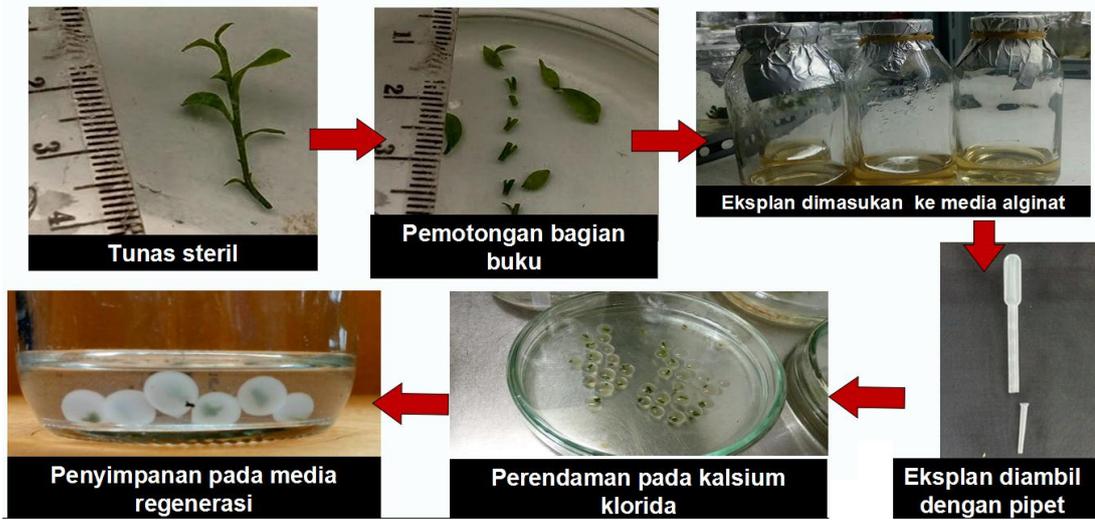
panjang.akar		
Duncan		
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05
		1
ma(m4%)-mi(m4%)	6	4.5500
ma(m4%)-mi(0.5m4%)	6	4.5833
kontrol	6	4.6000
ma(m4%)-mi(0.5m3%)	6	4.6833
ma(m3%)-mi(0.5m4%)	6	4.8333
ma(m3%)-mi(m3%)	6	4.8667
ma(m3%)-mi(0.5m3%)	6	4.8833
ma(m4%)-mi(m3%)	6	4.8833
ma(m3%)-mi(m4%)	6	4.9000
Sig.		.166

jumlah.daun					
Duncan					
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
ma(m4%)-mi(m4%)	6	7.1667			
ma(m4%)-mi(m3%)	6	7.5000	7.5000		
ma(m3%)-mi(m3%)	6	8.0000	8.0000	8.0000	
ma(m4%)-mi(0.5m3%)	6	8.0000	8.0000	8.0000	
ma(m3%)-mi(0.5m4%)	6		8.3333	8.3333	
ma(m3%)-mi(m4%)	6			8.6667	8.6667
kontrol	6				9.4833
ma(m3%)-mi(0.5m3%)	6				9.6667
ma(m4%)-mi(0.5m4%)	6				9.6667
Sig.		.150	.150	.249	.084

inisiasi.tunas			
Duncan			
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol	6	6.6667	
ma(m4%)-mi(0.5m4%)	6		31.6667
ma(m4%)-mi(m4%)	6		32.0000
ma(m3%)-mi(m4%)	6		32.3333
ma(m3%)-mi(m3%)	6		32.6667
ma(m3%)-mi(0.5m3%)	6		32.8333
ma(m4%)-mi(m3%)	6		33.0000
ma(m4%)-mi(0.5m3%)	6		33.0000
ma(m3%)-mi(0.5m4%)	6		33.1667
Sig.		1.000	.164

inisiasi.akar				
Duncan				
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol	6	35.8333		
ma(m4%)-mi(m3%)	6		45.8333	
ma(m3%)-mi(m4%)	6		47.3333	
ma(m4%)-mi(0.5m4%)	6			51.0000
ma(m3%)-mi(m3%)	6			51.3333
ma(m3%)-mi(0.5m4%)	6			51.3333
ma(m4%)-mi(0.5m3%)	6			51.3333
ma(m4%)-mi(m4%)	6			51.3333
ma(m3%)-mi(0.5m3%)	6			51.8333
Sig.		1.000	.214	.547

Lampiran 4. Proses Pembuatan Kapsul dengan Metode Tetes



SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta :

Nama : Rani Wulan Suci

No. Reg : 3425122239

Program studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul "Penyimpanan Tanaman Jeruk (Japansche Citroen) secara *In Vitro* dengan Teknik Enkapsulasi" adalah :

1. Ditulis dan diselesaikan oleh saya sendiri berdasarkan data yang diperoleh dari hasil penelitian bulan September 2015 sampai Juli 2016
2. Bukan merupakan duplikasi skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya. Saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan ini tidak benar

Jakarta, 12 Januari 2017

Pembuat pernyataan,



Rani Wulan Suci
NRM. 3425122239

RIWAYAT HIDUP PENULIS



RANI WULAN SUCI. Dilahirkan di Jakarta, 25 Desember 1994. Anak sematawayang pasangan suami istri Bapak Rahmat dan Ibu Sutini. Alamat tempat tinggal di Jalan Kota Bambu Utara III, RT 007/04 No. 25, Jakarta-Barat. Pendidikan formal yang pernah ditempuh yaitu SDN 01 Pagi Jakarta-Barat, SMPN 130 Jakarta-Barat, SMAN 35 Jakarta-Pusat dan perguruan tinggi Universitas Negeri Jakarta (UNJ) prodi Biologi Reguler angkatan 2012.

Organisasi yang diikuti selama masa kuliah ada 3 yaitu KPM (Kelompok Peneliti Muda) UNJ, CMC (Community of marine conservation) *Acropora* dan Punggawa MUA. Kegiatan yang dilakukan penulis di prodi biologi selain aktifitas kuliah adalah CABI (Cakrawala Biologi) tahun 2012, SIMBOL (Studi Ilmiah Biologi) tahun 2013, LDMPL (Latihan Dasar Manajemen Penelitian Lapangan) dan KKL (Kuliah Kerja Lapangan) tahun 2014 serta PKL (Praktik Kerja Lapangan) di Laboratorium *in vitro* Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB BIOGEN) tahun 2015.

Penulis pernah mendapat hibah Program Kreativitas Mahasiswa bidang penelitian (PKM-P) dari DIKTI di tahun 2014 dengan judul "Potensi Antosianin pada Daun Adam Eva (*Rhoeo discolor*) sebagai Bahan Pewarna Alami Minuman". Penulis pernah menjadi pemateri dalam acara COAST (Coral Studi) dengan tema pemutihan karang, konservasi laut dan simbiosis

lili laut. Penulis pernah menjadi mentor dalam penelitian Hibah P3KPM dengan judul “Uji kualitas air minum isi ulang dengan metode MPN”. Penulis juga menjadi asisten praktikum untuk mata kuliah Pengantar Kimia Organik dan Biomolekul.

Seminar yang pernah diikuti penulis diantaranya Seminar Nasional mengenai Pemanfaatan Nuklir dan Pentingnya Go Pangan Lokal, Save shark, Coral monitoring dan counting with CPCe App.