

Keragaan Dua Galur Jeruk Hasil Induksi Mutasi Terseleksi Huanglongbing di Lapang dan In Vitro

Behaviour of Two Citrus Germplasm Induced Mutation Selected for Huanglongbing in the Field and In Vitro

Raphael Octobrich Didimus^{1*}, Agus Purwito¹, Aulia Floribunda Harp¹, Ali Husni², Kristianto Nugroho³, Mia Kosmiatin³

¹Departemen Agronomi dan Hortikultura, FAPERTA IPB University

²Pusat Riset Peternakan, Badan Riset Inovasi Indonesia

³Pusat Riset Hortikultura dan Perkebunan, Badan Riset Inovasi Indonesia

*korespondensi: rap118raphael@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Jeruk merupakan salah satu komoditas hortikultura paling banyak beredar di pasar. Perkembangan pasar yang baik nyatanya masih terganggu dengan serangan penyakit Huanglongbing (HLB). Kurangnya ketersediaan varietas tahan HLB menjadi kendala dalam pengembangan jeruk. Peningkatan produksi jeruk dilakukan dengan pengembangan varietas baru tahan HLB. Pengembangan ini telah dilakukan pada tahun 2018 melalui teknik mutagenesis in-vitro yang menghasilkan beberapa galur. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati keragaan galur mutan terseleksi HLB di lapang dan diuji kesamaan populasi F1 dengan tetuanya. Penelitian dilakukan dengan cara mengamati keragaan galur mutan dengan mengamati karakter morfologi dan sitologi daun. Pengamatan morfologi daun dilakukan terhadap ukuran, dan bentuk daun. Pengamatan sitologi dilakukan terhadap bentuk, ukuran dan densitas stomata. Hasil pengamatan menunjukkan adanya kesamaan pada morfologi daun tanaman tetua dengan morfologi daun embrio zigotik maupun nucelar, pada sitologi daun terdapat perbandingan yang seragam antara ukuran stomata daun tetua dengan stomata pada embrio zigotik maupun nucelar. Kesamaan keragaan morfologi dan sitologi daun diharapkan galur keturunan jeruk yang diamati masih mempertahankan sifat tahan HLB dari tanaman Tetua. Pengujian ketahanan dilakukan secara in vitro jika populasi F1 sudah dapat digandakan.

Kata Kunci : jeruk, huanglongbing, morfologi, sitologi, stomata

ABSTRACT

Citrus is one of the most widely distributed horticultural commodities in the market. Good market development is in fact still disrupted by Huanglongbing disease (HLB) attacks. The lack of availability of HLB-resistant varieties is an obstacle in the development of citrus. Increasing citrus production is done by developing new HLB-resistant varieties. This development has been carried out in 2018 through in-vitro mutagenesis techniques that produced several strains. This study aims to observe the behavior of HLB-selected mutant strains in the field and tested the similarity of the F1 population with its parents. The research was conducted by observing the performance of the mutant strains by observing the morphological and cytological characters of the leaves. Leaf morphology observations were made on leaf size and shape. Cytological observations were made on the shape, size and density of stomata. The results showed a similarity in the morphology of the leaves of the elder plants with the morphology of the leaves of zygotic and nucelar embryos, in leaf cytology there was a uniform comparison between the size of the stomata of the elder leaves with stomata in zygotic and nucelar embryos. The similarity of morphological and leaf cytological behavior is expected that the observed citrus progeny strains still retain the HLB resistance properties of the parental plants. Resistance testing is carried out in vitro if the F1 population can be duplicated.

keyword: citrus, huanglongbing, morphology, cytology, stomata

PENDAHULUAN

Di Indonesia jeruk adalah salah satu tanaman hortikultura dengan peminat paling banyak, karena rasanya yang enak tidak hanya itu jeruk juga memiliki kandungan serat yang tinggi. Beberapa jenis jeruk yang marak dibudidayakan di Indonesia seperti jeruk siam, jeruk keprok, dan jeruk besar. Produksi jeruk di Indonesia pada tahun 2019 mencapai 2.563.000 ton. Jumlah ini meningkat 2, 11% dari tahun sebelumnya yaitu 2.510.000 ton (Badan Pusat Statistik, 2020). Penurunan produksi yang terjadi pada tanaman jeruk terjadi karena beberapa faktor salah satunya serangan penyakit.

Huanglongbing (HLB) atau *Citrus vein phloem degeneration (CVPD)* merupakan penyakit primer pada jeruk, sejak tahun 1960-an. Gejala penyakit huanglongbing pada jeruk yang belum produktif umumnya bersifat non sistemik dan parsial, namun ada beberapa kasus yang menunjukkan gejala bersifat sistemik (Adiartayasa, 2017). Tanaman jeruk yang terserang CVPD memperlihatkan gejala daun menguning atau klorosis, warna tulang daunnya menjadi hijau tua, daunnya lebih tebal, kaku, dan ukurannya menjadi lebih kecil (Adiartayasa dan Susrama, 2008). Huanglongbing menyebabkan kerugian yang besar. Pada periode tahun 2008-2012 terjadi penurunan produksi jeruk nasional. Pada tahun 2008 dari 2.467.632 menjadi 1.611.768 ton pada tahun 2012 (Nurhadi, 2015).

Perkembangan teknologi dan keilmuan pada saat ini mendorong munculnya metode perbanyakan tanaman melalui kultur in vitro atau kultur jaringan. Metode *In vitro* (kultur jaringan) merupakan metode perbanyakan yang dapat menghasilkan bibit dalam jumlah banyak, cepat, dan seragam (Juanda dan Bambang, 2020). Menurut Santoso dan Fatimah (2003) kultur jaringan akan berhasil dengan baik apabila syarat-syarat yang dibutuhkan dapat terpenuhi. Syarat-syarat tersebut meliputi, pemilihan eksplan/bahan tanam, penggunaan media yang cocok dan keadaan aseptik.

Pengembangan varietas tahan HLB sudah diinisiasi sejak tahun 2018 dan pada tahun 2020 oleh Kosmiatin *et. al.*, berhasil mengembangkan pendekatan melalui bioteknologi dengan mengisolasi bakteri patogen HLB secara in vitro sehingga menimbulkan gejala yang khas. Pemberian iradiasi pada dosis tertentu mampu menghasilkan galur yang tahan terhadap huanglongbing. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah 2 galur jeruk tahan HLB masih membawa sifat tahan terhadap Huanglongbing pada turunan F1 melalui keragaan morfologi dan dan sitologi daun in vitro maupun in vivo.

METODE PENELITIAN

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Agronomi dan Holtikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Penelitian dilakukan dari bulan Juli 2023 hingga September 2023.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman jeruk dengan 2 galur tetua yang tahan HLB, bahan diperoleh dari galur jeruk hasil pemuliaan koleksi rumah kaca cikeumeuh sebagai pembanding, tanaman jeruk in vitro turunan galur tahan HLB, Media Murashige dan Skoog (MS)+ Vit. MW, alkohol 96% dan 70 %.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *laminar air flow cabinet* (L AFC), autoklaf, gelas ukur, erlenmeyer, *beaker glass*, *hot plate*, mikropipet, cawan petri, timbangan analitik, botol kultur, spatula, pH meter digital, pinset, kamera, mikroskop, kaca preparat, lakban, cat kuku, meteran, plastik, scalpel, bunsen, hand sprayer, rak kultur dan lemari es.

Pelaksanaan Percobaan

Persiapan Alat

Alat yang akan digunakan seluruhnya dalam kondisi steril. Seluruh alat dicuci menggunakan detergen. Alat pembuatan media setelah dicuci hanya diangin-anginkan hingga kering. Alat tanam yang akan digunakan seperti cawan petri, pinset, spatula, dan botol kultur disterilkan menggunakan

autoklaf. Kemudian cawan petri, pinset, dan spatula dibungkus menggunakan kertas setelah dicuci dan dikeringkan. Sterilisasi alat akan dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 17,5 psi selama 60 menit.

Pembuatan Media

Media yang digunakan merupakan media dasar Murashige dan Skoog (MS) ditambah formulasi vitamin Morel and Wetmore (VMW) dengan dosis 1 ml/l. Larutan stok dimasukan ke dalam erlenmeyer dan ditambah gula 30 g/l, larutan di campur menggunakan magnetik stirrer sampai larutan menjadi homogen. Selanjutnya dilakukan pengukuran pH, pH media harus 5,8. Setelah mencapai pH 5,8 larutan media ditambahkan agar kemudia dimasak pada *hot plate*, setelah mendidih media dipindahkan ke botol kultur, masing masing botol diisi 12,5 ml cairan media. Botol kultur ditutup menggunakan aluminium foil dan disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 17,5 Psi. Media kultur kemudian disimpan di dalam ruang penyimpanan media.

Isolasi Embrio Jeruk

Buah jeruk muda yang telah dipanen digunakan sebagai bahan isolasi, buah jeruk disterilisasi dengan cara dicelupkan ke alkohol 96% lalu dibakar pada api bunsen, proses ini diulang sebanyak 4-5 kali. Buah kemudian dikupas dan dipotong untuk diambil bijinya, biji yang telah dipisahkan dari daging buah kemudian diberi perlakuan luka kecil lalu ditanam pada media tanam.

Subkultur

Subkultur buah jeruk dilakukan setelah tunas pertama muncul dan memiliki tinggi 2 cm, tunas pertama ditandai menjadi embrio Zigotik, media subkultur menggunakan media MT (MS+VitX10).

Inkubasi Kultur

Inkubasi botol kultur yang telah ditanam akan dilakukan di ruang kultur. Suhu ruang kultur diatur sekitar 22 ± 2 °C. Kultur diletakkan pada rak yang diberi pencahayaan dari lampu LED dengan intensitas cahaya 1300 lux dan penyinaran sepanjang hari. Alkohol 70% disemprotkan seminggu sekali pada sekitar botol kultur yang ditanami untuk mencegah kontaminasi.

Pengamatan

Pengamatan Lapang

Pengamatan di lapangan berupa pengambilan sampel daun jeruk pada tanaman yang sudah tahan HLB. Daun jeruk yang dijadikan bahan pengamatan harus dipetik sebelum matahari terbit agar stomata pada daun tetap tertutup dan pengukuran panjang stomata dapat maksimal. Daun jeruk yang diambil dipetik menggunakan gunting dan dipotong pada ujung tangkai. Jeruk yang telah dipetik kemudian dimasukkan ke dalam plastik zip dan di bawah ke Laboratorium untuk dilanjutkan pengamatan menggunakan mikroskop.

Stomata diamati menggunakan perbesaran 40X dan 100X, menggunakan kamera Handphone. Pengukuran panjang Stomata, lebar stomata dan luas stomata menggunakan aplikasi imageJ, aplikasi yang sama juga digunakan untuk mengukur panjang daun, lebar daun, dan luas daun. Pengukuran densitas stomata menggunakan perbesaran 40X pada mikroskop kemudian dihitung menggunakan rumus

$$\text{Kerapatan Stomata} = \frac{\text{Jumlah Stomata}}{\text{Luas Bidang Pandang (mm}^2\text{)}}$$

$$\text{Luas bidang pandang untuk pembesaran 40X} = \frac{1}{2} \pi d^2 = \frac{1}{4} \times 3,14 \times (0,15)^2 = 0,19625 \text{mm}^2$$

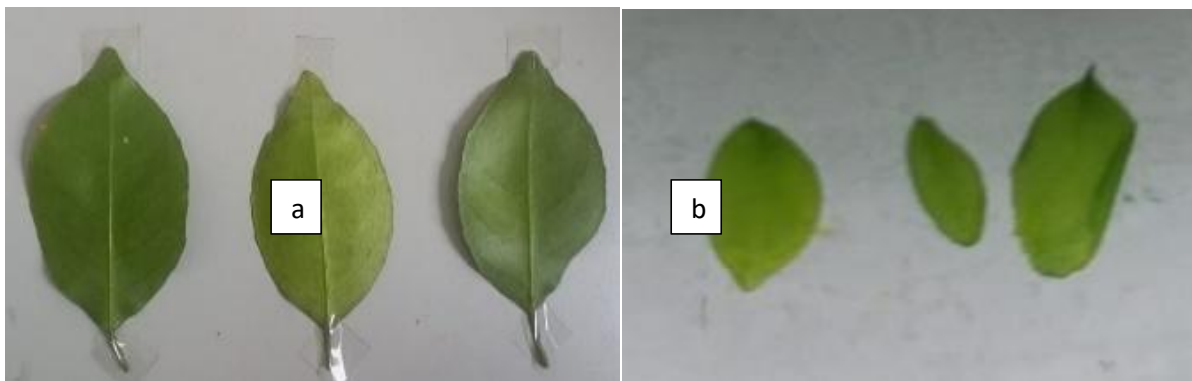
Pengamatan warna daun dibantu dengan RHS *colour chart* dan pengamatan karakter morfologi daun diamati dengan membandingkan data pada IPGRI (1999).

Pengamatan In Vitro

Pengamatan dilakukan setelah embrio zigotik dan embrio nucelar sudah memiliki lebar daun yang cukup untuk diamati stomatanya pada mikroskop. Daun yang sudah cukup lebar kemudian diamati pada mikroskop cahaya dengan pembesaran 40X dan 100X, pengamatan pada lingkungan in vitro dilakukan dengan teknik yang sama dengan pengamatan pada lingkungan lapang.

HASIL DAN PEMBAHASAN*Analisis Keragaman Morfologi Daun Jeruk*

Morfologi jeruk yang diamati yaitu pada bagian daun pada dua galur tahan HLB yang diamati yaitu TR 17 MV dan FS A6 MV. Bentuk daun jeruk galur TR 17 MV di lapang dan in Vitro ditampilkan pada Gambar 1 dan bentuk daun jeruk galur FS A6 MV ditampilkan pada Gambar 2. Perbedaan lingkungan ternyata memberikan pengaruh terhadap perbedaan keragaman morfologi daun jeruk pada lapang dan daun jeruk yang di tanam secara in vitro.



Gambar 1. Bentuk daun jeruk galur TR 17 MV a. Daun jeruk galur TR 17 MV lapang b. Daun jeruk galur TR 17 MV in vitro



Gambar 2. Bentuk daun jeruk galur FS A6 MV a. Daun jeruk galur FS A6 MV lapang b. Daun jeruk galur FS A6 MV in vitro

Perbedaan menonjol terlihat dari warna yang ditampilkan daun jeruk kedua galur, melalui perbandingan dengan RHS *colour chart* ditemukan bahwa warna yang ditampilkan sisi atas daun jeruk galur TR 17 MV yang di tanam di lapang berkode N 137 A dan bagian bawah daun berkode 144 A. Daun jeruk galur TR 17 MV yang ditanam secara in vitro menunjukkan bagian atas daun konsisten berkode 143 A baik pada daun embrio zigotik maupun daun embrio nucelar dan bagian bawah daun juga konsisten berkode 143 B baik pada daun dari embrio zigotik maupun embrio nucelar (Tabel 1)

Tabel 2 menunjukkan daun jeruk dari galur FS A6 MV juga menunjukkan perubahan yang nyata dari penampakan warna daun, warna daun galur jeruk FS A6 MV yang ditanam di lapang bagian atas daun berkode 137 A dan bagian bawah berkode 144 A, lalu untuk daun jeruk yang ditanam secara in vitro bagian atas daun konsisten menunjukkan kode warna 143 A dan bagian bawah daun menunjukkan kode 143 B kecuali untuk daun dari embrio nucelar dari biji ke dua menunjukkan kode warna 143 C.

Tabel 1. dan Tabel 2. menunjukkan bahwa karakter morfologi daun berupa bentuk daun, ujung daun, dan tepi daun justru tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara karakter morfologi tanaman yang berada di lapang dan tanaman yang berada di lingkungan in vitro. Karakter morfologi daun jeruk galur TR 17 MV menunjukkan bentuk daun Elliptic, ujung daun acute dan tepi daun yang termasuk ke dalam kelompok dentate, kesamaan juga muncul baik pada embrio zigotik dan embrio nucelar. Karakter morfologi daun jeruk galur FS A6 MV menunjukkan kesamaan antara bentuk daun lapang dan bentuk daun embrio zigotik yang termasuk ke dalam kelompok overate tetapi daun yang berasal dari embrio nucelar termasuk ke dalam kelompok elliptic. Karakter morfologi lainnya seperti ujung daun dan tepi daun menunjukkan kesamaan antara karakter daun di lapang dan karakter daun di lingkungan in vitro.

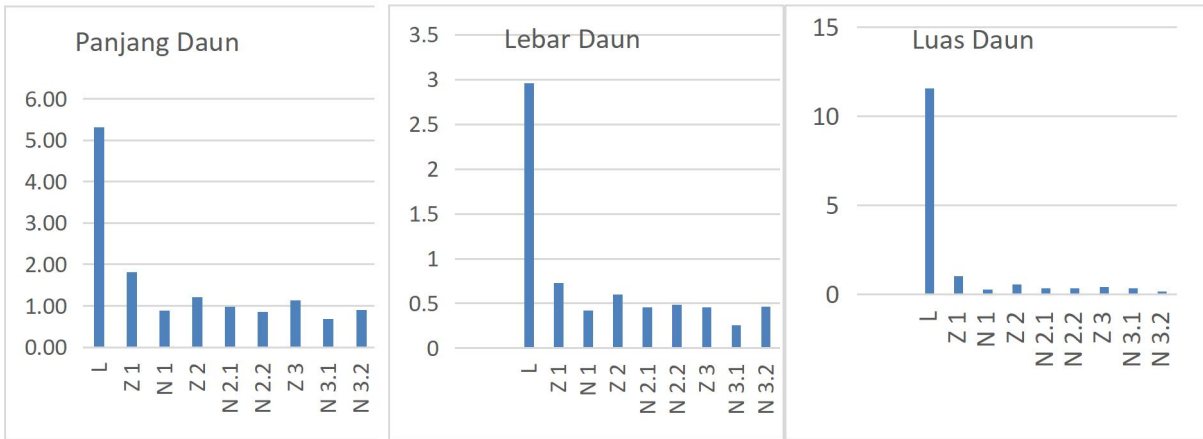
Tabel 1. Karakter kualitatif daun galur TR 17 MV berdasarkan IPGRI (1999) dan *RHS Color chart*.

Karakter Morfologi	TR 17 MV								
	Lapang	In Vitro							
		Z 1	N 1	Z 2	N 2.1	N 2.2	Z 3	N 3.1	N 3.2
Warna Daun Atas	N137 A	143 A	143 A	143 A	143 A	143 A	143 A	143 A	143 A
Warna Daun Bawah	144 A	143 B	143 B	143 B	143 B	143 B	143 B	143 B	143 B
Bentuk Daun	Elliptic	Elliptic	Elliptic	Elliptic	Elliptic	Elliptic	Elliptic	Elliptic	Elliptic
Ujung Daun	Acute	Acute	Acute	Acute	Acute	Acute	Acute	Acute	Acute
Tepi Daun	Dentate	Dentate	Dentate	Dentate	Dentate	Dentate	Dentate	Dentate	Dentate

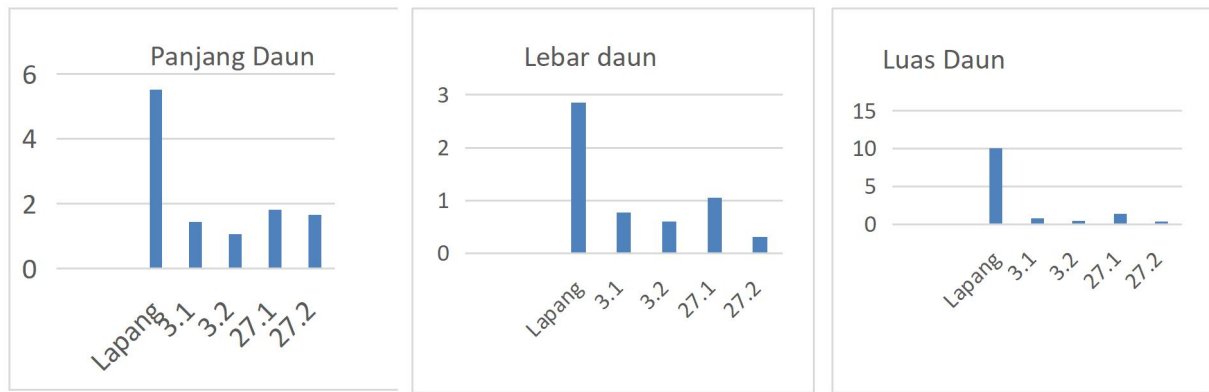
Tabel 2. Karakter kualitatif daun galur FS A6 MV berdasarkan IPGRI (1999) dan *RHS colour chart*.

Karakter Morfologi	FS A6 MV				
	Lapang	In Vitro			
		3.1	3.2	27.1	27.2
Warna Daun Atas	137 A	143 A	143 A	143 A	143 A
Warna Daun Bawah	144 A	143 B	143 B	143 B	143 C
Bentuk Daun	Overate	Overate	Elliptic	Overate	Elliptic
Ujung Daun	Attenuate	Attenuate	Attenuate	Attenuate	Attenuate
Tepi Daun	Sinuate	Sinuate	Sinuate	Sinuate	Sinuate

Gambar 3 dan 4. memperlihatkan besaran panjang, lebar, dan lebar daun pada lingkungan terbuka menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan ukuran daun jeruk pada lingkungan in vitro. Pada data juga terlihat bahwa ukuran daun yang berasal dari embrio zigotik memiliki ukuran yang selalu lebih besar dibandingkan daun yang berasal dari embrio nucelar. Hasil yang sama terlihat juga pada daun yang berasal dari galur FS A6 MV, dimana ukuran daun di lingkungan terbuka lebih besar dibanding lingkungan in vitro dan ukuran daun yang berasal dari embrio zigotik selalu lebih besar dibandingkan dengan daun yang berasal dari embrio nucelar.



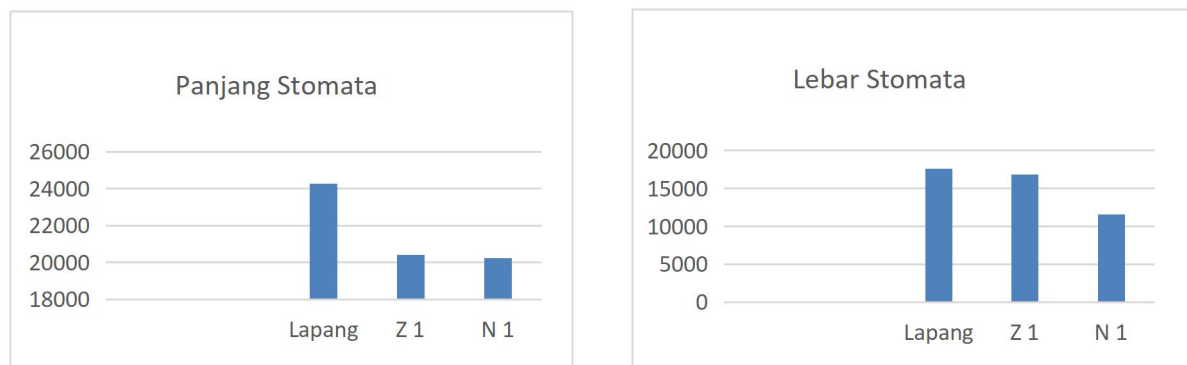
Gambar 3. Perbandingan panjang, lebar dan luas daun jeruk galur TR 74 MV.



Gambar 4. Perbandingan panjang, lebar, luas daun jeruk galur FS A6 MV

Analisis Sitologi Daun Jeruk

Pengaruh lingkungan tempat hidup tanaman memberikan dampak yang cukup signifikan terhadap ukuran stomata tanaman, dapat dilihat pada tabel stomata daun jeruk yang hidup di lapang memiliki ukuran yang lebih besar dibanding dengan stomata pada daun yang tumbuh pada lingkungan *in vitro*. Pahlevi (2015) menyatakan bahwa daun yang tumbuh pada area terbuka memiliki jumlah stomata yang lebih banyak dibandingkan dengan daun yang tumbuh pada area yang ternaungi, Budiono *et. al.* (2016) dalam penelitiannya juga menemukan bahwa intensitas cahaya mempengaruhi ukuran dari stomata.



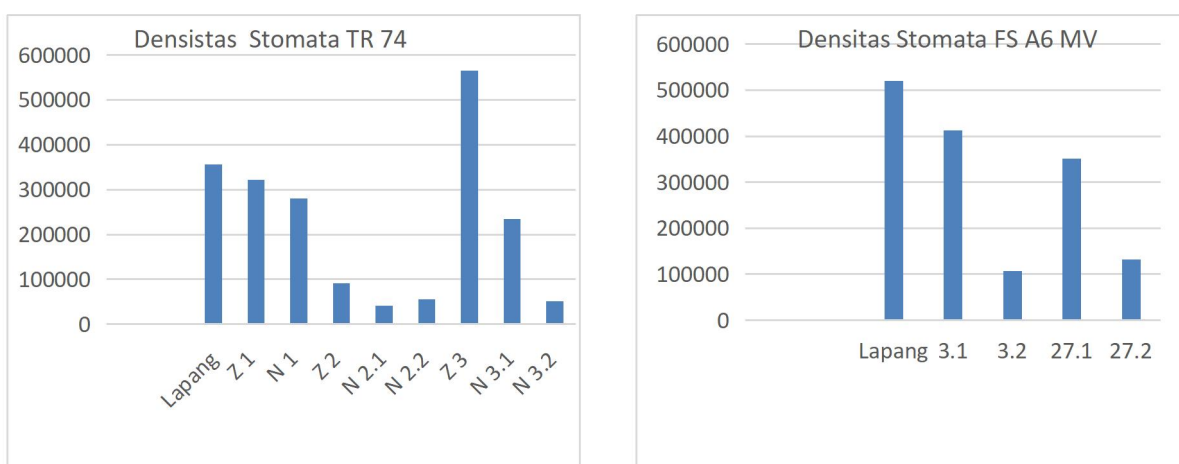
Gambar 5. Perbandingan panjang dan lebar stomata daun jeruk galur TR 74 MV

Gambar 5. menunjukkan perbandingan terlihat lebih jelas pada ukuran panjang stomata, dimana panjang stomata daun jeruk galur TR 74 MV di lingkungan terbuka 2 kali lebih besar dibanding dengan stomata pada daun jeruk yang hidup di lingkungan in vitro. Namun pada stomata daun jeruk galur FS A6 MV perbedaan ukuran panjang tidak signifikan (Gambar 6). Ukuran lebar stomata pada kedua galur tidak menunjukkan hasil yang signifikan, namun tetap terlihat bahwa ukuran daun pada tanaman yang hidup di lingkungan terbuka selalu lebih besar dibanding dengan ukuran lebar stomata pada daun yang hidup di lingkungan yang in vitro.



Gambar 6. Perbandingan panjang dan lebar stomata daun jeruk galur FS A6 MV

Densitas stomata pada daun jeruk dari kedua galur menunjukkan densitas stomata pada stomata daun jeruk yang hidup di lingkungan terbuka lebih tinggi dibandingkan dengan dengan stomata pada daun yang hidup di lingkungan in vitro (Gambar 7.). Hasil yang berbeda terdapat pada daun dari embrio zigotik dari biji ke 3 pada jeruk galur TR 74 MV. Besaran densitas stomata dipengaruhi oleh paparan polutas yang berada disekitar lingkungan tempat tumbuhnya tumbuhan (Humami *et. al.* 2020). Gambar 7. memperlihatkan adanya penurunan densitas stomata pada embrio nucelar dari kedua galur, hasil ini menunjukkan kemungkinan adanya penurunan kualitas pada embrio nucelar.



Gambar 7. Densitas stomata daun jeruk galur TR 74 MV dan FS A6 MV

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara tanaman jeruk dari kedua galur yang tumbuh di lapang (tetua yang sudah toleran terhadap HLB) dengan tanaman jeruk yang tumbuh di lingkungan in vitro. Hasil berbeda berupa penurunan baru terlihat pada tanaman yang berasal dari embrio nucelar yang merupakan turunan ke 2 dan ke 3 dari tetua yang sudah toleran terhadap HLB. Namun perlu ditelusuri lebih jauh melalui uji ketahanan untuk mengetahui apakah turunan galur jeruk tahan HLB yang berasal dari embrio nucelar masih membawa sifat toleran terhadap HLB atau tidak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan pada rekan-rekan penulis dan laboratorium kultur jaringan Institut Pertanian Bogor. Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman hasil kegiatan program KP4S TA 2016-2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Juanda D, Bambang C. 2000. *Budidaya dan Analisis Usaha Tani Manggis*. Yogyakarta: Kanisius.
- Santoso U, Fatimah N. 2003. *Kultur Jaringan Tanaman*. Universitas Muhammadiyah. Malang: Malang Press
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2020. Produksi Tanaman Buah-buahan 2019. <https://www.bps.go.id/indicator/55/62/1/produksi-tanaman-buah-buahan.html>. [30 Agustus 2023].
- Nurhadi, Nurhadi. 2015. Penyakit Huanglongbing Tanaman Jeruk (Candidatus Liberibacter Asiaticus): Ancaman Dan Strategi Pengendalian." *Pengembangan Inovasi Pertanian*, vol. 8, no. 1, Mar. 2015, doi:[10.21082/pip.v8n1.2015.21-32](https://doi.org/10.21082/pip.v8n1.2015.21-32)
- IPGRI. 1999. *Descriptors for Citrus*. Roma: International Plant Genetic Resources Institute.
- Humami, D.W., Sujono, P.A.W & Desmawati, I. (2020). Densitas dan Morfologi Daun *Pterocarpus indicus* di Jalan Arif Rahman Hakim dan Kampus ITS Surabaya. *Rekayasa*, 13 (3), 240-245. doi: <https://doi.org/10.21107/rekayasa.v13i3.7869>
- Adiartayasa, W. Dan I. G. Susrama. 2008. Pemilihan Pohon Induk Bebas Penyakit CVPD dengan Uji PCR pada Tanaman Jeruk Siam. *Agritrop Journal Ilmu-Ilmu Pertanian*. Vol. 27 No 1 Maret 2008.
- Paluvi, Niken., Mukarlina dan Riza Linda. 2015. Struktur Anatomi Daun, Kantung dan Sulus *Nepenthes gracilis* Korth. yang Tumbuh di Area Intensitas Cahaya Berbeda. *Jurnal Protobiont*, IV (1): 103-107.
- Budiono, R., Sugiarti, D., Nurzaman, M., Setiawati, T., Supriatun, T., & Mutaqin, A. Z. (2016). Kerapatan stomata dan kadar klorofil tumbuhan *Clausena excavata* berdasarkan perbedaan intensitas Cahaya
- Kosmiatin M, Akhdiya A, Santoso T, Reflinur, Roostika I, Trijatmiko KR, Mastur, Husni A, Martasari C, Yunimar. 2018. Perakitan Jeruk Unggul Tahan CVPD melalui Pendekatan Bioteknologi. Bogor (ID): BB Biogen.

Kosmiatin M, Martasari C, Yunimar, Akhdiya, Husni A. 2020. In vitro selection to increase Huanglongbing tolerance of citrus-derived from in vitro breeding. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 457 012080.