



CURRENT BIOCHEMISTRY

e-ISSN: 2355-7877

Journal Homepage: <http://biokimia.ipb.ac.id/>

Journal Email: current.biochemistry@gmail.com



Induksi dan Karakter Pertumbuhan Kalus Triploid dari Endosperma Avokad (*Persea americana* Mill.)

Edy Sukmara¹⁾, Lazarus Agus Sukamto²⁾ Maria Bintang^{1*)}

¹⁾Departemen Biokimia, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

²⁾Pusat Penelitian Biologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Cibinong 16911.Indonesia

Received: 30 January 2014; Accepted: 1 April 2014

Corresponding author: Prof. Dr. drh. Maria Bintang, MS; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; Email: maria_bintang@yahoo.com

ABSTRACT

The concentration of the Plant Growth Regulators (PGR) medium as well as endosperm viability determines the success of triploid avocado callus. This study was aimed to explore the best size of diameter fruit and the most responsive concentration for the induction of endosperm avocado callus. The study consisted of two phases. The first stage is to determine the best diameter size of avocado and concentration of the culture medium that gave the fastest response to be endosperm callus. The second stage used flow cytometer to obtain triploid of avocado endosperm callus. This study used four size of fruit group diameter; that A=(0.30-0.50), B=(0.51-1.00), C=(1.01-1.50) and D=(1.51-2.20) in cm. Factorial experiment with four replications was arranged in a completely randomized design. Murashige and Skoog medium (MS) was used in this culture with two PGR that the Picloram and 2,4-D. Each with concentration : 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 in mg/l. The most responsive diameter fruit size was group B (0.30 – 0.50 cm) with the fastest callus growth average was 7.67 weeks after culture (WAC). The most responsive concentration for endosperm callus induction was Picloram 2 mg/l, growth in 5.08 WAC. The endosperm callus growth successfully done by the inclusion of avocados embryos. The best interaction between fruits diameter and concentration for callus avocado induction used fruits diameter A with picloram 2 mg/l. The endosperm callus were measured by using flow cytometer resulted in avocado triploid callus with region range (RN) Mean value wer 302.01, 296.60, and 298.51 respectively. while the avocado leaf control resulted in 198.82 diploid plant.

Keywords: avocado, endosperm culture, picloram, 2,4-D, callus induction

ABSTRAK

Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) serta kemampuan hidup endosperma menentukan keberhasilan induksi kalus avokad triploid. Penelitian ini bertujuan mencari ukuran diameter buah avokad terbaik untuk dikultur serta konsentrasi ZPT yang memiliki respon paling cepat untuk induksi pembentukan kalus endosperma avokad. Penelitian ini terdiri atas dua tahap yaitu, pertama menentukan ukuran buah dan konsentrasi ZPT yang memiliki respon tercepat untuk induksi kalus avokad. Tahap kedua, yaitu penentuan kalus avokad triploid menggunakan flow sitometer. Penelitian ini menggunakan empat kelompok ukuran diameter buah avokad dalam cm, yaitu kelompok A=(0,30-0,50), B=(0,51-1,00), C=(1,01-1,50) dan D=(1,51-2,20). Rancangan acak lengkap pola faktorial dengan empat ulangan digunakan dalam penelitian

ini. Kultur menggunakan media Murashige dan Skoog (MS) dengan dua ZPT Pikloram dan 2,4-D yang masing-masing dengan konsentrasi 0.5, 1.0, 2.0 dan 4.0 dalam mg/l. Ukuran buah yang paling responsif untuk dikultur adalah Kelompok B, dengan rata-rata pertumbuhan kalus tercepat 7,67 minggu setelah kultur (MSK). ZPT paling responsif untuk induksi kalus endosperma adalah Pikloram 2 mg/l dengan rata-rata pertumbuhan kalus tercepat 5,08 MSK. Keberhasilan pertumbuhan kalus endosperma avokad juga ditentukan oleh penyertaan embrio dalam kultur endosperma. Interaksi antara diameter buah dan ZPT yang terbaik adalah buah kelompok A dan Picloram 2,0 mg/l dengan pertumbuhan kalus tercepat 4,00 MSK. Pengukuran kalus endosperma avokad menggunakan flow sitometer diperoleh nilai kalus avokad triploid dengan nilai Region Range (RN) Mean pada 302,01, 296,60 dan 298,51 dengan kontrol daun avokad sebesar 196,82 bernilai diploid.

Kata kunci : avokad, kultur endosperma, picloram, 2,4-D, induksi kalus

1. PENDAHULUAN

Avokad memiliki ukuran biji lebih dari seperempat volume daging buahnya. Ukuran biji yang besar tersebut mengurangi ketebalan daging buah dan menurunkan tingkat kepuasan konsumen. Perakitan tanaman triploid diharapkan akan menghasilkan tanaman avokad tanpa biji atau buah dengan biji yang tidak berkembang sempurna sehingga ukuran bijinya menjadi lebih kecil. Keuntungan yang didapat dari avokad tanpa biji adalah meningkatkan daya tarik konsumen dan umumnya buah tanpa biji harganya lebih mahal (Pardal, 2009). Keuntungan lain yang diperoleh dari tanaman triploid biasanya memiliki pertumbuhan vegetatif yang lebih vigor dibandingkan tanaman diploidnya (Thomas and Chaturvedi, 2008). Tanaman avokad triploid dapat dikembangkan dari kalus avokad triploid.

Secara alami buah avokad tanpa biji terdapat di alam dengan sebutan cuke (dibaca kyuk), tetapi buahnya berukuran kecil dan terjadi hanya pada sebagian pohon saja. Hal ini bisa terjadi karena adanya proses pembuahan yang tidak sempurna. Kultur endosperma adalah metode yang tepat untuk mendapatkan kalus avokad triploid. Cara ini memerlukan waktu yang lebih singkat dibandingkan cara penyilangan. Masa juvenil avokad yang cukup lama, yaitu 3 sampai 6 tahun, serta untuk penyilangan sangat sulit karena tingkat gugur bunga dan buah sangat tinggi mencapai lebih dari 98% (Sedgley, 1980), merupakan kendala untuk mendapatkan avokad triploid dengan cara penyilangan. Jaringan endosperma memiliki kromosom triploid karena merupakan hasil penggabungan dari 3 inti sel haploid, satu dari sel

gamet jantan dan dua dari sel gamet betina. Kondisi triploid pada jaringan endosperma merupakan potensi yang dapat digunakan untuk mendapatkan tanaman triploid yang dapat dikembangkan untuk memperoleh buah avokad tanpa biji. Salah satu tahapan untuk mendapatkan avokad triploid adalah penelitian tentang induksi kalus endosperma avokad.

Penelitian tentang kultur jaringan avokad telah banyak dilakukan dan memiliki banyak aspek yang diteliti termasuk eksplan yang digunakan seperti penelitian menggunakan embrio matang, tunas, daun, bunga, pollen, dan kotiledon (Yasseen, 1993). Penelitian tentang kultur *in vitro* menggunakan eksplan endosperma avokad untuk mendapatkan tanaman triploid belum ada yang melaporkan. Media penginduksi kalus triploid serta karakternya belum banyak diketahui. Beberapa penelitian tentang kultur *in vitro* endosperma telah menghasilkan tanaman triploid seperti: Citrus spp. (Gmitter *et al.*, 1990), *Acacia nilotica* (Garg *et al.*, 1996), *Mallotus philippensis* (Sehgal and Abbas, 1996), *Actinidia* spp. (Machno and Przywara, 1997), *Morus alba* (Thomas *et al.*, 2000), *Azadirachta indica* (Chaturvedi *et al.*, 2003), *Actinidia deliciosa* (Góralski *et al.*, 2005), dan *Lonicera caerulea* (Miyashita *et al.*, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ukuran diameter buah avokad yang memiliki endosperma terbaik untuk dikultur dan konsentrasi ZPT yang optimal untuk induksi kalus endosperma avokad. Penelitian ini juga diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang karakter kalus triploid endosperma avokad.

2. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Genetik Puslit Biologi LIPI Cibinong Bogor, mulai bulan Oktober 2012 hingga Desember 2013. Sampel avokad varietas ijo bulat yang digunakan dikumpulkan dari sekitar Bogor, dibagi menjadi empat kelompok berdasarkan diameter horizontal buah dalam ukuran cm, yaitu : kelompok A : (0,30-0,50); B : (0,51-1,00); C : (1,01- 1,50) dan D : (1,51- 2,20). Jumlah sampel terdiri dari 147 buah.

Buah avokad dikelompokkan sesuai ukuran, dicuci dalam air mengalir, kemudian buah disimpan dalam gelas kimia steril dalam kotak laminar. Sterilisasi dilakukan dengan merendam buah dalam klorox 10% selama 10 menit, klorox 5% selama 5 menit kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali (Sunyoto, 2010), setelah itu disimpan dalam cawan petri sesuai dengan ukuran. Sebelum dikultur buah dicelup dalam alkohol 70% dan dibakar. Buah dibelah secara longitudinal dan eksplan embrio atau endosperma dikultur. Semua kultur dilakukan dalam kotak laminar. Endosperma kemudian dikultur dalam media inisiasi kalus dalam cawan Petri, endosperma dikultur dengan atau tanpa penyertaan embrio, cawan Petri disimpan sebagian di tempat gelap (kontainer tertutup) dan sebagian disimpan di rak kultur. Suhu ruangan dipertahankan pada kisaran 22-25 °C. Subkultur dilakukan sebulan sekali pada media yang sama.

Jaringan endosperma avokad dikultur dalam media Murashige dan Skoog (MS). ZPT yang diujikan masing-masing dengan asam 2,4-diklorophenoksiasetat (2,4-D) dan asam 4-Amino-3,5,6-trikloro-2-piridin karboksilat (Picloram) dengan variasi konsentrasi masing-masing 0,5; 1,0; 2,0; dan 4,0 dalam mg/l. Terdapat 8 perlakuan media tumbuh dan dilakukan 4 ulangan dan masing-masing ulangan terdapat 10 eksplan. Kalus yang terbentuk pada tahap inisiasi kemudian diregenerasikan dalam media kultur MS yang mengandung ZPT sitokinin yaitu *benzyl amino purin* (BA), *6-furfurilaminopurin* (Kinetin) dan *thidiazuron* (TDZ) dengan konsentrasi masing-masing dalam mg/l : 1,0; 2,0; dan 4,0 serta kontrol tanpa sitokinin.

Pengamatan dilakukan meliputi beberapa aspek yaitu 1. Pengaruh *Picloram* dan 2,4-D dengan konsentrasi 0,5; 1,0; 2,0; dan 4,0 mg/l terhadap pertumbuhan kalus. Pengamatan dilakukan mulai minggu ke-1 sampai minggu ke-16. Aspek yang diamati yaitu waktu terbentuknya kalus, persentasi terbentuknya kalus dan warna kalus. Analisis data kuantitatif dilakukan dengan menghitung nilai rerata setiap perlakuan dan data kualitatif merupakan data kondisi rerata sampel yang diamati dari masing-masing perlakuan. 2. Pengaruh ukuran diameter buah avokad terhadap respon pertumbuhan kalus. Pengamatan dilakukan terhadap kecepatan munculnya kalus. 3. Membandingkan kultur eksplan embrio, endosperma dan gabungan embrio dan endosperma avokad. Pengamatan dilakukan tiap minggu sampai minggu ke 20, aspek yang diamati yaitu respon pertumbuhan dari ketiga eksplan yaitu kecepatan tumbuhnya eksplan. 4. Pengaruh auksin (*NAA*) dan sitokinin (*BA* dan *TDZ*) terhadap perkembangan kalus endosperma avokad. Aspek yang diamati adalah ukuran dan warna kalus.

Penentuan ploidi kalus endosperma menggunakan Flow sitometer (Partec GmbH, Jerman). Pengujian terdiri atas dua tahap persiapan (sesuai dengan petunjuk dari pabriknya), yaitu : 1. Tahap persiapan pewarnaan larutan (*staining*). Sebanyak 2 ml bufer *staining* dicampurkan dengan 12 µl larutan stok (PI) dan 6 µl larutan stok RNase. 2. Tahap persiapan sampel tanaman, yaitu kurang lebih sebanyak 0,5 cm² daun dari planlet atau dari standar (daun muda avokad) disimpan dalam cawan Petri ukuran 55 mm² (Partec kode 04-2005), kemudian ditambahkan 500 µl ekstrak bufer. Sampel uji dicacah menggunakan silet selama 30 sampai 60 detik. Kemudian diinkubasi selama 30-90 detik dalam ekstrak bufer, setelah itu sampel disaring menggunakan Partec 50 µl *cell trics disposable filter*. Larutan *staining* ditambahkan sebanyak 2 ml (dengan PI dan RNase) dalam tabung tes, kemudian sampel diinkubasi selama 30-60 menit dan dijaga supaya tidak terkena cahaya, setelah itu dilakukan analisis. Pengukuran ploidi dilakukan sebanyak 22 kali, meliputi sampel embrio sebanyak 4 ulangan, endosperma 3 ulangan, daging buah 2 ulangan, daun 2 ulangan, dan kalus yang terbentuk sebanyak 11 ulangan. Penentuan sampel kalus diambil berdasarkan warna, umur kalus setelah

kultur dan bagian dari kalus (dibagi tiga, yaitu kalus bagian permukaan, tengah dan bawah).

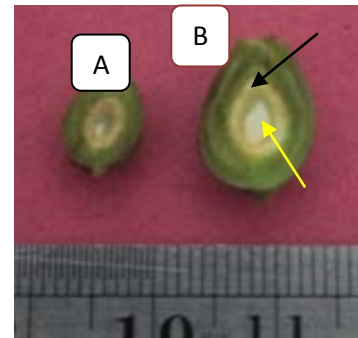
Data yang berhasil dikumpulkan dalam penelitian ini dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) menggunakan program SPSS 22. Jika nilai F hitung lebih besar dari nilai F tabel, maka dilakukan uji lanjut perbedaan rerata perlakuan menggunakan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 95%.

3. HASIL

Hasil pengamatan menunjukkan endosperma avokad di bawah kelompok A masih berwujud cair. Endosperma bertambah tebal dengan bertambahnya ukuran diameter dari kelompok A ke B, dan ketebalannya menurun pada kelompok C dan D. Berdasarkan Gambar 1, terlihat endosperma avokad kelompok B berupa padatan kenyal berwarna kuning transparan, dibagian pangkal terdapat embrio yang berwarna putih dan antara daging buah dan endosperma terdapat nuselus. Ukuran endosperma berubah sesuai umur perkembangan buah.

Pengujian ukuran diameter buah yang paling respon untuk menginduksi pertumbuhan kalus dilakukan dan hasilnya ditampilkan pada Tabel 1.

Kultur endosperma avokad hanya dapat tumbuh apabila dilakukan dengan penyertaan embrionya. Pada penelitian ini dilakukan pengujian respon tumbuh kalus menggunakan tiga eksplan yang berbeda, yaitu embrio, endosperma dan gabungan embrio dengan endosperma. Uji Kruskal-Wallis untuk menentukan beda nyata kultur ke tiga eksplan tersebut. Hasil yang sama diperoleh untuk keseluruhan kelompok diameter buah yang diujikan, yaitu hanya terdapat beda



Gambar 1. Ukuran embrio dan endosperma avokad kelompok A dan B. Panah warna hitam = endosperma, panah kuning = embrio

nyata pada kelompok eksplan gabungan embrio dan endosperma avokad. Kultur eksplan gabungan embrio dan endosperma memberikan persentasi pertumbuhan kalus paling besar diantara ketiga jenis eksplan yang diujikan dengan, sedangkan kultur eksplan endosperma saja pada semua ukuran diameter buah yang diujikan tidak menghasilkan pertumbuhan kalus. Adapun hasil kultur ketiga eksplan tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada penelitian ini penggunaan *Picloram* lebih baik dibanding *2,4-D*. Hal ini terlihat dari rerata waktu terbentuknya kalus maupun persentasi pembentukan kalus. *Picloram* memiliki respon pembentuk kalus 1,6 kali lebih cepat dibandingkan *2,4-D*, dan persentasi pertumbuhan kalus 96% lebih tinggi dibandingkan *2,4-D*. Pemilihan ZPT yang tepat dapat menentukan keberhasilan induksi kalus endosperma avokad ini. Berdasarkan data pada Tabel 3 terlihat bahwa endosperma avokad lebih respon apabila dikultur pada media *Picloram* dibandingkan dengan media *2,4-D*, rerata persentase pertumbuhan kalus avokad dengan *Picloram* adalah 65,78% sedangkan *2,4-D* adalah hanya sebesar 33,61%. Waktu terbentuknya kalus pun lebih cepat pada *Picloram* dibanding *2,4-D*.

Tabel 1. Pengaruh ukuran diameter buah terhadap pertumbuhan kalus endosperma avokad

Kelompok	Ukuran (cm)	Jumlah eksplan yang dikultur	Jumlah eksplan tumbuh kalus	Persentase tumbuh kalus (%)	Akhir pengamatan (Minggu Setelah Kultur=MSK)	Rerata respon tumbuh kalus tercepat (MSK)
A	0,30-0,50	28	4	14	15	4,75
B	0,51-1,00	42	10	24	15	5,57
C	1,01-1,50	27	15	55	15	7,38
D	1,51-2,20	50	19	38	15	7,90
		147	48			

Tabel 2. Perbandingan penyertaan embrio dalam kultur endosperma avokad

Jenis Eksplan	Jumlah Kultur	Jumlah Eksplan Jadi Kalus	% Tumbuh	Akhir Minggu Pengamatan (MSK)
Embrio	18	5	27,77 %	15
Endosperma	22	0	0,00 %	15
Embrio+Endosperma	107	48	44,85 %	15

Tabel 3. Pengaruh beberapa konsentrasi *Picloram* dan *2,4-D* terhadap saat terbentuknya kalus, struktur kalus, warna kalus dan persentase terbentuknya kalus

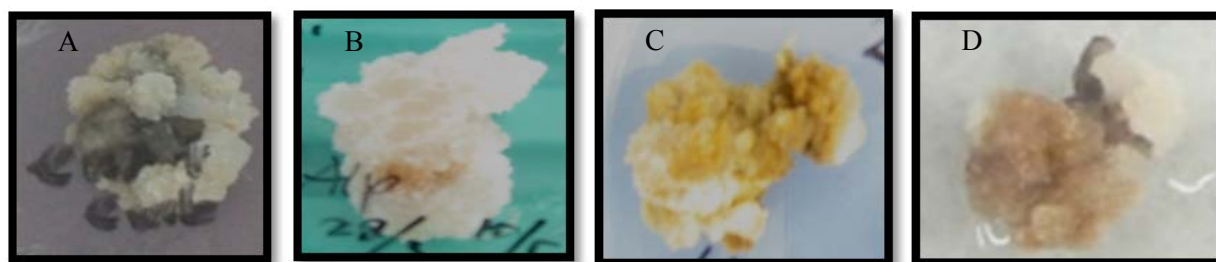
No.	ZPT (mg/l)	Respon tercepat terbentuknya kalus (MSK)	Struktur kalus	Warna kalus	Persentase pembentukan kalus (%)
1.	<i>Picloram</i> 0,5	7	Remah	Putih, kuning	90,00
2.	<i>Picloram</i> 1,0	8	Kompak	Putih, kuning	64,70
3.	<i>Picloram</i> 2,0	6	Remah	Putih, krem	64,70
4.	<i>Picloram</i> 4,0	8	Kompak	Putih, krem	43,75
	Rerata	7,25			65,78
5.	<i>2,4-D</i> 0,5	6	Kompak	Putih	41,66
6.	<i>2,4-D</i> 1,0	16	Kompak	Putih, kuning	40,00
7.	<i>2,4-D</i> 2,0	15	Kompak	Putih, kuning	11,11
8.	<i>2,4-D</i> 4,0	10	Kompak	Putih, krem	41,66
	Rerata	11,75			33,61

Keterangan : *Picloram* = asam 4 – amino – 3, 5, 6 – trikloro – pikonat
2,4-D = asam 2,4- diklorophenoksiasetat
 MSK = Minggu Setelah Kultur

Tabel 4. Pengaruh diameter ukuran buah terhadap respon minggu tumbuhnya kalus

Diameter buah (cm)	N	Respon tumbuh kalus (MSK)	
		1	2
d2	24	7,6667 ^a	
d3	24		8,7500 ^b
d4	24		8,8333 ^b
d1	24		9,4167 ^b
Sig.		1,000	,214

Keterangan : d1= diameter kel. A; d2= diameter kel. B; d3= diameter kel.C;
 d4= diameter kel.D



Gambar 2. Struktur dan warna kalus gabungan endosperma dan embrio avokad. (A) struktur kalus remah; (B) Struktur kalus kompak; (C) warna kalus kuning ; (D) warna kalus campuran krem dan putih.

Struktur kalus dalam penelitian ini ada dua jenis, yaitu remah dan kompak. Berdasarkan warna, kalus endosperma avokadpun memiliki warna yang berbeda-beda, yaitu putih, kuning, coklat dan krem. Selain ketiga warna tersebut, terdapat juga gabungan dari warna-warna yang muncul.

Hasil uji statistik menunjukkan ada pengaruh beda nyata pada pengujian respon ZPT, diameternya buah dan interaksi keduanya (tabel hasil tidak dicantumkan). Uji lanjut menggunakan uji Duncan menunjukkan respon tumbuh kalus tercepat pada buah kelompok B, dengan rerata respon tumbuh kalus tercepat 7,66 MSK (Tabel 4). Adapun ZPT yang memiliki rerata respon tumbuh kalus tercepat adalah Picloram 2 mg/l, dengan nilai rerata tumbuh kalus 5,08 MSK. Interaksi antara diameter buah dan ZPT yang menghasilkan respon tumbuh kalus tercepat adalah diZ3, yaitu buah yang memiliki diameter kelompok A dan ZPT picloram 2 mg/l (tabel hasil tidak dicantumkan).

Pengujian selanjutnya adalah melihat pengaruh auksin dan sitokinin terhadap pertumbuhan kalus endosperma avokad. Hasil menunjukkan bahwa kombinasi antara auksin (*NAA*) dan sitokinin (*BA*) memberikan pengaruh yang lebih besar dibandingkan auksin saja (*NAA*) atau sitokinin saja (*BA*, *TDZ*) pada konsentrasi yang sama. Data hasil dapat dilihat pada Tabel 5.

Pada penelitian tahap ke dua, kalus yang terbentuk pada penelitian tahap satu diukur tingkat ploidyanya menggunakan flow sitometer. Data hasil pengukuran kalus avokad ditampilkan pada Tabel 6.

4. PEMBAHASAN

Ukuran endosperma berubah sesuai umur perkembangan buah. Pada tahap awal endosperma membesar mengikuti ukuran buah namun seiring

perkembangan embrio dan kotiledon, ketebalan endosperma menipis menyerupai selaput dan bahkan akhirnya menghilang. Endosperma merupakan jaringan pada biji yang menyimpan cadangan makanan. Pada sebagian besar tanaman dikotil, endosperma sebagai makanan diserap embrio yang sedang berkembang sebelum biji memasuki masa istirahat, akibatnya biji dewasa sudah tidak mengandung endosperma. Pada buah kelompok A, endosperma lebih besar dibanding embrionya. Pada buah kelompok B, endospermanya semakin menipis sedangkan embrionya semakin membesar. Hal ini terjadi karena endosperma diserap sebagai makanan oleh embrio, sehingga semakin lama ukuran embrio semakin membesar, tetapi endospermanya semakin berkurang.

Berdasarkan persentasi tumbuhnya kalus, maka makin besar ukuran buah maka persentase tumbuhnya kalus makin besar juga. Persentase tumbuhnya kalus terbesar pada buah kelompok C dan kecenderungannya meningkat dari kelompok A ke kelompok C, tetapi mengalami penurunan kembali pada kelompok D. Respon tumbuh kalus tercepat diperoleh dari buah kelompok A yaitu 4,75 MSK, sedangkan yang paling lambat adalah buah kelompok D yaitu 7.90 MSK. Hal ini ada kaitannya dengan ukuran ketebalan endosperma. Bertambahnya umur buah, maka ketebalan ukuran endosperma menipis dan bahkan akhirnya menghilang, ini dapat merupakan salah satu alasan penurunan respon tumbuh tersebut. Endosperma sebagai cadangan makanan bagi embrio, mengandung zat gizi seperti karbohidrat dan protein yang sangat dibutuhkan untuk awal pertumbuhan kalus. Berdasarkan persentase tumbuhnya kalus, maka makin besar ukuran buah maka persentasi tumbuhnya kalus makin besar juga. Persentase

Tabel 5. Perbandingan pengaruh sitokinin dan auksin terhadap pertumbuhan kalus endosperma avokad setelah 9 MSK

No	Ukuran kalus awal (pxl) cm ²	ZPT (mg/l)	rerata kelipatan pertambahan luas	Warna
1	0,5x0,5	<i>BA 1</i>	6,12	putih,coklat
2	0,5x0,5	<i>BA1 +NAA1</i>	7,50	putih,coklat
3	0,5x0,5	<i>NAA1</i>	6,96	putih.krem
4	0,5x0,5	<i>TDZ 1</i>	2,93	putih,coklat

Keterangan : BA 1 = *Benzyl Adenin* 1 mg/l; NAA = *Naftalenic acetic acid* 1 mg/l; TDZ = *Tidhiazuron* 1mg/l

Tabel 6. Data hasil pengukuran flowsitometer avokad

No.	Nama Sampel	Mean-X	CV-%	Tingkat Ploidii
1.	Embrio	207,33	8,93	Diploid
2.	Daun	196,82	11,72	Diploid
3.	Kalus bagian atas	237,27	11,20	Diploid
4.	Kalus bagian tengah	301,97	9,76	Triploid
5.	Kalus bagian tengah	296,86	10,73	Triploid
6.	Kalus bagian tengah	298,51	9,53	Triploid

Keterangan : Mean-X = nilai tengah dari kurva; CV-% = Persentasi koifisien varian

tumbuhnya kalus terbesar pada buah kelompok C dan kecenderungannya meningkat dari kelompok A ke kelompok C, tetapi mengalami penurunan kembali pada kelompok D.

Kultur endosperma avokad hanya dapat tumbuh apabila disertai dengan embrionya. Beberapa penelitian melaporkan bahwa kultur endosperma ada yang berhasil tanpa penyertaan embrio pada *Citrus grandis* dan *C. sinensis* (Wang and Chang, 1978), pir (Zhao, 1988), sedangkan pada penelitian lain kultur endosperma hanya berhasil jika ada penyertaan embrio pada kultur endosperma *Croton*, *Ricinus* dan *Putranjiva* (Srivastava, 1982). Adapun kultur endosperma cendana dapat tumbuh dengan atau tanpa penyertaan embrio (Lakhsmi, 1987).

Keberhasilan kultur endosperma dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya umur endosperma yang dikultur dan penyertaan zigot embrio (Sukamto, 2010). Penentuan umur endosperma saat dikultur merupakan fase kritis terhadap respon pertumbuhannya (Tao *et al.* 2009). Jaringan endosperma yang terlalu muda ataupun yang terlalu tua melampaui fase meristimatis biasanya tidak respon bila dikultur. Penentuan umur endosperma avokad merupakan tahap awal untuk penentuan keberhasilan penelitian ini.

Pada penelitian ini digunakan media MS dengan ZPT yang telah digunakan dalam penelitian avokad dengan eksplan embrio yaitu menggunakan *Picloram* (Witjaksono and Litz, 1999). Alasan penggunaan *Picloram* karena ada persamaan eksplan yang digunakan dalam percobaan ini yaitu menggunakan embrio dan endosperma. Penggunaan *2,4-D* sebagai pembanding dari ZPT yang digunakan, karena *2,4-D* merupakan ZPT yang umum digunakan dalam menginduksi kalus endosperma tanaman dikotil (Suryowinoto, 1996). Persentase

pertumbuhan kalus tertinggi dicapai oleh *Picloram* 0,5 mg/l. Semakin tinggi konsentrasi *Picloram*, maka persentasi pembentukan kalus makin menurun. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian lainnya dengan menggunakan eksplan embrio muda. Penggunaan konsentrasi *Picloram* di bawah 0,1 mg/l dan di atas 1,0 mg/l menyebabkan penurunan pertumbuhan kalus embrio avokad (Mooney and Van Staden, 1987). Dalam kultur *in vitro*, peran auksin adalah untuk merangsang pertumbuhan kalus, akar, pembelahan dan pemanjangan sel dan organ (Pierik, 1987).

Pada penelitian ini penggunaan *Picloram* lebih baik dibanding *2,4-D*. Hal ini terlihat dari rerata waktu terbentuknya kalus maupun persentase pembentukan kalus. *Picloram* memiliki respon pembentukan kalus 1,6 kali lebih cepat dibandingkan *2,4-D*, dan persentase pertumbuhan kalus 96 % lebih tinggi dibandingkan *2,4-D*. Pemilihan ZPT yang tepat dapat menentukan keberhasilan induksi kalus endosperma avokad ini. Data pada tabel 3 menunjukkan bahwa endosperma avokad lebih respon apabila dikultur pada media *Picloram* dibandingkan dengan media *2,4-D*, rerata persentasi pertumbuhan kalus avokad dengan *Picloram* adalah 65,78 % sedangkan *2,4-D* adalah hanya sebesar 33,61 %. Waktu terbentuknya kalus pun lebih cepat pada *Picloram* dibanding *2,4-D*. Secara keseluruhan apabila dibandingkan antara 8 media kultur yang digunakan maka yang terbaik adalah *Picloram* 0,5 mg/l, sedangkan ZPT yang memiliki respon tercepat yaitu *Picloram* 2 mg/l dan *2,4-D* 0,5 mg/l yang masing-masing tumbuh kalus 6 MSK.

Struktur kalus dalam penelitian ini ada dua jenis, yaitu remah dan kompak. Kalus kompak terbentuk karena kalus mengalami lignifikasi

sehingga kalus tersebut mempunyai struktur keras dan kompak. Adapun kalus yang tumbuh terpisah-pisah menjadi bagian-bagian kecil dinamakan kalus remah. Berdasarkan warna, kalus endosperma avokadpun memiliki warna yang berbeda-beda, yaitu putih, kuning, krem. Selain ketiga warna tersebut, terdapat juga gabungan dari warna-warna yang muncul. Perbedaan warna yang muncul dapat terjadi karena perbedaan eksplan yang digunakan. Pada kultur avokad ini, eksplan yang digunakan adalah embrio dan gabungan endosperma dan embrio, sehingga warna yang munculpun dapat berbeda-beda.

Pengujian pengaruh auksin dan sitokinin terhadap pertumbuhan kalus endosperma avokad. Hasil menunjukkan bahwa kombinasi antara auksin (*NAA*) dan sitokinin (*BA*) memberikan pengaruh yang lebih besar dibandingkan auksin saja (*NAA*) atau sitokinin saja (*BA*, *TDZ*) pada konsentrasi yang sama.

Pada penelitian tahap ke dua, kalus yang terbentuk pada penelitian tahap satu diukur tingkat ploidinya menggunakan flow sitometer. Sebagai standar digunakan daun dan daging buah avokad yang bersifat diploid. Untuk mendapatkan hasil yang tepat seluruh bagian kalus dicoba, hal ini dilakukan karena kalus endosperma avokad hanya dapat tumbuh dari penyertaan dengan embrio, jadi bagian kalus ada yang berasal dari embrio juga ada yang berasal dari endosperma. Kalus dibagi menjadi tiga bagian, yaitu bagian atas, bagian tengah dan bagian bawah. Pada penelitian ini didapatkan bahwa kalus avokad yang berwarna putih krem untuk bagian atas dan bawah ternyata bersifat diploid, sedangkan bagian tengah bersifat triploid. Perbedaan ploidi hasil pengukuran kalus, dapat terjadi karena kalus yang diukur merupakan paduan antara embrio dan endosperma. Ploidi embrio bersifat diploid sedangkan endosperma bersifat triploid. Jadi dari hasil pengukuran menunjukkan kalus yang terbentuk berasal dari embrio dan endosperma, karena sifat ploidi keduanya muncul. Berdasarkan hasil pengukuran ini dapat disimpulkan bahwa kalus gabungan endosperma dan embrio avokad yang berwarna krem, bagian tengahnya bersifat triploid.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Kami haturkan ucapan terima kasih kepada Kepala Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong yang telah memberikan izin untuk melakukan penelitian dan menggunakan alat serta bahan yang ada di Laboratorium Kultur Jaringan.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Chaturvedi, R., M.K.Razdan, and S.S. Bhojwani. 2003. An efficient Protocol for the Production of Triploid Plants from Endosperm Callus of Neem, *Azadirachta indica*. A. Juss. J. Plant Physiol. 160: 557–564.
- Garg, L., N.N. Bhandari, V. Rani, and S.S. Bhojwani. 1996. Somatic Embryogenesis and Regeneration of Triploid Plants in Endosperm Cultures of *Acacia nilotica*. Plant Cell Rep. 15:855–858.
- Gmitter, F.G.Jr., X.B. Ling and X.X. Deng. 1990. Induction of Triploid *Citrus* Plants from Endosperm Calli *in Vitro*. Theor. Appl. Gen. 80:785-790.
- Góralski, G., M. Popielarska, H. Ślesak, D. Siwińska and M. Batorycka. 2005. Organogenesis in Endosperm of *Actinidia deliciosa* cv. Hayward Cultured *In Vitro*. Acta Biol. Crac. Ser. Bot. 47: 121–128.
- Lakshmi S.G. 1987. Triploids. In J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. p: 269-284.
- Machno, D and L. Przywara. 1997. Endosperm Culture of *Actinidia* spp. Acta Biol. Crac. Ser. Bot. 39: 55–61.
- Miyashita, T., T. Ohashi, F. Shibata, H. Araki, and Y. Hoshino. 2009. Plant Regeneration with Maintenance of the Endosperm Ploidy Level by Endosperm Culture in *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 98: 291–301.
- Mooney PA and J. Van Staden . 1987. Induction of Embryogenesis in Callus from Immature Embryos of *Persea americana*. Can J. Bot. 65 : 622-626
- Pardal, JS. 2009. Rekayasa Buah Tanpa Biji, Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 31: 6
- Pierik, R.L.M. 1971. Plant Tissue Culture as Motivation for The Symposium dalam J.V. Bragt et.al, (eds). Effects of Sterilisation on Components in Nutrien Media. Wageningen : Vennman and Zonen

- Sedgley, M. 1980. Anatomical Investigation of Abscised Avocado Flowers and Fruitlets. CSIRO. Australia
- Sehgal, C.B. and N.S. Abbas. 1996. Induction of Triploid Plantlets from the Endosperm Culture of *Mallotus philippensis*. mull. Arg. Phytomorphol. 46: 283–289.
- Sukanto, L.A. 2010. Kultur *in vitro* Endosperma Protocol yang Efisien untuk Mendapatkan Tanaman Triploid Secara Langsung, Jurnal Agro Biogen 6(2):107-112
- Suryowinoto, M. 1996. Pemuliaan Tanaman Secara *in vitro*. PAU Bioteknologi UGM. Penerbit Kanisius. hal.114
- Sunyoto, S. Purnomo, dan Makbul. 2010. Formula Media Kultur Endosperma Jeruk Hasil Persilangan antar Klon Siem dan Keprok dan Jeruk besar. Jurnal Holtikultura 20(4):332-341
- Srivastava, P.S. 1982. Endosperm culture. In B.M. Johri (ed.) Experimental Embryology of Vascular Plants. Springer-Verlag, Berlin. p. 175-193
- Thomas, T.D., A.K. Bhatnagar and S.S. Bhojwani. 2000. Production of Triploid Plants of Mulberry (*Morus alba* L.) by Endosperm Culture. Plant Cell Rep. 19: 395–399.
- Thomas, T.D. and R. Chaturvedi. 2008. Endosperm Culture: A Novel Method for Triploid Plant. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 93(1):1-14.
- Tao, R., K. Ozawa, M. Tamura, and A. Sugiura. 2009. Dodecaploid Plant Regeneration from Endosperm Culture of Persimmon (*Diospyros kaki* L.). Acta Hort. 436, 119–128.
- Wang, T.Y. and C.J. Chang. 1978. Triploid *Citrus* Plantlet from Endosperm Culture. In Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, China. p. 463-467
- Witjaksono. and R.E. Litz. 1999. Induction and Growth Characteristic of Embryogenic Avocado Culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58:19-29 (diakses tanggal 30 April 2013) dari Link.Springer.com
- Yasseen, M Yasseen. 1993. Morphogenesis of Avocado *In Vitro*, A Review. California Avocado Society. Yearbook 77:101-105
- Zhao, H.X. 1988. Induction of Endosperm Plantlets of “Jinfeng” Pear *In Vitro* and Their Ploidy. p. 123-124. In Genetic Manipulation in Crops. Proc. Int. Symp. Genetic Manipulation in Crops. Beijing.