

Respon Pertumbuhan Kultur *In Vitro* Jeruk Besar (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) cv. Nambangan terhadap Osmotikum dan Retardan

In Vitro Growth Response of Pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) cv. Nambangan to Osmoticum and Retardant

Iswari S. Dewi^{1*}, Gani S. Jawak, Bambang S. Purwoko², dan M. Sabda¹

Diterima 15 November 2013/Disetujui 14 Januari 2014

ABSTRACT

In vitro conservation has been applied to many species. However, the suppression of explant growth is essential for extending the duration of conservation. The objective of the research was to study *in vitro* growth response of pummelo cv. Nambangan to conservation medium containing osmotically active compound (osmoticum) or growth suppressant (retardant). Two sets of experiments were conducted using randomized complete design and replicated three times. *In vitro* shoot with four leaves from pummelo, namely cultivar Nambangan, were used as the plant materials. The treatment in the first experiment was MS + osmoticum (mannitol 0, 20, 40, and 60 g L⁻¹) and in the second experiment was MS + retardant (paclobutrazol 0, 1, 3 and 5 mg L⁻¹). The results indicated that senescence of the leaf was induced by 20, 40, and 60 g L⁻¹ of mannitol. The best media in inhibition of growth for pummelo cv. Nambangan was MS + paclobutrazol 1 mg L⁻¹. With this media, plant was inhibited but grew normally with green leaf and root.

Keywords: mannitol, minimal growth, paclobutrazol, pummelo

ABSTRAK

Konservasi *in vitro* sudah banyak dilakukan pada berbagai spesies. Penghambatan pertumbuhan sangat penting bagi lamanya tanaman dapat disimpan. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari respon pertumbuhan *in vitro* pamelo cv. Nambangan terhadap media konservasi mengandung osmotikum atau penghambat pertumbuhan (retardan). Dua percobaan dilakukan terpisah menggunakan rancangan acak lengkap dan diulang 3 kali. Tunas hasil perbanyakan *in vitro* dengan 4 daun, digunakan sebagai eksplan. Perlakuan pada percobaan pertama adalah MS + osmotikum (mannitol 0, 20, 40, 60 g L⁻¹) dan pada percobaan kedua adalah MS + retardan (paclobutrazol 0, 1, 3, 5 mg L⁻¹). Hasil menunjukkan bahwa daun mengalami senesen oleh perlakuan mannitol. Media yang direkomendasikan untuk konservasi pamelo cv. Nambangan adalah MS + paclobutrazol 1 mg L⁻¹. Dengan media tersebut pertumbuhan dihambat, tetapi tetap normal, berakar dengan daun tetap hijau.

Kata kunci: mannitol, pertumbuhan minimal, paclobutrazol, pamelo

PENDAHULUAN

Genus citrus berasal dari daerah tropikal dan subtropikal, namun jeruk besar *Citrus maxima* (Burm.) Merr.) atau pamelo, yaitu satu-satunya jenis jeruk dengan buah yang ukurannya sangat besar, dan diketahui pusat keragamannya ada di Asia Tenggara, yaitu di

Malaysia, Thailand, Filipina dan Indonesia (Paudyal and Haq, 2008, Niyomdham, 2003). Rahayu *et al.* (2012) melalui perbandingan pita isoenzim MDH dan ACP dapat membagi aksesori plasma nutfah pamelo di Indonesia menjadi pamelo berbiji dan tidak berbiji. Salah satu jeruk pamelo yang populer adalah Kultivar Nambangan yang berkembang

¹ Balai Besar Litbang Bioteknologi dan SDG Pertanian, Bogor

² Departemen Agronomi dan Hortikultura, FAPERTA, IPB Bogor

E-mail: iswari_dewi@yahoo.com (*penulis korespondensi)

terutama di Kabupaten Magetan, Indonesia. Beberapa penelitian mulai dilakukan mengenal potensi dan mempelajari teknik budi daya terbaik untuk meningkatkan produksi (Susanto *et al.*, 2010; Rahayu *et al.*, 2012; Susilowati, 2013)

Salah satu jeruk pameló yang paling populer adalah kultivar Nambangan yang berkembang terutama di Kabupaten Magetan, Indonesia. Beberapa penelitian mulai dilakukan bertujuan mengenal potensi dan mempelajari teknik budidaya terbaik untuk meningkatkan produksi (Susanto *et al.*, 2010; Susilowati, 2013; Rahayu *et al.*, 2012). Di Indonesia, jeruk besar biasa dijumpai di pekarangan atau ditanam dalam skala komersial di kebun petani dan hanya sebagian kecil yang sudah dikonservasi *ex-situ*. Ditinjau dari segi konservasi, hal tersebut sangat riskan karena tentu tanaman di lapangan rentan terhadap hama dan penyakit, selain juga bencana alam (Rao, 2004). Konservasi *in vitro* merupakan salah satu alternatif dari konservasi *ex-situ*. Strategi konservasi *in vitro* dapat diterapkan untuk penyimpanan plasma nutfah dalam jangka pendek, menengah dan panjang dalam kondisi steril (Keller *et al.*, 2006; Pérez, 2000). Konservasi jangka pendek dan menengah secara *in vitro* memberikan beberapa keuntungan dibandingkan konservasi di lapangan karena sistem aseptik menjamin stok tanaman yang bebas patogen, menghemat ruang, mengurangi erosi genetik karena pemeliharaan optimal, mengurangi biaya pemeliharaan, mudah diperbanyak secara masal jika mendadak diperlukan, dan mempermudah pertukaran plasma nutfah (Ahmed dan Anjum, 2010; Engelmann, 1991).

Berbagai metode untuk konservasi *in vitro* telah tersedia, namun tergantung dari situasinya, teknik pertumbuhan minimal (*minimal growth*) sangat penting untuk memperpanjang lamanya siklus subkultur (Maurie *et al.*, 1998). Siklus subkultur akan berpengaruh terhadap lama penyimpanan dan biaya pemeliharaan yang diperlukan dalam konservasi plasma nutfah *in vitro* (West *et al.*, 2006). Semakin sering suatu tanaman di subkultur maka biaya yang dibutuhkan juga akan semakin besar.

Teknik *minimal growth* sesuai untuk konservasi tanaman berbiji rekalsitan yang bijinya hanya viabel dalam waktu singkat dan tidak dapat didesikasi atau untuk tanaman

yang selalu diperbanyak secara vegetatif (Rao dan Mal, 2002), seperti pameló (Dewi *et al.*, 2010). Zat yang bersifat pengendali osmotik (osmotikum) dan penghambat pertumbuhan (retardan) dapat digunakan untuk meminimalkan pertumbuhan tanaman *in vitro*. Gula alkohol seperti mannitol merupakan karbohidrat terhidrogenasi yang mempunyai peranan dalam mengendalikan tekanan osmotik yang akan mempengaruhi translokasi karbohidrat (Deguchi *et al.*, 2004), sedangkan paclobutrazol adalah senyawa triazole yang sering digunakan sebagai retardan penghambat pertumbuhan vegetatif pada tanaman angiosperma (Rademacher, 2000). Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh media mengandung beberapa taraf konsentrasi osmotikum atau retardan terhadap pertumbuhan pameló yang akan dikonservasi secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan dengan dua percobaan terpisah. Eksplan yang digunakan adalah tunas dengan empat daun yang berasal dari perbanyakan pameló berbiji yaitu kultivar Nambangan (Rahayu *et al.*, 2012), secara *in vitro*. Masing-masing percobaan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dengan perlakuan jenis zat pengatur tumbuh pada media konservasi sebagai faktor tunggal. Percobaan pertama terdiri atas perlakuan osmotikum mannitol (M) dengan taraf 0, 20, 40, 60 g L⁻¹. dan percobaan kedua terdiri atas perlakuan retardan paklobutrazol (P) dengan taraf 0, 1, 3, 5 mg L⁻¹. Masing-masing perlakuan pada setiap percobaan diulang sebanyak 3 kali, sehingga setiap percobaan terdiri atas 12 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri atas 3 eksplan.

Media yang digunakan adalah media MS yang diberi myoinositol 100 mg L⁻¹, thiamine-HCl 10 mg L⁻¹, pyridoxine 10 mg L⁻¹, nicotinic acid 1 mg L⁻¹ dan sukrosa 30 g L⁻¹. Osmoregulator dan retardan diberikan sesuai dengan perlakuan. Sebelum penambahan agar 8 g L⁻¹, pH medium ditetapkan 5.8. Media diotoklaf pada 18-20 Psi dengan suhu 120 °C selama 20 menit. Medium diisikan sebanyak 40 ml (*aliquots*) kedalam botol kultur. Kultur diinkubasi dibawah pencahayaan 16 jam dengan sumber cahaya lampu TL. Suhu ruang kultur 26 ± 2 °C.

Kultur diamati dua minggu sekali selama enam bulan. Peubah yang diamati adalah tinggi tunas, jumlah daun, jumlah tunas, jumlah akar, sedangkan penampilan plantlet secara fisik difoto dengan kamera digital. Data dengan interval empat minggu yang meliputi peubah tinggi tanaman, jumlah daun, jumlah tunas, dan jumlah akar diolah secara statistik. Untuk hasil sidik ragam, jumlah daun percobaan mannitol dan paclobutrazol serta jumlah tunas dan jumlah akar semua percobaan, data ditransformasi dengan $(x + 0.5)^{1/2}$ untuk memperkecil koefisien keragaman sehingga data lebih normal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan mannitol pada berbagai taraf menunjukkan pengaruh yang nyata sampai sangat nyata terhadap peubah tinggi tunas, dan jumlah daun. Namun perlakuan paclobutrazol tidak berpengaruh terhadap semua peubah yang diamati (Tabel 1).

Tinggi Tunas

Pengaruh mannitol dan paclobutrazol terhadap peubah tinggi tunas pada berbagai taraf disajikan pada Tabel 2 dan 3. Pertumbuhan eksplan pada perlakuan dengan mannitol tampak mengalami penghambatan. Pengaruh pemberian mannitol sudah tampak pada perlakuan mannitol 20 g L⁻¹. Tampak tinggi tunas pada perlakuan mannitol (20, 40 dan 60 g L⁻¹) selalu lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan tanpa mannitol.

Umumnya, semakin tinggi konsentrasi mannitol yang diberikan akan semakin besar pengurangan tinggi tunas. Penelitian Charoensub dan Phansiri (2004) pada *Plumbago indica* menunjukkan perlakuan mannitol 20-60 g L⁻¹ sangat berpengaruh pada pengurangan tinggi ekplan sampai 93,3%. Pada penelitian ini pengurangan tinggi tunas jeruk besar dengan konsentrasi mannitol yang sama berkisar antara 39.6 - 63.8%.

Pada saat pengamatan 24 MST tanaman sudah banyak yang mati pada perlakuan mannitol 60 g L⁻¹. Osmotikum secara perlahan meningkatkan tekanan osmotik medium dan mengurangi ketersediaan air bagi biakan yang sedang tumbuh. Semakin tinggi konsentrasi mannitol, tentu akan semakin terbatas pasokan

air dan nutrisi ke biakan dan hal ini menyebabkan viabilitas biakan terus menurun. Pada dasarnya akumulasi osmoregulator yang berlebihan akan menurunkan aktivitas enzim, konsentrasi ni hampir serupa dengan yang dilaporkan Sarkar dan Naik (1998) bahwa pada media konservasi kentang *in vitro* yang merupakan kombinasi sukrosa dan mannitol, perlakuan konsentrasi mannitol 20 atau 40 g L⁻¹ dapat meningkatkan daya hidup, tetapi pada konsentrasi 60 g L⁻¹ plantlet kentang sangat tercekam dan mengalami kematian. Dari penelitian terdahulu, mannitol pada kisaran konsentrasi 15-40 g L⁻¹ paling banyak digunakan untuk konservasi plasmanutfah tanaman jangka menengah antara lain pada *dioscorea* (Borges *et al.*, 2004), tebu (Sarwar dan Siddiqui, 2004), dan ubi jalar (Purwoko *et al.*, 2000).

Pada umumnya tinggi tunas antar perlakuan paclobutrazol tidak berbeda nyata kecuali pada pengamatan 12 MST dan 16 MST (Tabel 1 dan 3). Tinggi tunas cenderung meningkat pada perlakuan tanpa paclobutrazol maupun dengan paclobutrazol (Tabel 3). Namun demikian, seperti pada perlakuan mannitol, tinggi tunas pada perlakuan paclobutrazol 1, 3, dan 5 mg. L⁻¹ juga selalu lebih pendek dibandingkan kontrol tanpa paclobutrazol (P0). Hal ini disebabkan paclobutrazol merupakan senyawa yang bersifat anti giberelin dimana senyawa ini menghambat pembentukan enzim yang mengkatalis oksidasi ent-kaurene menjadi asam ent-kaurenoat dalam proses biosintesis giberelin (GA).

Tabel 1. Hasil sidik ragam pengaruh perlakuan mannitol atau paclobutrazol terhadap pertumbuhan kultur *in vitro* jeruk besar cv. Nambangan

Waktu Pengamatan (MST)	T(cm)		PD		JT		JA	
	M	P	M	P	M	P	M	P
4	*	tn	**	tn	tn	tn	tn	tn
8	*	tn	**	tn	tn	tn	tn	tn
12	**	tn	**	tn	tn	tn	tn	tn
16	**	tn	**	tn	tn	tn	tn	tn
20	**	tn	**	tn	tn	tn	tn	tn
24	*	tn	**	tn	tn	tn	tn	tn

Keterangan: T= Tinggi, PD= Pertambahan Daun, JT= Jumlah Tunas, JA= Jumlah Akar, M= Mannitol, P= Paclobutrazol, **= berbeda nyata pada uji DMRT dengan taraf nyata 1%, *= berbeda nyata pada uji DMRT dengan taraf nyata 5%, tn= tidak berbeda nyata pada uji DMRT dengan taraf nyata 5%.

Tabel 2. Pengaruh perlakuan mannitol terhadap tinggi tunas (cm) jeruk besar cv. Nambangan *in vitro*

Perlakuan	Umur (MST)					
	4	8	12	16	20	24
M0	1.20 ^a	1.13 ^a	1.19 ^a	1.32 ^a	1.44 ^a	1.49 ^a
M1	0.48 ^b	0.50 ^b	0.50 ^b	0.50 ^b	0.54 ^b	0.65 ^b
M2	0.48 ^b	0.48 ^b	0.48 ^b	0.48 ^b	0.48 ^b	0.54 ^b
M3	0.60 ^b	0.61 ^b	0.61 ^b	0.64 ^b	0.64 ^b	0.90 ^b

Keterangan: Mannitol (M): 0 g L⁻¹ (M0), 20 g L⁻¹ (M1), 40 g L⁻¹ (M2), 60 g L⁻¹ (M3); angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.

Tabel 3. Pengaruh perlakuan paclobutrazol terhadap tinggi tunas (cm) jeruk besar cv. Nambangan *in vitro*

Perlakuan	Umur (MST)					
	4	8	12	16	20	24
P0	1.00	1.03	1.11 ^b	1.14 ^{ab}	1.15	0.85
P1	1.17	1.28	1.42 ^a	1.59 ^a	1.65	1.90
P2	0.79	0.86	0.89 ^b	0.89 ^b	0.92	0.96
P3	1.00	1.12	1.05 ^{ab}	0.98 ^{ab}	1.02	0.81

Keterangan: Paclobutrazol (P): 0 mg L⁻¹ (P0), 1 mg L⁻¹ (P1), 3 mg L⁻¹ (P2), 5 mg L⁻¹ (P3); angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.

Ketika biosintesis GA dihambat, pembelahan sel masih terjadi, tetapi pemanjangan sel tidak terjadi, sehingga tunas dan buku menjadi lebih pendek (Buchanan *et al.*, 2006; Keatmetha *et al.*, 2006). Penelitian Sunarlim *et al.* (2004) pada tanaman gambeli menunjukkan pemberian paclobutrazol sampai dengan konsentrasi 5 mg L⁻¹ berpengaruh nyata terhadap peubah tinggi tanaman pada pengamatan tiga dan enam bulan, sehingga dapat digunakan sebagai media konservasi.

Pertambahan Daun

Pada pengamatan terhadap pertambahan daun, hanya perlakuan kontrol atau tanpa mannitol (M0) yang mengalami pertambahan daun (Tabel 4). Aliran nutrisi yang terhambat akibat cekaman osmotik tampak belum cukup untuk menginduksi pembentukan daun. Hal ini ditunjukkan oleh perlakuan mannitol 20, 40 dan 60 g L⁻¹ yang sama sekali tidak meningkatkan

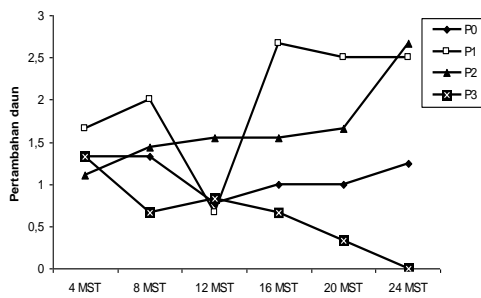
jumlah daun. Namun, pada saat pengamatan 24 MST jumlah daun pada perlakuan kontrol juga mengalami penurunan akibat daun mengalami kerontokan.

Berlawanan dengan perlakuan mannitol, pada perlakuan paclobutrazol pertambahan daun tidak berbeda nyata (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa paclobutrazol tidak mempengaruhi pembentukan daun. Pada perlakuan paclobutrazol 1 dan 3 mg L⁻¹ jumlah daun terus meningkat, sementara pada perlakuan paclobutrazol 5 mg L⁻¹ pertambahan jumlah daun hanya terjadi pada 4 MST yang selanjutnya menurun. Yelnitis dan Bermawie (2001) menemukan hal serupa, yaitu pemberian paclobutrazol 5 mg L⁻¹ pada media konservasi lada menurunkan jumlah daun. Pada penelitian ini saat pengamatan 24 MST semua daun bahkan sudah gugur pada perlakuan paclobutrazol 5 mg L⁻¹ (Gambar 1).

Tabel 4. Nilai rata-rata pertambahan jumlah daun kultivar Nambangan pada media mengandung mannitol (M)

Perlakuan	Pertambahan Jumlah Daun					
	4 MST	8 MST	12 MST	16 MST	20 MST	24 MST
M0	2.00 ^a	1.99 ^a	2.22 ^a	2.44 ^a	2.89 ^a	2.66 ^a
M1	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
M2	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
M3	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b

Keterangan: Mannitol (M): 0 g L⁻¹ (M0), 20 g L⁻¹ (M1), 40 g L⁻¹ (M2), 60 g L⁻¹ (M3); angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.



Keterangan: P0= tanpa paclobutrazol, P1= 1 mg L⁻¹, P2= 3 mg L⁻¹, P3= 5 mg L⁻¹

Gambar 1. Pengaruh paclobutrazol terhadap pertambahan daun jeruk besar cv. Nambangan *in vitro*

Multiplikasi Tunas

Percobaan perlakuan mannitol atau paclobutrazol pada berbagai taraf konsentrasi tidak menunjukkan adanya pengaruh nyata terhadap peubah jumlah tunas (Tabel 1). Tunas baru hanya muncul pada perlakuan mannitol 40 mg L⁻¹ saja (Tabel 5). Charoensub dan Phansiri (2004) mendapatkan bahwa perlakuan mannitol pada konsentrasi 40 dan 60 g L⁻¹ cenderung menurunkan multiplikasi tunas pada biakan *Plumbago indica*.

Pada perlakuan paclobutrazol 1 mg L⁻¹ tunas muncul pada 20 MST sementara pada perlakuan paclobutrazol 3 mg L⁻¹ dan paclobutrazol 5 mg L⁻¹ tunas muncul berturut-turut

pada saat 8 MST dan 12 MST (Tabel 5). Pada 24 MST, walaupun tidak berbeda nyata dengan perlakuan lainnya, tunas terbanyak dihasilkan oleh perlakuan paclobutrazol 1 mg L⁻¹. Syahid (2007) mendapatkan pada kultur temulawak perlakuan paclobutrazol 5 mg L⁻¹ nyata menurunkan pertambahan tunas dibandingkan dengan tanpa paclobutrazol. Namun demikian, pada penelitian Jala dan Bodhipadma (2012) dengan konsentrasi paclobutrazol yang sangat rendah (0.01 mg L⁻¹) ternyata malah menginduksi multiplikasi tunas dan pembentukan planlet pada tanaman hias *Curcuma species* var. *Chattip*.

Pertumbuhan Akar

Pada Tabel 1 diperlihatkan bahwa perlakuan mannitol atau paclobutrazol tidak menunjukkan adanya pengaruh yang nyata terhadap peubah jumlah akar. Tampaknya konsentrasi mannitol (20-60 g L⁻¹) dan paclobutrazol (3-5 mg L⁻¹) menekan pertumbuhan akar.

Tidak ada akar yang tumbuh pada perlakuan mannitol, kecuali pada kontrolnya (M0) saat 16 MST. Perlakuan paclobutrazol menunjukkan bahwa akar hanya muncul di media yang diberi paclobutrazol 1 mg L⁻¹, yaitu pada 8 MST. Namun pada perlakuan paclobutrazol 1 mg L⁻¹ tersebut juga tidak terjadi peningkatan jumlah akar sampai akhir pengamatan pada 24 MST (Tabel 6).

Tabel 5. Nilai rata-rata pertambahan jumlah tunas kultivar Nambangan pada media mengandung mannitol (M) atau paclobutrazol (P)

Perlakuan	Pertambahan Jumlah Tunas					
	4 MST	8 MST	12 MST	16 MST	20 MST	24 MST
M0	0.0	0.0	0.0	0.7	1.2	1.2
M1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
M2	0.0	0.0	0.0	0.3	0.7	0.7
M3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P0	0.3	0.3	0.4	0.7	0.7	0.8
P1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.5
P2	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
P3	0.0	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3

Keterangan: Mannitol (M): 0 g L⁻¹ (M0), 20 g L⁻¹ (M1), 40 g L⁻¹ (M2), 60 g L⁻¹ (M3); Paclobutrazol (P): 0 mg L⁻¹ (P0), 1 mg L⁻¹ (P1), 3 mg L⁻¹ (P2), 5 mg L⁻¹ (P3); angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama di setiap percobaan yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.

Tabel 6. Nilai rata-rata jumlah akar plantlet kultivar Nambangan pada berbagai media perlakuan mengandung mannitol (M) atau paclobutrazol (P).

Perlakuan	Jumlah Akar					
	4 MST	8 MST	12 MST	16 MST	20 MST	24 MST
M0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.3
M1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
M2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
M3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P1	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
P2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Keterangan: Mannitol (M): 0 g L⁻¹ (M0), 20 g L⁻¹ (M1), 40 g L⁻¹ (M2), 60 g L⁻¹ (M3); Paclobutrazol (P): 0 mg L⁻¹ (P0), 1 mg L⁻¹ (P1), 3 mg L⁻¹ (P2), 5 mg L⁻¹ (P3); angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama di setiap percobaan yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.

Penampilan Biakan pada 24 MST

Penampilan biakan kultivar jeruk besar cv. Nambangan *in vitro* merupakan peubah yang diamati secara visual. Perlakuan mannitol pada taraf 20, 40 dan 60 g L⁻¹ menunjukkan ukuran tanaman dan daun yang tidak tampak berbeda, namun pada saat pengamatan 20 MST daun pada perlakuan mannitol 20, 40 dan 60 g. L⁻¹ sudah menguning, bahkan beberapa ada yang gugur.

Mannitol dan polyol lainnya, seperti sorbitol, merupakan gula alkohol yaitu senyawa berkarbon enam (C₆H₁₄O₆) yang juga berfungsi sebagai pengendali osmotik atau osmoregulator (Buchanan *et al.*, 2006). Konsentrasi tertentu dari osmotikum tersebut di media *in vitro* akan meningkatkan osmolaritas media dan menyebabkan aliran nutrisi ke dalam jaringan tanaman terhambat dan menurunkan laju pembelahan sel (Dewietal, 2010). Penghambatan pertumbuhan akibat perlakuan mannitol pada penelitian ini ditunjukkan oleh rendahnya tanaman (Tabel 2) serta tidak munculnya daun (Tabel 4) dan akar (Tabel 6).

Dengan demikian, plantlet jeruk besar cv. Nambangan yang hanya dapat bertahan kurang dari 20 MST (5 bulan) di media konservasi mengandung mannitol harus disubkultur sebelum daun menguning. Hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa penambahan mannitol dengan konsentrasi rendah 2.5 g L⁻¹ pada biakan tanaman buah

pear dapat memperpanjang periode subkultur lebih dari 3 bulan (Ahmed dan Anjum, 2010).

Berbeda dengan penampilan biakan dalam percobaan menggunakan mannitol, pada pengamatan 24 MST penampilan biakan pada percobaan dengan paclobutrazol tampak lebih vigor dengan daun-daun yang hijau. Namun jika dibandingkan dengan kontrol tampak adanya perbedaan ukuran plantlet dan ukuran daun dengan perlakuan paclobutrazol 3 dan 5 mg L⁻¹. Ukuran daun pada kedua konsentrasi tersebut tampak lebih kecil dibandingkan dengan kontrol yang merupakan media tanpa paclobutrazol. Selain itu warna daun tampak semakin hijau seiring dengan peningkatan taraf konsentrasi yang diberikan. Hal ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Keatmetha *et al.* (2006) dimana biakan tunas manggis sudah mengalami pencoklatan (*browning*) pada perlakuan paclobutrazol 2.0 mg L⁻¹.

Retardan memang telah lama diketahui memperlambat terjadinya senesen atau gugur pada daun tetapi mengurangi ukuran daun (Rademacher, 2000). Paclobutrazol memang menghambat pertumbuhan, namun tidak menyebabkan pertumbuhan abnormal, sehingga walaupun ukuran daun mengecil tetapi tetap pertumbuhan daun normal. Yang terjadi pada perlakuan paclobutrazol adalah bertambahnya ketebalan daun akibat terbentuknya lapisan parenkima palisade tambahan, sehingga walaupun ukuran sel-sel mesophyl daun memendek dan diameter mengecil tetapi daun menjadi

lebih padat dan tampak semakin hijau (Nazaruddin *et al.*, 2007). Menurut Keller *et al.* (2006) pada prinsipnya konservasi dengan pertumbuhan minimal menampilkan biakan yang tetap hidup normal, namun dengan ukuran organ yang lebih kecil karena pertumbuhan yang dihambat (*retarded*). Konservasi jangka menengah melalui penghambatan pertumbuhan *in vitro* pada tanaman buah-buahan, seperti tanaman pear, akan berhasil ketika periode subkultur dapat dilakukan minimal dalam 3 bulan (Ahmed dan Anjum, 2010). Hal ini selain menghemat biaya dan mengurangi laju kontaminasi juga akan menghindarkan terjadinya mutasi pada plasma nutfah yang disimpan (Maurie *et al.*, 1998; Keatmetha *et al.*, 2006). Oleh karena itu, berdasarkan pengamatan pada 24 MST (6 bulan) terhadap tinggi tunas, pertambahan tunas dan daun, ketegaran biakan secara visual dan munculnya akar, maka perlakuan paclobutrazol 1 mg L⁻¹ lebih direkomendasikan dibandingkan perlakuan mannitol untuk digunakan sebagai media konservasi jeruk pamelon cv. Nambangan.

KESIMPULAN

Jeruk besar kultivar Nambangan dapat dikonservasi secara *in vitro* dengan menginduksi pertumbuhan minimal melalui pemberian paclobutrazol dan mannitol. Namun, pemberian mannitol tidak direkomendasikan pada media konservasi walaupun mampu untuk menghambat laju pertumbuhan tanaman, karena tanaman cepat mengalami *senescence*. Berdasarkan tinggi tunas, pertambahan tunas dan daun, munculnya akar, serta vigor dan penampilan biakan secara visual, perlakuan paclobutrazol 1 mg L⁻¹ lebih direkomendasikan dibandingkan perlakuan mannitol untuk digunakan sebagai media konservasi jeruk pamelon cv. Nambangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, M., M.A. Anjum. 2010. In vitro storage of some pear genotypes with the minimal growth technique. *Turk J. Agric. For.* 34: 25-32.
- Borges, M., W. Ceiro, S. Meneses, N. Aguilera, J. Vázquez, Z. Infante, M. Fonseca. 2004. Regeneration and multiplication of

Dioscorea alata germplasm maintained in vitro. *J. Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 87-90.

- Buchanan, B.B., W. Gruisem, R.L. Jones. 2006. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA.
- Chaorensu, R., S. Phansiri. 2004. *In vitro* conservation of rose coloured leadwort: Effect of mannitol on growth of plantlets. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 38: 97-102.
- Deguchi, M., Y. Koshita, M. Gao, R. Tao, T. Tetsumura, S. Yamaki, Y. Kanayama. 2004. Engineered sorbitol accumulation induces dwarfism in Japanese persimmon. *J. Plant Physiol.* 161: 1177-1184.
- Dewi, I.S., G. Jawak, I.R. Tambunan, M. Sabda, B.S. Purwoko, W.H. Adil. 2010. Konservasi *in vitro* tanaman jeruk besar (*Citrus maxima*) cv. Srinjanya menggunakan osmotikum dan retardan. *J. Agrobiogen.* 6(2): 84-90.
- Engelmann, F. 1991. In vitro conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica.* 57: 227-243.
- Grout, B.W.W. 1990. In vitro conservation of germplasm, p. 394-411. *In: S.S. Bhojwani (Ed).* *Plant Tissue Culture*. Elsevier Science Publishing Company Inc. New York.
- Jala, A., K. Bodhipadma. 2012. Low concentration of paclobutrazol induced multiple shoot and plantlet formation in amethyst curcuma. *J. KMUTNB.* 22(3): 505-510.
- Keatmetha, W., P. Suksa-Ard, M. Mekanawakul, S. Te-Chato. 2006. *In vitro* germplasm conservation of *Garcinia mangostana* L. and *Lansium domesticum* Corr. *Walailak J. Sci. & Tech.* 3(1): 33-50.
- Keller, E.R.J., A. Senula, S. Leunufna, M. Grube. 2006. Slow growth storage and cryopreservation-tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *Internat. J. Refrigeration* 29: 411-417.

- Malaurie, B., M.F. Trouslot, J. Berthaud, M. Bousalem, A. Pinel, J. Dubern. 1998. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. E-Journal of Biotechnology (EJB). 1(3).
- Nazaruddin, M.R.A., R.M. Fauzi, F.Y. Tsan. 2007. Effects of paclobutrazol on the growth and anatomy of stems and leaves of *Syzigium campanulatum*. J. Trop. For. Sci. 19(2): 86-91.
- Niyomdham, C., 2003. *Citrus maxima* (Burm.) Merr. In Edible Fruits and Nuts, p.128-131. E.W.M. Verheij, R.E. Coronel (Eds.). PROSEA (Plant Resources of South-East Asia) Foundation, Bogor, Indonesia. <http://www.proseanet.org>. [May 19, 2004].
- Paudyal, K.P., N. Haq. 2008. Variation of pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) in Nepal and participatory selection of strains for further improvement. Agroforest Syst. 72: 195-204.
- Pérez, R.M. 2000. Cryostorage of citrus embryonic cultures. p. 687-705. In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 6. S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton (eds), Kluwer Acad. Publ., The Netherlands.
- Purwoko, B.S., I.S. Dewi, N. Susilawati. 2000. Konservasi *in vitro* plasmanutfah ubijalar (*Ipomoea batatas* L.) dengan osmotikum dan retardan. J. Tan. Tropika 3(2): 68-79.
- Rademacher, E. 2000. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathway. Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 51: 501-531.
- Rahayu, A., S. Susanto, B.S. Purwoko, I.S. Dewi. 2012. Perbandingan pola pita isoenzim 15 aksesori pamelon (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) berbiji dan tidak berbiji dan hubungan kekerabatannya. J. Hort. Indonesia 3(1): 42-48.
- Rao, V.R., B. Mal. 2002. Tropical Fruit Species in Asia: Diversity and Conservation Strategies. In: R Drew (ed). Proceedings of The International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits. ISHS Acta Horticulturae. p. 179-90. Cairns, Australia.
- Rao, N.K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African J. Biotech 3: 136-145.
- Sarkar, D., P.S. Naik. 1998. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. Euphytica 102(2): 275-280.
- Sarwar, M., S.U. Siddiqui. 2004. *In vitro* conservation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) germplasm. Pak. J. Bot. 36(3): 549-556.
- Syahid, S.F. 2007. Pengaruh retardan paclobutrazol terhadap pertumbuhan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) selama konservasi *in vitro*. Jurnal Litri 13(3): 93-97.
- Sunarlim, N., A.V. Novianti, I. Rostika. T. 2004. Penyimpanan *in vitro* gembili melalui pertumbuhan minimal. Balai Pusat Penelitian Tanaman Pangan Bogor. hal 267-275. Bogor.
- Susanto, S., H. Sugeru, S. Minten. 2010. Pertumbuhan vegetatif dan generatif batang atas jeruk pamelon 'Nambangan' pada empat jenis interstock. J. Hort. Indonesia. 1(2): 53-58.
- Susilowati, Y.P.C. 2013. Perbaikan keragaan bibit jeruk pamelon (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.). Skripsi. Departemen Agronomi dan Hortikultura. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- West, T.P., M.B. Ravindra, J.E. Preece. 2006. Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments. J. Plant Cell Tissue and Org. Cult. 87, 223-231.
- Yelnitis, N. Bermawie, 2001. Konservasi tanaman lada (*Piper nigrum* L.) secara *in vitro*. Jurnal Litri 7(3): 88-92.