

Produksi Benih Sintetik Hasil Embrio Somatik Tebu (*Saccharum officinarum*) Unggul Bebas Virus

Peneliti : ¹⁾ Dr. Ir. Parawita Dewanti,MP
²⁾ Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto,M.Sc
³⁾ Hardian Susilo Addy,S.P.,M.P.,Ph.D

Mahasiswa terlibat : Fadrian Ramadhan (S1)
Anna Sofyana (S1)
Maisaro (S2)
Choirul Ainiyati (S2)

Sumber Dana : DP2M Dikti (Unggulan Perguruan Tinggi)

¹⁾Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jember
²⁾Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Jember
³⁾Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jember

ABSTRAK

Kualitas dan jumlah bibit merupakan penentu keberhasilan dalam meraih keuntungan di bidang pertanian. Rendahnya produktivitas gula tebu disebabkan karena rendahnya kualitas dan ketersediaan bibit tebu. Teknologi produksi bibit tebu bermutu yang tersedia secara cepat dalam jumlah banyak diperlukan untuk mendukung program swasembada gula. Penyediaan bibit tebu melalui organ vegetatif menggunakan bagal tebu mempunyai kemampuan perbanyak rendah yaitu 1:6 – 1:8. Selain itu memerlukan tenaga dan biaya besar serta berisiko membawa penyakit secara sistemik dari indukannya. Beberapa studi melaporkan bahwa potensi penurunan produksi tebu akibat penyakit virus bisa mencapai lebih dari 50%. Pembuatan benih tebu bebas virus dan pengembangan teknologi embrio somatik merupakan alternatif untuk mendapatkan bibit tebu yang berkualitas. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan bibit tebu bebas virus dan mendapatkan metode pengembangan teknologi embrio somatik.

Penelitian dilaksanakan 3 (tiga) tahun: **tahun pertama**, target yang dihasilkan adalah plantlet tebu bebas virus, yang diperoleh secara *in vitro* menggunakan eksplant tunas apikal dengan perlakuan *chemo* terapi kemudian diaklimatisasi. Konfirmasi bebas virus dilakukan dengan analisa ELISA dan RT-PCR. **Tahun kedua**, target yang dihasilkan adalah metode kultur embrio somatik menggunakan eksplant tebu bebas virus. Embrio somatik terbentuk melalui fase globular, hati, torpedo dan kotiledon. Untuk memastikan keberhasilan terbentuknya embrio somatik dilakukan dengan observasi mikroskopik. Fase kotiledon dibiakan dengan kultur suspensi dengan media pendewasaan embrio untuk menghasilkan plantlet tebu bebas virus. **Tahun ketiga**, target yang dihasilkan adalah benih sintetik dengan jalan enkapsulasi bibit tebu embrio

somatik. Optimasi enkapsulasi dilakukan dengan menentukan konsentrasi natrium alginat, pemilihan zat pengatur tumbuh, waktu simpan dan daya tumbuh benih sintetis.

Hasil penelitian pada tahun pertama adalah: (1) komposisi media terbaik untuk regenerasi eksplan adalah $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ BAP dan $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ GA, (2) konsentrasi antiviral ribavirin 40 ppm mampu menekan pertumbuhan tunas sampai 40%, (3) Hasil uji DAS-ELISA diperoleh tanaman tebu bebas virus SCMV 100% pada konsentrasi ribavirin 40 ppm.

Kata kunci: tebu (*Saccharum officinarum* L.), virus SCMV, antiviral, embrio somatik, benih sintetis (enkapsulasi)

Produksi Benih Sintetik Hasil Embrio Somatik Tebu (*Saccharum officinarum*) Unggul Bebas Virus

Peneliti : ¹⁾ Dr. Ir. Parawita Dewanti,MP
²⁾ Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto,M.Sc
³⁾ Hardian Susilo Addy,S.P.,M.P.,Ph.D

Mahasiswa terlibat : Fadrian Ramadhan (S1)
Anna Sofyana (S1)
Maisaro (S2)
Choirul Ainiyati (S2)

Sumber Dana : DP2M Dikti (Unggulan Perguruan Tinggi)

Kontak email : parawita@yahoo.co.id

Diseminasi: 1. Seminar Nasional dan Agrocomplex Expo 2013, UMM Malang
2. International Conference on Agriculture-ICA 2013, UPN Surabaya

¹⁾Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jember

²⁾Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Jember

³⁾Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jember

Latar Belakang dan Tujuan Penelitian

Tanaman tebu merupakan tanaman penghasil gula utama di Indonesia, akan tetapi produksi gulanya masih belum mencukupi kebutuhan nasional. Penyebab rendahnya produktivitas adalah rendahnya kualitas dan ketersediaan bibit tebu (Jalaja *et al*, 2008). Perbanyakannya menggunakan bagal tebu rawan kontaminasi dan penyebaran penyakit yang disebabkan oleh bakteri maupun virus tebu. Beberapa kajian menunjukkan bahwa serangan penyakit dan virus tebu ini berpotensi menurunkan produksi gula sampai dengan 50%.

Beberapa metoda telah dikembangkan untuk menghilangkan kontaminasi dan penyebaran penyakit dan virus pada bibit tebu. Perlakuan pemanasan (HWT, *hot water treatment*) suhu 53°C selama 10 menit juga dilaporkan dapat mengurangi resiko terserang virus pada bagal tebu (Damayanti *et al*, 2010). Pengalaman di lapang yang dilakukan oleh PTPN XI PG Semboro menunjukkan bahwa perlakuan perendaman bibit

single bud dalam air panas suhu 55°C selama 10-20 menit dapat menghasilkan bibit tebu sehat di kebun *nursery*. Kualitas dan jumlah bibit merupakan penentu keberhasilan dalam meraih keuntungan di bidang pertanian. Pengembangan kultur jaringan untuk produksi bibit tebu sehat bebas penyakit secara cepat dalam jumlah banyak sangat penting untuk meningkatkan produksi gula dan mendukung program swasembada gula.

Teknik kultur jaringan dilaporkan telah berhasil dikembangkan untuk produksi bibit tebu skala komersial. Kultur meristem pucuk untuk mendapatkan bibit tebu bebas virus, telah berhasil dikembangkan oleh Coleman (1970) dan Hendre *et al* (1975).

Teknik benih sintetik (*artificial seed*) yang diartikan sebagai enkapsulasi embrio somatic, meristem pucuk, tunas aksilar atau jaringan meristem lainnya yang digunakan sebagai benih, merupakan salah satu teknik modern untuk dapat memperbanyak benih dalam jumlah besar dan dapat disimpan (Reddy *et al*, 2012). Produksi dan aplikasi benih sintetik telah dilakukan secara luas dalam bidang bioteknologi tanaman seperti perbanyakan klonal secara masal dalam jumlah besar, konservasi plasma nuftah, mempermudah penyimpanan dan transportasi benih (Ravi and Anand, 2012). Kombinasi perlakuan bebas penyakit virus dan teknik pembuatan benih sintetik diharapkan dapat menghasilkan bibit tebu sehat dalam jumlah banyak serta dapat disimpan sehingga memudahkan transportasinya.

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) menghasilkan teknologi pembuatan benih tebu unggul bebas virus, (2) memproduksi bibit tebu bebas penyakit virus dalam jumlah banyak, seragam, bermutu tinggi melalui somatik embriogenesis, (3) menyediakan bibit tebu sintetik dalam jumlah banyak dan dapat disimpan untuk mensubstitusi penyediaan bibit tebu secara konvensional

Metodologi Penelitian yang digunakan

Penelitian dilaksanakan 3 (tiga) tahun: **tahun pertama**, target yang dihasilkan adalah plantlet tebu bebas virus, yang diperoleh dengan perlakuan *chemo* terapi secara *in vitro* menggunakan eksplant tunas apikal, kemudian diaklimatisasi. Konfirmasi bebas virus dilakukan dengan analisa ELISA dan RT-PCR. **Tahun kedua**, target yang dihasilkan adalah metode kultur embrio somatik menggunakan eksplant tebu bebas

virus. Embrio somatik terbentuk melalui fase globular, hati, torpedo dan kotiledon. Untuk memastikan keberhasilan terbentuknya embrio somatik dilakukan dengan observasi mikroskopik. Fase kotiledon dibiakan dengan kultur suspensi dengan media pendewasaan embrio untuk menghasilkan plantlet tebu bebas virus. **Tahun ketiga**, target yang dihasilkan adalah benih sintetik dengan jalan enkapsulasi bibit tebu embrio somatik. Optimasi enkapsulasi dilakukan dengan menentukan konsentrasi natrium alginat, pemilihan zat pengatur tumbuh, waktu simpan dan daya tumbuh benih sintetik.

Prosedur kerja/cara pelaksanaan dalam mencapai tujuan dan keluaran tahun berjalan (termasuk perlakuan, ulangan, jumlah sample, metode analisis) waktu pelaksanaan dan lokasi kegiatan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Rincian perlakuan, rancangan dan tempat penelitian masing-masing percobaan, keluaran dan tahun keluaran direncanakan

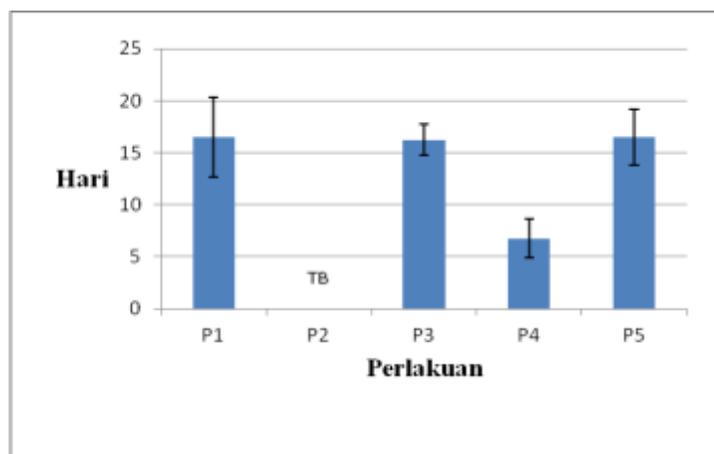
Percobaan	Perlakuan	Rancangan dan Tempat	Keluaran dan Tahun
Tahun I: Kultur in vitro tunas apikal untuk menghasilkan plantlet tebu bebas virus dengan perlakuan thermo dan chemo terapi	H: hot water treatment (HWT), 55°C dan kontrol C: chemoterapi, konsentrasi ribavirin (0, 10, 20, 30 dan 40 ppm)	RAL faktorial 2x5=10, 3 ulangan Lokasi: lab. Biologi Dasar MIPA, lab. Kuljar jur. Agronomi UNEJ	<ul style="list-style-type: none"> • Plantlet tebu bebas virus (2013) • Jurnal nasional terakreditasi • Poster • Lulusan 2 mahasiswa S1
Tahun II: Kultur embrio somatik tebu menggunakan eksplan tebu bebas virus	Konsentrasi 2,4D (0,1,2,3 ppm) yang dikombinasikan dengan: a. konsentrasi BAP (0,1, 1.5, 2 ppm) b. konsentrasi thidiazuron (0, 0.5, 1, 1.5 ppm) c. konsentrasi 2ip (0, 1,2,3 ppm)	RAL faktorial 4x4=16, 3 ulangan Lokasi: lab. Biologi Dasar MIPA, lab. Kuljar jur. Agronomi dan CDAST UNEJ	<ul style="list-style-type: none"> • Teknik regenerasi embrio somatik tebu bebas virus yang efisien (2014) • Poster • Jurnal nasional terakreditasi • Lulusan 1 mahasiswa S1 dan S2
Tahun II: Pembuatan benih sintetik dengan jalan enkapsulasi bibit tebu embrio	Konsentrasi natrium alginat : (1,2,3,g/l) Konsentrasi zpt: (auxin: sitokinin)	RAL faktorial 3x3, 3 ulangan. Lokasi: lab CDAST UNEJ	<ul style="list-style-type: none"> • Bibit tebu sintetik bebas virus (enkapsulasi)

somatik	(1:1, 1:2, 2:1)		(1015) <ul style="list-style-type: none"> • Jurnal nasional terakreditasi • Poster dan buku • Lulusan 1 mahasiswa S1 dan S2
---------	-----------------	--	---

Hasil dan Pembahasan

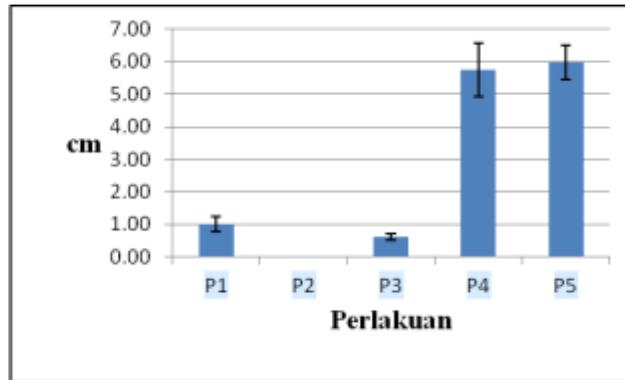
Persiapan Eksplan Tanaman Tebu *in vitro*

Eksplan yang ditanam secara *in vitro* berasal dari tunas axilar tebu varietas BL dan tebu transgenik overekspresi *SoSUTI*. Eksplan ditanam pada beberapa media cair dengan beberapa perlakuan komposisi media yaitu: P1 (tanpa zat pengatur tumbuh); P2 (0,5 mg^l⁻¹ 2,4-D dan 1,5 mg^l⁻¹ BAP); P3 (0,5 mg^l⁻¹ 2,4-D dan 0,1 mg^l⁻¹ GA₃); P4 (1,5 mg^l⁻¹ BAP dan 0,1 mg^l⁻¹ GA₃); dan P5 (0,1 mg^l⁻¹ GA₃).



Gambar 1. Kecepatan pertumbuhan tunas tebu pada beberapa komposisi media

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan zpt yang berbeda sangat berpengaruh terhadap kecepatan bertunas. Media P4 (1,5 mg^l⁻¹ BAP dan 0,1 mg^l⁻¹ GA₃) merupakan media terbaik terhadap kecepatan bertunas yaitu 6,75 hari setelah tanam (gambar 1). Pemberian zpt dari golongan sitokinin dan giberelin menyebabkan adanya pertumbuhan sel-sel penyusun tunas secara maksimal sehingga tunas lateral yang ditanam mampu bertunas dengan cepat.

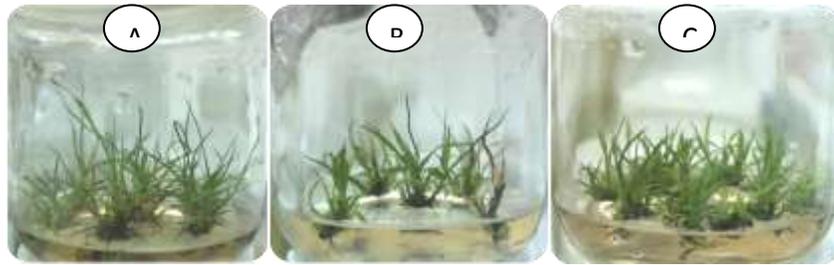


Gambar 2. Pertumbuhan tinggi tunas tebu pada beberapa komposisi media

Pengamatan tinggi tunas pada beberapa komposisi media menunjukkan bahwa komposisi media P4 dan P5 menghasilkan tinggi tunas masing-masing 5,75 dan 5,98 cm pada minggu ke 12 (gambar 2). Komposisi media P4 dan P5 mengandung giberellin yang sangat berpengaruh terhadap pemanjangan batang, berbeda pada komposisi media P2 dan P3 yang mengandung 2,4D. Pemberian 2,4 D mengakibatkan tunas mengalami stagnasi bahkan mengalami kematian karena banyak mengandung phenol.

Tunas hanya mampu tumbuh pada komposisi media P4 dan P5, sedangkan pada P1, P2 dan P3 tidak mampu membentuk tunas. Rata-rata jumlah tunas pada komposisi media P4 mampu menghasilkan jumlah tunas sebanyak 41, sedangkan komposisi media P5 hanya menghasilkan menghasilkan 13,75 tunas.

Mengacu pada metode perbanyakan diatas, maka dilakukan penanaman eksplan tebu varietas BL dan tebu transgenik event 2 dan even 20. Hasil perbanyakan dapat dilihat pada gambar 3. Dari hasil perbanyakan diperoleh tunas tebu transgenik even 2 sebanyak 56 tunas, even 20 sebanyak 76 tunas dan tebu non transgenik varietas BL sebanyak 109 tunas, masing-masing berasal dari 3 botol kultur. Tunas yang diperoleh disubkultur pada media MS dengan penambahan beberapa konsentrasi antiviral ribavirin yaitu 0 ppm, 25 ppm dan 50 ppm. Kriteria tunas yang siap disubkultur dalam media ribavirin dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 3. Plantlet tebu transgenik even 2 (A) , even 20 (B) dan tebu non transgenik varietas BL (C)

Pertumbuhan plantlet pada media Antiviral

Pemberian antiviral ribavirin pada media kultur jaringan dengan konsentrasi berbeda yaitu 0 ppm (R0), 25 ppm (R1) dan 50 ppm (R2) diharapkan dapat menekan kandungan partikel virus dalam jaringan tanaman tebu. Hasil penelitian Sidwell *et.al.*, (1972) menjelaskan bahwa, Ribavirin merupakan analog guanosisin, sehingga dapat mengganggu biosintesis dari guanosisin 5'- fosfat. Terganggunya biosintesis guanosisin 5'- fosfat dapat mengakibatkan terganggunya sintesis RNA dan DNA dalam sel yang terinfeksi. Terhambatnya sintesis RNA dan DNA pada sel yang mengandung ribavirin otomatis akan menghambat replikasi RNA dari virus yang berada dalam jaringan terinfeksi.

Pertumbuhan plantlet tebu pada media ribavirin menunjukkan perbedaan dalam multiplikasi tunas. Pada plantlet yang ditanam pada media dengan ribavirin menunjukkan pertumbuhan yang lebih lambat dibandingkan kontrol. Hal ini membuktikan bahwa ribavirin dapat mengakibatkan fitotoksin pada tanaman. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pemberian ribavirin dengan konsentrasi 40 ppm mengakibatkan multiplikasi tanaman lebih lambat dibandingkan 20 ppm (gambar 5).



Gambar 5. Pertumbuhan tunas tebu in vitro pada beberapa konsentrasi ribavirin (a) 0 ppm (b) 20 ppm dan (c) 40 ppm

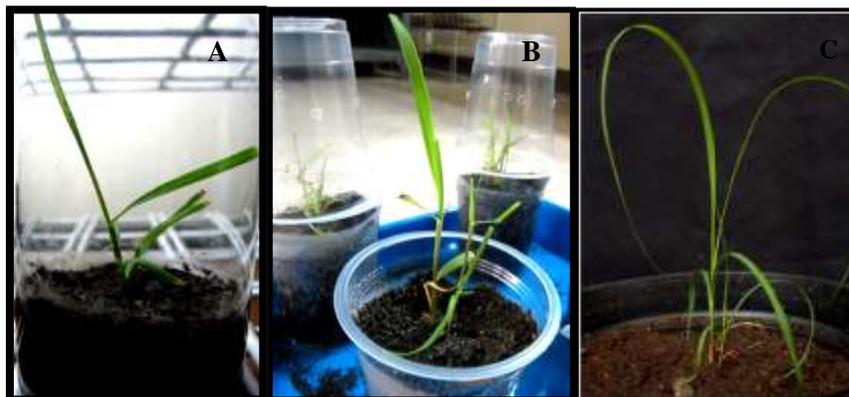
Ribavirin dapat mengurangi bahkan menghambat kegiatan sel pada tanaman bahkan kemungkinan dapat mempengaruhi sintesis RNA pada sel tanaman tergantung dari seberapa besar konsentrasi ribavirin yang digunakan. Konsentrasi ribavirin yang berbeda juga mempengaruhi persentase eksplan bertunas, jumlah tunas dan panjang tunas, data bisa dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi ribavirin terhadap persentase eksplan bertunas, jumlah tunas dan panjang tunas

Konsentrasi ribavirin (ppm)	Persentase eksplan bertunas (%)	Jumlah tunas	Panjang tunas (cm)
0	100	42,4	7,8
20	65	10,2	5,6
40	40	7,3	3,9

Aklimatisasi plantlet tebu

Aklimatisasi dilakukan pada plantlet tebu yang sudah diterapi dengan antiviral. Media aklimatisasi yang digunakan adalah komposisi tanah, pasir, kompos dengan perbandingan 1: 1:1. Aklimatisasi bertujuan agar plantlet atau tanaman *in vitro* dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan luar. Hal itu dikarenakan tanaman *in vitro* masih dalam keadaan rentan terhadap kondisi lingkungan, terutama suhu dan kelembaban udara (Husni *et al.*, 1994). Hasil aklimatisasi dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Perkembangan tanaman tebu hasil aklimatisasi pada umur tanaman yang berbeda (A) 7 hst, (B) 14 hst dan (C) 28 hst

Analisis serologi dengan metode ELISA yang dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan ribavirin dapat dilihat pada tabel 3,4 dan 5. Nampak bahwa sebelum perlakuan ribavirin bibit tebu mengandung virus (tabel 3). Hasil uji ELISA pada tunas tebu setelah perlakuan ribavirin 40 ppm menghasilkan tanaman bebas virus 100% (tabel 4 dan 5).

Tabel 3 Hasil uji ELISA pada tebu even 2 dan 20 sebelum perlakuan ribavirin

SAMPEL	ABSORBANSI	TERTINGGI	TERENDAH	CUT OFF	Interpretasi
2.1	0.096 ± 0.011	0.106	0.085	0.083	Positif
2.2	0.082 ± 0.002	0.084	0.079	0.083	Positif
2.3	0.096 ± 0.007	0.103	0.089	0.083	Positif
20.1	0.104 ± 0.025	0.129	0.079	0.083	Positif
20.2	0.094 ± 0.004	0.098	0.090	0.083	Positif
20.3	0.089 ± 0.009	0.097	0.079	0.083	Positif

Tabel 4 Hasil uji ELISA pada tebu even 2 setelah perlakuan ribavirin

Sampel	Absorbansi	Tertinggi	Terendah	Cut off	Interpretasi	% bebas virus
2.0-1	0.126±0.005	0.131	0.121	0.156	Negatif	
2.0-2	0.206±0.032	0.239	0.174	0.279	Negatif	
2.0-3	0.208±0.016	0.224	0.192	0.279	Negatif	80
2.0-4	0.233±0.024	0.257	0.209	0.279	Negatif	
2.0-5	0.306±0.018	0.324	0.287	0.290	Positif	
2.20-1	0.138±0.002	0.141	0.136	0.143	Negatif	
2.20-2	0.175±0.006	0.181	0.169	0.279	Negatif	
2.20-3	0.192±0.029	0.221	0.163	0.279	Negatif	80
2.20-4	0.228±0.041	0.269	0.187	0.279	Negatif	
2.20-5	0.291±0.021	0.312	0.270	0.279	Positif	
2.40-1	0.135±0.004	0.139	0.131	0.143	Negatif	
2.40-2	0.143±0.009	0.153	0.134	0.143	Negatif	
2.40-3	0.213±0.018	0.231	0.195	0.279	Negatif	100
2.40-4	0.208±0.034	0.242	0.174	0.179	Negatif	
2.40-5	0.260±0.003	0.263	0.257	0.290	Negatif	

Tabel 5 Hasil uji ELISA pada tebu even 20 setelah perlakuan ribavirin

Sampel	Absorbansi	Tertinggi	Terendah	Cut off	Interpretasi	% bebas virus
20.0-1	0.298±0.052	0.351	0.246	0.279	Positif	
20.0-2	0.273±0.024	0.297	0.246	0.279	Positif	
20.0-3	0.269±0.015	0.283	0.254	0.279	Positif	40
20.0-4	0.271±0.006	0.276	0.265	0.290	Negatif	
20.0-5	0.266±0.006	0.272	0.261	0.290	Negatif	
20.20-1	0.262±0.058	0.320	0.205	0.279	Positif	
20.20-2	0.260±0.030	0.290	0.229	0.279	Positif	
20.20-3	0.264±0.005	0.269	0.259	0.290	Negatif	60
20.20-4	0.261±0.004	0.265	0.257	0.290	Negatif	
20.20-5	0.265±0.005	0.269	0.259	0.290	Negatif	
20.40-1	0.138±0.004	0.142	0.134	0.143	Negatif	
20.40-2	0.145±0.004	0.149	0.140	0.203	Negatif	
20.40-3	0.117±0.008	0.125	0.109	0.203	Negatif	100
20.40-4	0.127±0.012	0.139	0.116	0.203	Negatif	
20.40-5	0.136±0.004	0.139	0.131	0.143	Negatif	

Simpulan akhir dari hasil penelitian

Hasil penelitian pada tahun pertama adalah: (1) komposisi media terbaik untuk regenerasi eksplan adalah 1,5 mg^l⁻¹ BAP dan 0,1 mg^l⁻¹ GA, (2) konsentrasi antiviral ribavirin 40 ppm mampu menekan pertumbuhan tunas sampai 40%, (3) Hasil uji DAS-ELISA diperoleh tanaman tebu bebas virus SCMV 100% pada konsentrasi ribavirin 40 ppm.

Kata kunci: tebu (*Saccharum officinarum* L.), virus SCMV, antiviral, embrio somatik, benih sintetik (enkapsulasi)

Referensi

- Coleman, R.E. 1970. New plants produced from callus tissue culture. In: *Sugarcane Research*. 1970 Report. U.S.Dept. Agric. Res. Serv. Pl. Sci. Res. Div. P. 38.
- Damayanti, Tri Asmira; Lilik K. Putra and Giyanto. 2010. Hot Water Treatment of cutting-cane infected with sugarcane streak mosaik virus (SCSMV). *Journal ISSAAS* Vol.16 No.2:17-25.
- Hendre, R.R., R.S. Iyyar, M. Katwal, S.S. Khuspe and A.F. Mascarenhas. 1983. Rapid multiplication of sugarcane through tissue culture. *Sugarcane*. **1**: 5-7

- Jalaja, N.C, D. Neelamathi and T.V Sreenivasan. 2008. Micropropagation for Quality Seed Production in Sugarcane in Asia and the Pacific. United Nations : FAO, APCoAB and APAARI.
- Ravi, D., and P. Anand. 2012. Production and application of artificial seeds : a review. *International Research Journal of Biological Sciences* Vol 1(5) : 74-78.
- Reddy, Ch.V Subba and P. Sreenivasulu. 2011. Generation of sugarcane streak mosaik virus-free sugarcane (*Saccharum spp* hybrid) from infrected plants by in vitro meristem tip culture. *European Journal of Plant Pathology* 130:597-604.