

## INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.) VARIETAS NXI 1-3

### *Induction of Embryogenic Callus of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Variety NXI 1-3*

Firdha Narulita Alfian<sup>1</sup>, Didik Pudji Restanto<sup>1,2</sup>, dan Sigit Soeparjono<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember (UNEJ)

<sup>2</sup>Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST), Universitas Jember (UNEJ)

Jln. Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto, Jember 68121

\*E-mail : parawita@yahoo.co.id

#### ABSTRACT

*Somatic embryogenesis is considered for in-vitro plant propagation because of its advantages. Somatic embryogenesis is divided into two ways, direct and indirect somatic embryogenesis. Indirect somatic embryogenesis had a higher percentage result which is mostly stimulated by induction of embryogenic callus. Plant growth regulator (PGR) was the most influencing factor for development of embryogenic callus become somatic embryo. Auxin plays a very important role to induct the embryogenic callus whics is 2,4-D is the most common synthetic auxin used in in-vitro plant propagation. The objective of this study is to find a method for rapid micropropagation of commercial sugarcane cultivar NXI 1-3 through Somatic Embryogenesis (SE). The experiment was conducted at the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology Division of CDAST, University of Jember from September 2014 to February 2015. Leaf rolls isolated from 6 months healthy field cultivated sugarcane was cultured on MS medium (IK1, IK2, IK3) containing 2,4-D (0, 3, and 4 ppm) with Casein Hydrolisate (300 ppm) to induce embryogenic callus. Experiment using Completely Randomized Design sigle factor (different level of plant growth regulator) followed by Duncan's multiple range test (DMRT) level 5% in callus induction stage and orthogonal contrast in callus regeneration stage. The results of DMRT showed that IK3 yielded the best respond to embryogeniccallus induction in medium containing 2,4-D 4ppm and Casein Hydrolisate 300 ppm.*

**Keywords:** *Somatic Embryogenesis, Embryogenic Callus, Sugarcane, Variety XI 1-3*

#### ABSTRAK

Embriogenesis somatik sangat dipertimbangkan untuk perbanyakan tanaman secara in-vitro karena beberapa keuntungannya. Embriogenesis somatik terbagi menjadi dua jalur yaitu secara langsung dan tidak langsung. Embriogenesis somatik secara tidak langsung memiliki presentase hasil yang lebih tinggi dan sangat dipengaruhi keberhasilannya oleh pembentukan kalus embriogenik. Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan faktor yang paling mempengaruhi perkembangan kalus embriogenik menjadi embrio somatik. Auksin mempunyai peran penting untuk menginduksi kalus dimana 2,4-D merupakan auksin yang paling banyak digunakan dalam perbanyakan tanaman secara in-vitro. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan metode mikropropagasi yang cepat untuk tebu varietas unggul NXI 1-3 melalui embriogenesis somatik. Penelitian dilakukan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, CDAST Universitas Jember dari September 2014 hingga Februari 2015. Gulungan daun diisolasi dari tanaman tebu yang sehat dan berumur 6 bulan yang berasal dari lapang kemudian ditumbuhkan pada media MS (IK1, IK2, IK3) yang mengandung 2,4-D (0,3, dan 4 ppm) dengan Casein Hydrolisate (300 ppm) untuk menginduksi kalus embriogenik. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor (perbedaan level zat pengatur tumbuh) dilanjutkan dengan uji berjarak Duncan (DMRT) level 5%. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa perlakuan terbaik terhadap respon induksi kalus embriogenik didapatkan dari perlakuan media IK3 yang mengandung 2,4-D 4 ppm dan Casein Hydrolisate 300 ppm.

**Kata kunci:** *Embriogenesis Somatik, Kalus Embriogenik, Tebu, Varietas NXI 1-3*

**How to cite:** Alfian F N, DP Resanto, S Soeparjono. 2015. Induksi kalus embriogenik tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) varietas NXI 1-3. *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1): xx-xx

#### PENDAHULUAN

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan salah satu tanaman perkebunan penting di Indonesia karena dapat mendatangkan keuntungan bagi aspek ekonomi yaitu sebagai sumber devisa negara, juga dapat menyerap banyak tenaga kerja dalam proses budidayanya sehingga dapat menjadi sumber pendapatan masyarakat (Sukmadjaja dan Mulyana, 2011). Gula merupakan produk utama yang dihasilkan dari tanaman tebu tersebut dan telah menjadi kebutuhan pokok dan sumber kalori bagi masyarakat serta penting peranannya dalam bidang industri dalam negeri. Saat ini hal tersebut masih menjadi masalah karena kebutuhan gula yang terus meningkat tidak diimbangi dengan produksi dalam negeri yang memadai.

Tanaman tebu (*S. officinarum* L.) terus mengalami perkembangan baik dengan cara perbanyakan maupun perbanyakan mutu varietas yang dihasilkan. Pengembangan varietas terus dilakukan untuk meningkatkan mutu dan dalam upaya untuk memenuhi produksi dalam negeri. Keunggulan tanaman tebu varietas NXI 1-3 antara lain memiliki produktivitas yang tinggi, mempunyai daya tahan keprasan, dan mampu beradaptasi terhadap lingkungan dengan mudah, masih dapat berproduksi baik meski ditanam pada lahan tegalan sekalipun (Rasullah *et al.*, 2013; Remita *et al.*, 2013).

Semakin majunya ilmu pengetahuan dan teknologi saat ini memungkinkan untuk menambah kemajuan pula dalam metode budidaya tanaman tebu. Metode kultur jaringan merupakan metode budidaya tanaman yang banyak digunakan saat ini.

Metode perbanyakan ini bekerja dalam tingkat sel maupun jaringan. Yaitu dengan cara memperbanyak atau menumbuhkan sel dengan kondisi lingkungan yang aseptik dan terkontrol. Metode ini semakin berkembang sejak diketahuinya teori bahwa tanaman memiliki totipotensi sel, yaitu kemampuan setiap sel tanaman untuk dapat tumbuh dan berkembang menjadi satu tanaman baru yang utuh dalam kondisi lingkungan yang mendukung. Metode kultur jaringan dipercaya dapat menghasilkan tanaman baru termasuk dalam bentuk bibit dalam waktu yang relatif cepat, mampu memproduksi dalam skala besar, menghasilkan tanaman yang terbebas dari hama dan penyakit, serta mampu mengembangkan tanaman dengan sifat baru. Salah satu metode kultur jaringan yang saat ini banyak digunakan yaitu dengan menginduksi embriogenesis somatik (SE) untuk memperoleh bibit tebu yang terbebas dari penyakit dengan jumlah tinggi dan dalam waktu yang relatif cepat. Metode embriogenesis somatik telah banyak dilaporkan keberhasilannya pada beberapa tanaman seperti tebu (Silva *et al.*, 2014).

Embriogenesis somatik merupakan perkembangan sel-sel somatik (yaitu sel-sel tubuh seperti batang, daun, dan lainnya baik haploid maupun diploid) menjadi tumbuhan dengan membentuk embrio namun tanpa melalui fase menyatunya gamet (Suprasanna *et al.*, 2005). Embriogenesis somatik terbagi menjadi dua jalur yaitu secara langsung dan tidak langsung. Embriogenesis somatik secara langsung terbentuk tanpa melewati fase pengkalusan, sedangkan embriogenesis somatik secara tidak langsung terbentuk melalui fase pengkalusan (Percy *et al.*, 2000). Williams dan Maheswaran (1986) menyebutkan bahwa biasanya hanya sejumlah kecil embrio somatik yang berhasil didapatkan melalui embriogenesis somatik secara langsung. Namun berbeda dengan embriogenesis somatik secara tidak langsung, hasil embrio somatik tinggi telah dilaporkan pada embriogenesis somatik secara tidak langsung. Perkembangan embriogenesis somatik terbagi menjadi dua tahap utama, yaitu diferensiasi sel somatik menjadi sel kompeten embriogenik kemudian berproliferasi sebagai sel embriogenik. Fase utama kedua yaitu sel embriogenik tersebut menunjukkan kompetensi embriogeniknya dan berdiferensiasi menjadi embrio somatik (Jimenez, 2001). Keberhasilan embriogenesis somatik tidak langsung dapat tercapai dengan terbentuknya kalus embriogenik.

Sel-sel kalus yang bersifat embriogenik yaitu kalus yang dapat berkembang menjadi embrio somatik setelah kalus tersebut ditransfer ke dalam medium yang sesuai (Rusdianto dan Indrianto, 2012). Kalus embriogenik dicirikan dengan struktur kalus kering, berwarna putih susu atau krem dan berstruktur remah, sedangkan kalus non embriogenik dicirikan dengan struktur kalus kompak, basah, berwarna bening kecokelatan. Penelitian ini bertujuan untuk menginduksi kalus embriogenik pada eksplan tanaman tebu varietas NXI 1-3 yang berasal dari lapang.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Bioteknologi dan Biologi Molekuler, *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember dimulai pada bulan September 2014 hingga Februari 2015.

Pelaksanaan percobaan dilakukan dengan beberapa tahap meliputi :

**Persiapan Eksplan dan Media.** Bagian *spindle leaf* pada pucukan tanaman tebu (*S. officinarum* L.) varietas NXI 1-3 yang sehat dan berumur 6 bulan dari lapang digunakan sebagai eksplan. Eksplan ditumbuhkan pada media uji yaitu media dasar MS dengan dan tanpa penambahan ZPT. Terdapat 3 macam media yang digunakan dengan perbedaan taraf 2,4-D yang berbeda yaitu 0, 3, dan 4 ppm dengan penambahan Casein

Hydrolisate 300 ppm, yang disebut secara berurutan media IK1, IK2, dan IK3.

**Penanaman Eksplan.** Penanaman eksplan dilakukan secara aseptis. Pucukan tanaman tebu dibersihkan dan disterilisasi dengan menggunakan alkohol kemudian dibawa ke dalam laminar. Sebelum mengisolasi *spindle leaf*, pucukan dipanaskan di atas api bunsen untuk meminimalisir kontaminan. Pucukan tebu dikelupas hingga mencapai diameter 5 mm lalu diiris tipis dengan ketebalan  $\pm$  2 mm dan diameter 5 mm dan ditanam pada media. Eksplan diletakkan pada kondisi suhu kultur 23°-25°C pada ruang gelap.

**Induksi Kalus Embriogenik.** Induksi kalus embriogenik berlangsung selama 6 minggu masa kultur sejak penanaman. Selama masa kultur tersebut dilakukan subkultur setiap 3 minggu sekali. Kalus yang terbentuk diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis yaitu untuk parameter pengamatan waktu terbentuknya kalus dan presentase terbentuknya kalus. Sedangkan pengamatan secara mikroskopis ditujukan untuk mengamati perkembangan morfologi kalus menjadi embriogenik. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor dengan 6 kali ulangan. Analisis diteruskan dengan menggunakan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) apabila terdapat perbedaan nyata setelah ANOVA.

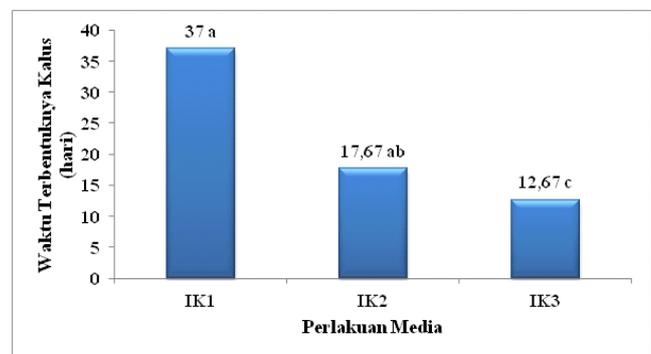
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan media terhadap parameter waktu terbentuknya kalus dan presentase terbentuknya kalus tanaman tebu varietas NXI 1-3 menghasilkan nilai yang berbeda sangat nyata (Tabel 1).

**Tabel 1.** Hasil analisis ragam pada parameter waktu terbentuknya kalus, dan presentase terbentuknya kalus.

Parameter	Nilai F-Hitung
Waktu terbentuknya kalus	45,5 **
Presentase terbentuknya kalus	49,6 **

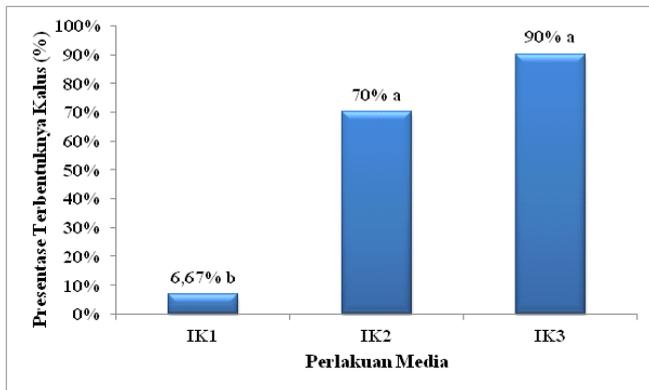
Analisis ragam dilanjutkan dengan uji *Duncan* dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil uji *Duncan* pada Gambar 1 menunjukkan bahwa perlakuan IK3 menghasilkan kalus dengan waktu tercepat yang ditunjukkan dengan hasil notasi yang berbeda pada hasil akhirnya serta memiliki nilai rata-rata terendah. Sedangkan perlakuan IK2 dan IK1 (kontrol) masih memiliki notasi yang sama yang menunjukkan bahwa hasil keduanya berbeda tidak nyata. Perlakuan IK1 menunjukkan hasil rata-rata waktu induksi kalus terlama dari seluruh perlakuan.



**Gambar 1.** Grafik hasil uji *Duncan* dengan taraf kepercayaan 95% terhadap waktu terbentuknya kalus pada media IK1 (kontrol), IK2 (MS + 2,4-D 3 ppm + 300 ppm

Casein Hydrolyisate), dan IK3 (MS + 2,4-D 4 ppm + 300 ppm Casein Hydrolyisate).

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa respon pertumbuhan terbaik adalah pada perlakuan IK3 dengan presentase kalus yang terbentuk mencapai 90%. Pemberian notasi berdasarkan hasil uji *Duncan* dengan tingkat kepercayaan 95% menyatakan bahwa perlakuan media IK3 berbeda sangat nyata dibandingkan dengan perlakuan media IK1 dan tidak berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan media IK2.

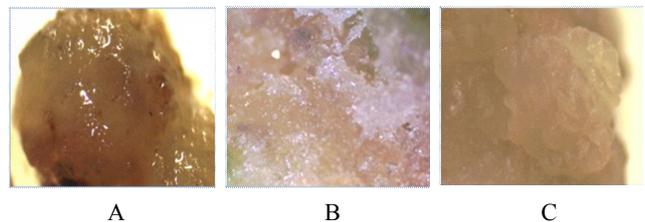


**Gambar 2.** Grafik hasil uji *Duncan* dengan taraf kepercayaan 95% terhadap presentase terbentuknya kalus pada media IK1 (kontrol), IK2 (MS + 2,4-D 3 ppm + 300 ppm Casein Hydrolyisate), dan IK3 (MS + 2,4-D 4 ppm + 300 ppm Casein Hydrolyisate).

Perlakuan media IK3 menunjukkan hasil terbaik dari dua parameter pengamatan yang digunakan, yaitu untuk waktu terbentuknya kalus dan presentase terbentuknya kalus. Perlakuan media IK3 menggunakan auksin pada konsentrasi yang tinggi yaitu 4 ppm serta dengan penambahan senyawa organik berupa Casein Hydrolyisate sebesar 300 ppm. Zat pengatur tumbuh dari golongan auksin berupa 2,4-D merupakan jenis auksin yang paling banyak digunakan untuk menginduksi kalus pada tanaman famili Gramineae (Lee *et al.*, 2011) termasuk tanaman tebu. Senyawa 2,4-D berperan dalam memacu *hipermethylasi* pada DNA, sehingga pembelahan sel selalu dalam fase mitosis, dengan demikian maka pembentukan kalus menjadi optimal (Meneses *et al.*, 2005). Kalus pertama kali muncul pada bagian yang terpotong atau terluka. Bagian tersebut menyerap lebih banyak nutrisi yang mengarah pada pembelahan sel yang lebih cepat kemudian disusul dengan pembentukan kalus (Gill *et al.*, 2004). Kalus tersebut berkembang menurut potensi sel yang dimilikinya masing-masing. Sehingga dalam *clump* kalus yang sama dapat saja memiliki potensi perkembangan dan diferensiasi yang berbeda-beda. Kalus yang mudah diregenerasikan adalah kalus yang bersifat embriogenik. Pada Gambar 3 ditampilkan hasil pengamatan morfologi kalus yang dihasilkan pada akhir masa kultur. Terdapat dua jenis kalus berdasarkan kemampuan beregenerasinya yaitu kalus non embriogenik dan kalus embriogenik.

Kalus non embriogenik ditunjukkan pada Gambar 3A dengan kenampakan luar kalus yang berwarna kecokelatan dan basah. Adanya peristiwa browning atau jaringan kalus yang berubah warna menjadi kecokelatan hingga gelap akan menghambat penyerapan nutrisi oleh eksplan, hal tersebut menyebabkan penurunan proses pengkalusan. Pada saat tanaman terluka, seperti selama proses pemotongan gulungan daun, zat fenolik yang sebagian besar berada di vakuola, akan tercampur dengan isi dari plastida dan organel-organel lainnya oleh karena hal tersebut warna gelap muncul. Peristiwa tersebut akan

menghambat aktivitas enzim dan dapat menyebabkan kematian baik pada eksplan dan juga media (Gill *et al.*, 2004). Sedangkan pada Gambar 3B merupakan fase peralihan sebelum kalus menjadi embriogenik. Kalus yang terbentuk telah terlihat berpotensi untuk menjadi embriogenik. Gambar 3C merupakan morfologi dari kalus yang bersifat embriogenik. Hal tersebut ditunjukkan dengan ciri-ciri kalus embriogenik yang berwarna bening kekuningan, kering, remah, dan mengkilap. Kalus yang termasuk embriogenik akan lebih mudah untuk meregenerasikannya melalui embriogenesis somatik.



**Gambar 3.** Hasil pengamatan morfologi kalus embriogenik dan kalus non embriogenik secara mikroskopis pada akhir masa kultur induksi kalus (A = kalus non embriogenik, B = pre embryo mass, C = kalus embriogenik).

Pengamatan morfologi menjadi salah satu faktor penting dalam penelitian ini. Morfologi kalus yang ada diamati untuk kemudian dilaporkan. Kalus yang bersifat embriogenik memiliki beberapa ciri tertentu diantaranya berwarna putih bening hingga bening kekuningan, tampak mengkilap (*glossy*), serta mempunyai struktur remah. Sedangkan kalus yang tidak bersifat embriogenik dicirikan dengan warnanya yang putih susu hingga kuning kecokelatan, tampak basah dan lembek, serta memiliki struktur kalus yang kompak sehingga sulit untuk berdiferensiasi (Alcantara, *et al.*, 2014).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil induksi kalus embriogenik didapatkan kesimpulan bahwa perlakuan terbaik untuk menginduksi kalus embriogenik dengan presentase tinggi mencapai 90% dan waktu tercepat yang hanya membutuhkan 12,67 hari, didapatkan dari perlakuan media MS dengan penambahan 4 ppm 2,4-D dengan 300 ppm Casein Hydrolyisate. Berdasarkan hasil pengamatan morfologi secara mikroskopis telah diketahui bahwa terdapat kalus embriogenik dalam induksi kalus embriogenik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alcantara GBD, R Dibax, RAD Oliveira, JCB Filho and E Daros. 2014. *Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (Saccharum spp.) cultivars RB855156 and RB72454*. *Acta Scientiarum Agronomy Maringa* 36(1):63-72.
- Gill NK, R Gill and SS Gosal. 2004. *Factors enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (Saccharum officinarum L.)*. *Indian Journal of Biotechnology* 3:119-123.
- Jimenez VM. 2001. *Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones*. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13(2):196-223.
- Lee KW, O Chinzorig, GJ Choi, KY Kim, HC Ji, HS Park, WH Kim and SH Lee. 2011. *Factors influencing callus*

*induction and plant regeneration of dahurian wildrye grass (Elymus dahuricus L.). African Journal of Biotechnology* 11(4):815-820.

Meneses A, D Flores, M Munoz, G Arrieta and AM Espinosa. 2005. *Effect of 2,4-D, hydric stress and light on indica rice (Oryza sativa) somatic embryogenesis. Rev Biol Trop (Int J)* 53(3-4):361-368.

Percy RE, K Klimaszweska and DR Cyr. 2000. *Evaluation of Embryogenesis Somatic for Clonal Propagation of Western White Pine*. NRC Research Press. Canada.

Rasullah FFF, T Nurhidayati dan Nurmalasari. 2013. Respon pertumbuhan tunas kultur meristem apikal tebu (*Saccharum officinarum*) varietas NXI 1-3 secara *in-vitro* pada media MS dengan penambahan arginin dan glutamin. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 2(2):2337-3520.

Remita Y, T Nurhidayati dan Nurmalasari. 2013. Pengaruh medium MS dengan penambahan arginin 100 ppm terhadap pertumbuhan tunas apikal tebu (*Saccharum officinarum*) varietas NXI. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 2(1):2337-3520.

Rusdianto dan A Indrianto. 2012. Induksi kalus embriogenik pada wortel (*Daucus carota* L.) menggunakan 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Bionature* 13(2):136-140.

Silva MMDA, C Ulisses, MJLE Medeiros, MMC Granja, L Willadino and T Camara. 2014. *Antioxidant enzymes activity in embryogenic and non-embryogenic tissue in sugarcane. Acta Biologica Colombiana* 19(2):203-210.

Sukmadjaja D dan A Mulyana. 2011. Regenerasi dan pertumbuhan beberapa varietas tebu (*Saccharum officinarum*L.) secara *in vitro*. *AgroBiogen* 7(2):106-118.

Suprasanna P, RS Choudhary, NS Desai and VA Bapat. 2005. *Regulation of somatic embryogenesis by plant growth regulators in sugarcane. Sugar Tech* 7(4):123-128.

Williams EG and Maheswaran. 1986. *Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. Ann Botany* 57:443-462.