

PERTANIAN

Induksi Kalus dan Daya Regenerasi *In Vitro* Berbagai Umur Kalus dan Kultivar Tebu Thailand (*Saccharum officinarum* L.)

Callus Induction and Plant Regeneration Ability of Various Callus Ages of Certain Thai Sugarcane Cultivars

Rahmat Budiarto¹, Sigit Soeparjono^{1*} dan Kacung Hariyono¹

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember
Jl. Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto, Jember 68121

*E-mail: s.soepariono@gmail.com

ABSTRACT

The research aimed to determine callus characteristics at different ages and cultivars of sugarcane, to determine the interaction between callus age and cultivar on regeneration ability, and to determine the long term regenerated cultivar. Experimental design used was complete randomized design (CRD) with 2 factors. The first factor was sugarcane cultivars (v) that comprised of 4 levels, namely: LK 95-127, LK 92-17, K 93-219, and K 93-347. The second factor was callus ages (u) which consisted of 3 levels, namely 2 months, 3 months, and 4 months. All treatments replicated ten times. Response variables observed were percentage of embryogenic callus, colour, structure and diameter of callus, percentage of shoot regeneration, the length of shoot and number of shoot. Most of data except colour and structure of callus were tested using analysis of variance. The significant differences between treatments was analyzed by Duncan's Multiple Range Test at 5 % significant level. Callus induction medium composed of Murashige and Skoog (MS) basal medium + 20 g/l sucrose + 10% coconut water + 3 mg/l 2,4-D + 7 g/l agar. Shoot regeneration medium consisted of MS + 20 g/l sucrose + 10% coconut water + 7 g/l agar. The result showed that most of treated cultivars produced 100% embryogenic calli, except LK 92-17. The characteristics of embryogenic callus were whitish yellow, dry and compact with nodular structure. K 93-347 produced the widest diameter calli. All treated cultivars could be regenerated 100% after long-term maintenance (four months) on callus induction medium with high auxin and repeated subculture. Two months callus derived from LK 95-127 produced the highest number of shoot than others. Two months callus derived from K 93-347 or K 93-219 produced the longest shoot than others. Long term *in vitro* regenerated cultivar was K 93-347.

Keywords: Callus, Regeneration Ability, Sugarcane Cultivar, Callus Ages,

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik kalus pada berbagai umur dan kultivar tebu, mengetahui interaksi antara kultivar dan umur kalus terhadap daya regenerasi *in vitro*, dan mengetahui kultivar tebu regeneratif jangka panjang. Metode penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor dan 10 ulangan. Faktor pertama adalah kultivar tebu yang terdiri dari 4 taraf yakni LK 95-127, LK 92-17, K 93-219, dan K 93-347. Faktor kedua adalah umur kalus yang terdiri dari 3 taraf yakni 2 bulan, 3 bulan dan 4 bulan. Variabel yang diamati adalah persentase kalus embriogenik, warna, struktur dan diameter kalus, persentase regenerasi tunas, panjang dan jumlah tunas. Sebagian besar data kecuali warna dan struktur kalus dianalisis dengan sidik ragam. Beda nyata antar perlakuan di uji lanjut dengan uji Perbandingan Berganda Duncan pada taraf nyata 5%. Media induksi kalus tersusun dari media basal Murashige dan Skoog (MS) + sukrosa 20 g/l + air kelapa 10% + 2,4-D 3 mg/l + agar 7 g/l. Media regenerasi tunas tersusun dari MS + sukrosa 20 g/l + air kelapa 10% + agar 7 g/l. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar kultivar menghasilkan 100% kalus embriogenik, kecuali LK 92-17. Karakteristik kalus embriogenik adalah berwarna kuning keputihan, tidak basah, struktur kompak dengan tonjolan nodular. Kultivar K 93-347 menghasilkan kalus dengan diameter terbesar. Kalus dari semua kultivar dapat diregenerasikan menjadi tunas meskipun telah dikultur pada media induksi kalus dalam jangka panjang (4 bulan) dan telah mengalami subkultur berulang. Kalus berumur 2 bulan dari LK 95-127 menghasilkan rerata tunas terbanyak. Kalus berumur 2 bulan dari kultivar K 93-347 atau K 93-219 menghasilkan rerata tunas terpanjang. Kultivar regeneratif jangka panjang adalah K 93-347.

Kata kunci: Kalus, Daya Regenerasi, Kultivar Tebu, Umur Kalus

How to cite: Budiarto, R., S. Soeparjono., K. Hariyono. 2015. Induksi Kalus dan Daya Regenerasi *In Vitro* Berbagai Umur Kalus dan Kultivar Tebu Thailand (*Saccharum officinarum* L.). *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1): xx-xx

PENDAHULUAN

Tebu merupakan salah satu komoditas penting pertanian karena memiliki nilai ekonomis tinggi sebagai bahan baku industri gula (Fiah dkk., 2014). Hal ini karena 70% produksi gula secara global bertumpu pada usaha tani tebu (Khan dan Katri, 2006). Tebu telah dibudidayakan secara luas di lebih dari 120 negara beriklim tropis dan subtropis (Gallo-Magher et al., 2000), termasuk Thailand. Thailand mampu mengeksport 8,7 juta ton tebu pada periode November 2013/14 untuk memenuhi permintaan pasar Asia, terlebih dari Kamboja dan Indonesia (USDA, 2013).

Peningkatan produktivitas tanaman tebu harus didukung dengan penyediaan bibit berkualitas dalam skala besar, cepat, dan murah. Perbanyakan tanaman secara konvensional masih dibatasi oleh kemampuan tanaman untuk menghasilkan bibit baru dalam jumlah banyak, seragam dan dalam waktu singkat (Rasullah dkk, 2013). Selain

itu, kelemahan perbanyakan secara konvensional adalah memerlukan tanaman induk dalam jumlah banyak, kurang efisien dalam hal tempat dan tenaga, sangat bergantung musim tanam dan mudah tertular penyakit utamanya virus. Perbanyakan tebu dengan teknologi kultur jaringan lebih menjanjikan karena mampu menghasilkan bibit dalam jumlah besar, seragam, dalam waktu yang relatif singkat (Mayang dkk, 2011), lebih efisien dari segi tempat dan tenaga, bebas penyakit utamanya virus, tidak tergantung musim tanam, tidak membutuhkan banyak tanaman induk namun tetap dapat menghasilkan jumlah bibit berlipat.

Kultur jaringan adalah metode untuk mengisolasi bagian tanaman, seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ, dan menumbuhkannya pada media bernutrisi dalam kondisi aseptik dan lingkungan yang terkendali, sehingga dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap. Kultur jaringan dapat

digunakan untuk perbanyakkan bahan tanam, seleksi *in vitro* dalam rekayasa genetika dan produksi bahan tanam bebas virus.

Produksi bahan tanam tebu bebas virus dan seleksi *in vitro* sangat mengandalkan teknologi kultur jaringan. Peneliti memerlukan bahan dasar kalus untuk perbanyakkan planlet bebas virus contohnya Comstock dan Miller (2004) dalam memproduksi bahan tanam tebu bebas *Sugarcane Yellow Leaf Virus*. Penyisipan gen dalam transformasi genetika juga dilakukan pada bahan dalam bentuk kalus contohnya pada rekayasa tebu tahan herbisida oleh Gallo-Meagher et al. (2000).

Daya regenerasi suatu kalus sangat penting untuk menjamin keberhasilan produksi tanaman hasil rekayasa genetika (Raja et al., 2009). Hal tersebut dipengaruhi oleh umur kalus. Daya regenerasi suatu kalus akan menurun bahkan menghilang seiring dengan lamanya periode kultur kalus (Sukmadjaja dan Mulyana, 2011) dan pindah tanam atau subkultur yang berulang (Fiah dkk., 2014). Periode kultur kalus yang panjang identik dengan pertambahan umur kalus.

Sebagian besar peneliti mengkultur kalus dalam periode kultur tidak lebih dari 2 bulan contohnya Anjum et al., (2012) menggunakan kalus berumur 21, 28 and 35 hari untuk tahap regenerasi *in vitro*. Hal ini bertujuan untuk menghindari penurunan daya regenerasi dari kalus tersebut. Kalus yang terbentuk pada semua perlakuan, sel-selnya berhenti membelah dan akhirnya mengalami kematian setelah berumur lebih dari 60 hari (Sukmadjaja dan Mulyana, 2011). Kalus yang dikultur dalam periode panjang pada media dengan konsentrasi auksin cukup tinggi seperti halnya media induksi kalus memang beresiko tinggi mengalami penurunan daya regenerasi *in vitro*. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Fiah dkk. (2014) yakni kalus berumur 3 bulan yang dikultur pada media auksin 2,4D dan didapat dari 4 kultivar tebu bernama PS 862, PS 864, PS 881, dan VMC 86-550 telah mengalami 3 kali subkultur berulang dan menunjukkan penurunan kualitas kalus dan tidak dapat diregenerasikan menjadi tunas karena telah kehilangan daya regenerasinya.

Padahal kegiatan seleksi *in vitro*, produksi bahan tanam bebas virus dan perbanyakkan bahan tanam memerlukan kalus dengan daya regenerasi yang tetap baik meskipun telah disimpan lebih dari 2 bulan pada media kalus. Vyver et al., (2013) menghabiskan waktu 15 minggu atau hampir 4 bulan untuk seleksi bahan tanam tebu tahan pestisida. Purnamaningsih et al., (2013) membutuhkan waktu keseluruhan 3 bulan untuk seleksi bahan tanam tebu toleran aluminium.

Kemampuan regenerasi suatu kalus juga tergantung genotip dari varietas yang digunakan. Anjum et al. (2012) melaporkan bahwa dengan penggunaan umur kalus yang sama yakni 35 hari kultivar S-2003-us-371 menunjukkan hasil regenerasi yang lebih baik dibanding kultivar tebu S-2003-us-127. Pengetahuan dan penguasaan sistem regenerasi dari tiap-tiap varietas tanaman tebu secara *in vitro* sangat diperlukan karena sangat menentukan dalam program peningkatan produktivitas tanaman tebu melalui kultur jaringan, baik untuk keperluan perbanyakkan, perbaikan varietas atau transformasi gen (Sukmadjaja dan mulyana, 2011).

Berdasarkan uraian diatas diperlukan suatu percobaan yang fokus mendalami pengaruh penggunaan kalus berumur lebih dari 2 bulan dan berasal dari beberapa kultivar tebu unggul. Tujuan percobaan ini adalah untuk mengetahui karakteristik kalus pada berbagai umur dan kultivar tebu, mengetahui interaksi antara kultivar dan umur kalus terhadap daya regenerasi *in vitro*, dan mengetahui kultivar tebu regeneratif jangka panjang.

BAHAN DAN METODE

Percobaan dilaksanakan di laboratorium kultur jaringan, *Center of Agricultural Biotechnology Kasetsart University at Kamphaeng Saen campus*, Provinsi Nakhon Pathom, Thailand, pada bulan November 2013 sampai Mei 2014

Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 10 kali ulangan. Faktor pertama yaitu kultivar tebu thailand (V), terdiri dari 4 taraf yaitu LK 95-127, LK 92-17, K 93-219 dan K 93-347. Faktor kedua adalah umur kalus (U) yang terdiri dari 3 taraf yaitu 2 bulan, 3 bulan dan 4 bulan.

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

Sterilisasi peralatan. Peralatan dasar seperti laminair air flow perlu disterilisasi terlebih dulu sebelum digunakan dengan radiasi sinar UV. Botol kultur, cawan petri, pinset, dan pisau dicuci bersih, kemudian disterilkan di dalam autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 17.5 psi selama 60 menit.

Pembuatan media kultur. Media kultur yang digunakan adalah media induksi kalus dan media regenerasi tunas. Media induksi kalus terdiri dari media Murashige dan Skoog (MS), sukrosa 20 g/l, air kelapa 10% dan 2,4-D 3 mg/l. Media regenerasi tunas dibuat dari campuran media Murashige dan Skoog (MS), sukrosa 20 g/l, dan air kelapa 10%. pH larutan diukur dengan pH meter dan disesuaikan menjadi pH 5,7 sebelum di *autoclave*. Larutan tersebut kemudian ditambahkan agar 7 g/l. Media dimasak sampai mendidih. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam botol kultur dengan volume berkisar 20 ml/botol.

Persiapan bahan tanam. Bahan tanam yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 kultivar tebu Thailand (*Saccharum officinarum* L.) yang didapatkan dari Pusat Penelitian Tebu, Kasetsart University at Kamphaeng Saen Campus, Thailand. Empat kultivar tebu lokal berproduktivitas tinggi yang terpilih adalah LK 95-127, LK 92-17, K 93-219, dan K 93-347. Tebu yang dijadikan bahan tanam berusia 7 bulan. Bagian pucuk tebu yang tersusun dari 2-4 buku dipotong dengan menggunakan parang untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium. Bahan tanam tersebut selanjutnya dicuci, dibersihkan dan dipotong menjadi bagian yang lebih kecil yakni panjang 12-15 cm dan diameter 1 cm.

Sterilisasi eksplan. Bahan tanam diproses lanjut yakni sterilisasi dengan menggunakan 2 konsentrasi larutan kloroks secara bergantian, dimulai dengan konsentrasi tinggi 25% dan dilanjutkan dengan konsentrasi rendah 10%. Setiap bahan tanam dimasukan dalam botol yang telah berisi kloroks untuk selanjutnya digojok selama 20 menit dengan mesin penggojok. Pembilasan dengan air murni dilakukan pada semua bahan tanam secara berulang 3 kali dan disertai dengan penggojokan masing-masing selama 5 menit. Setelah disterilisasi, bahan tanam dipindahkan pada cawan petri untuk selanjutnya diproses menjadi eksplan. Bahan tanam dikuliti dengan menggunakan pisau dan pinset sehingga hanya menyisakan gulungan muda terdalam yang masih tersusun dari jaringan meristem apikal. Gulungan daun dalam dipotong dengan ukuran seragam 20 mm sebagai eksplan

Induksi kalus. Eksplan ditanam pada media induksi kalus secara aseptis didalam *laminair air flow*. Kultur diinkubasi pada ruang kultur yang gelap pada suhu 27°C. Masa induksi kalus berjalan sampai 4 bulan dengan subkultur setiap bulan pada media induksi kalus yang baru.

Regenerasi tunas. Kalus ditanam pada media regenerasi tunas sesuai dengan umur yang diperlakukan secara aseptis dalam *laminair air flow*. Kalus tersebut selanjutnya disimpan dalam ruangan berpencahayaan terang dengan intensitas sinar 55 micromol/m²/detik selama 6 jam/hari dan suhu ruangan berkisar 27±2°C. Kultur dipelihara selama 2 bulan dengan subkultur setiap bulan pada media regenerasi tunas yang baru.

Variabel pengamatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari :

a. Kalus embriogenik (%)

Kalus embriogenik dihitung berdasarkan jumlah eksplan yang mampu membentuk kalus embriogenik dibagi jumlah keseluruhan eksplan, lalu hasilnya dikalikan dengan 100%. Pengamatan dilakukan sebelum kalus dipindah ke media regenerasi.

b. Sifat fisik kalus

Sifat fisik kalus meliputi warna dan struktur yang diamati secara visual sehingga menghasilkan data kualitatif. Pengamatan dilakukan sebelum kalus dipindah ke media regenerasi.

c. Diameter kalus (cm)

Diameter kalus diukur dengan menghubungkan dua titik terjauh dari kalus dengan penggaris. Pengamatan dilakukan sebelum kalus dipindah ke media regenerasi.

d. Regenerasi tunas (%)

Regenerasi tunas dihitung berdasarkan jumlah kalus yang mampu membentuk tunas lebih tinggi dari 1 cm dibagi jumlah keseluruhan kalus, lalu hasilnya dikalikan dengan 100%. Pengamatan dilakukan di akhir tahap regenerasi yakni 2 bulan.

e. Panjang tunas (cm)

Panjang tunas diukur dengan menghubungkan dua titik terjauh dari tunas yakni pangkal batang dan daun tertinggi dengan penggaris. Pengamatan dilakukan di akhir tahap regenerasi yakni 2 bulan.

f. Jumlah tunas (tunas)

Jumlah tunas diukur dengan cara menghitung tunas yang lebih tinggi dari 1 cm di akhir tahap regenerasi yakni 2 bulan.

Data dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA). Beda nyata antar perlakuan di uji lanjut dengan uji perbandingan berganda Duncan pada taraf nyata 5%.

HASIL

Hasil sidik ragam percobaan Induksi Kalus dan Daya Regenerasi *In Vitro* berbagai Umur Kalus dan Kultivar Tebu Thailand (*Saccharum officinarum* L.) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rekapitulasi hasil f-hitung pada beberapa variabel pengamatan

Variabel	Nilai F-Hitung		
	Kultivar	Umur kalus	Interaksi kultivar dan umur kalus
Persentase kalus embriogenik	3,00 *	1,07 ns	0,25 ns
Diameter kalus	141,57 **	507,13 **	6,43 **
Jumlah tunas	12,99 **	30,44 **	5,08 **
Panjang tunas	0,57 ns	21,39 **	6,25 **

Keterangan : * = berbeda nyata, ** = berbeda sangat nyata, ns = berbeda tidak nyata

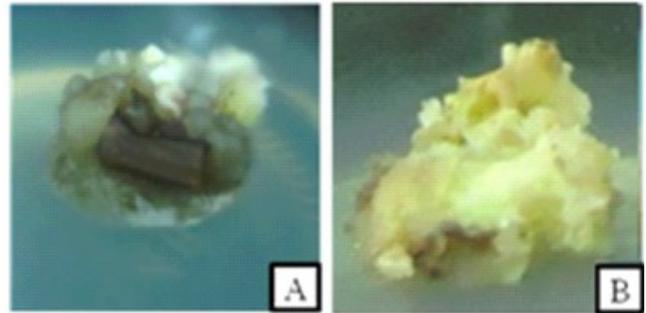
Berdasarkan Tabel 1, diketahui bahwa pengaruh interaksi antara kultivar (V) dan umur kalus (U) berbeda sangat nyata pada sebagian besar variabel pengamatan, kecuali persentase kalus embriogenik yakni berbeda tidak nyata. Perlakuan tunggal kultivar berpengaruh sangat nyata pada diameter kalus dan jumlah tunas, berpengaruh nyata pada persentase kalus embriogenik, namun berpengaruh tidak nyata pada panjang tunas. Faktor tunggal umur kalus berbeda sangat nyata pada sebagian besar variabel kecuali persentase kalus embriogenik yakni berbeda tidak nyata.

Tabel 2. Hasil uji lanjut faktor tunggal kultivar pada variabel persentase kalus embriogenik

Kultivar	Kalus Embriogenik (%)
LK 95-127 (V1)	96,7a
LK 92-17 (V2)	83,9b
K 93-219 (V3)	100,0a
K 93-347 (V4)	96,7a

Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata pada uji Duncan taraf nyata 5%.

Pengaruh kultivar yang berbeda nyata terhadap persentase kalus embriogenik dilanjutkan dengan uji Duncan taraf 5 % (Tabel 2). Persentase kalus embriogenik terbanyak dihasilkan oleh K 93-219 yakni 100% yang berbeda tidak nyata dengan LK 95-127 dan K 93-347 yakni 96,7% namun berbeda nyata dengan kultivar LK 92-17 yakni sebanyak 83,9%. Perbandingan karakteristik kalus embriogenik dan non embriogenik tampak pada Gambar 1.



Gambar 1. Kalus non embriogenik (A) dan embriogenik (B)

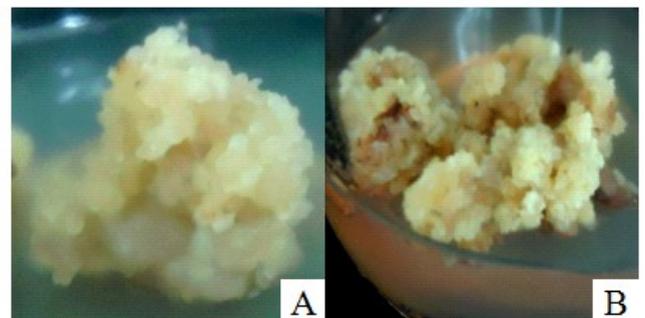
Tabel 3. Hasil uji lanjut interaksi kultivar dan umur kalus pada variabel diameter kalus

Kultivar (V)	Umur Kalus (U)		
	2 bulan (U1)	3 bulan (U2)	4 bulan (U3)
LK 95-127 (V1)	2,0 ^a _C	2,8 ^b _B	3,5 ^a _A
LK 92-17 (V2)	1,2 ^b _C	1,8 ^c _B	2,8 ^a _A
K 93-219 (V3)	1,9 ^a _C	3,0 ^{ab} _B	3,7 ^a _A
K 93-347 (V4)	2,1 ^a _C	3,2 ^a _B	4,4 ^a _A

Keterangan : Angka-angka yang di ikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf nyata 5%. Huruf kecil (a,b,...) dibaca secara vertikal dan huruf besar (A,B,...) dibaca horizontal.

Berdasarkan hasil uji lanjut pada Tabel 3, diameter kalus semua kultivar yang berumur 2 bulan lebih kecil dan berbeda nyata dengan umur 3 bulan, kalus berumur 3 bulan juga lebih kecil dan berbeda nyata dengan yang berumur 4 bulan. Kultivar LK 92-17 menghasilkan diameter kalus yang terkecil dibanding 3 kultivar lainnya pada semua taraf umur kalus. Sedangkan kultivar K 93-347 menghasilkan diameter kalus yang terbesar dibanding 3 kultivar lainnya pada semua taraf umur kalus.

Pengamatan kalus juga didasarkan pada sifat fisik seperti warna dan struktur. Hasil pengamatan warna kalus menunjukkan bahwa kalus embriogenik berwarna kuning keputihan (Gambar 2A) namun khusus untuk kultivar K 93-347 (V4) mengalami *browning* (Gambar 2B). Hasil pengamatan struktur kalus menunjukkan bahwa kalus embriogenik menghasilkan struktur kompak dengan tonjolan nodular (Gambar 3.).



Gambar 2. Warna kalus kuning keputihan (A) dan warna kalus kuning keputihan yang mengalami *browning* (B)



Gambar 3. Struktur kalus kompak dengan tonjolan nodular (didalam lingkaran merah)

Hasil pengamatan pada variabel persentase regenerasi tunas menunjukkan bahwa semua kalus baik yang berumur 2 bulan, 3 bulan dan 4 bulan dan berasal dari kultivar LK 95-127, Lk 92-17, K 93-219 dan K 93-347 dapat diregenerasikan menjadi tunas dalam waktu 2 bulan (Tabel 4).

Tabel 4. Persentase regenerasi tunas dari berbagai umur kalus dan kultivar tebu Thailand

Kultivar (V)	Umur Kalus (U)		
	2 bulan (U1)	3 bulan (U2)	4 bulan (U3)
LK 95-127 (V1)	100%	100%	100%
LK 92-17 (V2)	100%	100%	100%
K 93-219 (V3)	100%	100%	100%
K 93-347 (V4)	100%	100%	100%

Hasil uji lanjut interaksi antara kultivar dan umur kalus terhadap panjang tunas disajikan pada Tabel 5. Tunas terpanjang dihasilkan oleh interaksi antara kultivar K 93-219 dan kalus berumur 2 bulan (V3U1) yakni sebesar 16,40 cm. Sedangkan tunas terpendek dihasilkan oleh kombinasi perlakuan K 93-219 dan kalus berumur 3 bulan (V3U2) yakni 6,78 cm. Kombinasi perlakuan V1U1 berbeda nyata dengan V2U1, namun berbeda tidak nyata dengan V3U1 dan V4U1. Kombinasi perlakuan V2U2 berbeda nyata dengan V1U2 dan V3U2, berbeda tidak nyata dengan V4U2. Kombinasi perlakuan V1U3 berbeda nyata dengan 3 kultivar lainnya pada umur kalus yang sama yakni 4 bulan. Kombinasi perlakuan V3U1 menghasilkan panjang tunas yang berbeda nyata dengan V3U2 dan V3U3 dimana V3U2 berbeda tidak nyata dengan V3U3. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh kultivar K 93-347 (V4). Kombinasi perlakuan V1U1 menghasilkan tunas yang berbeda nyata dengan V1U2 namun berbeda tidak nyata dengan V1U3. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh kultivar K 93-347 (V4). Kombinasi perlakuan V2U1 menghasilkan tunas yang berbeda tidak nyata dengan V2U2 dan V2U3.

Tabel 5. Hasil uji lanjut interaksi kultivar dan umur kalus pada variabel panjang tunas

Kultivar (V)	Umur Kalus (U)		
	2 bulan (U1)	3 bulan (U2)	4 bulan (U3)
LK 95-127 (V1)	14,60 ^{ab} ^A	7,30 ^b ^B	14,20 ^a ^A
LK 92-17 (V2)	10,88 ^b ^A	12,00 ^a ^A	10,15 ^b ^A
K 93-219 (V3)	16,40 ^a ^A	6,78 ^b ^B	9,97 ^b ^B
K 93-347 (V4)	15,35 ^a ^A	9,65 ^{ab} ^B	7,8 ^b ^B

Keterangan : Angka-angka yang di ikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf nyata 5%. Huruf kecil (a,b,...) dibaca secara vertikal dan huruf besar (A,B,...) dibaca horizontal.

Hasil uji lanjut interaksi antara kultivar dan umur kalus terhadap jumlah tunas disajikan pada Tabel 6. Jumlah tunas terbanyak dihasilkan oleh interaksi antara kultivar LK 95-127 dan kalus berumur 2 bulan (V1U1) sebesar 34,20 tunas dan jumlah tunas tersedikit dihasilkan oleh

interaksi antara K 93-219 dan kalus berumur 4 bulan yakni 10,20 tunas (V3U3). Kombinasi perlakuan V1U1 lebih besar dan berbeda nyata dengan V1U2 dan V1U3 dimana V1U2 berbeda tidak nyata dengan V1U3. Hal yang sama ditunjukkan oleh kultivar K 93-219 (V3). Kombinasi perlakuan V2U1 menghasilkan tunas yang berbeda tidak nyata dengan V2U2 dan V2U3. Hal yang sama ditunjukkan oleh kultivar K 93-347 (V4). Kombinasi perlakuan V1U1 menghasilkan jumlah tunas terbesar dan berbeda nyata dengan V2U1, V3U1, dan V4U1. Kombinasi perlakuan V4U2 menghasilkan jumlah tunas terbesar dan berbeda nyata dengan V3U2 namun berbeda tidak nyata dengan V1U2 dan V2U2. Kombinasi perlakuan V4U3 menghasilkan jumlah tunas terbesar dan berbeda nyata dengan V2U3 dan V3U3 namun berbeda tidak nyata dengan V1U3.

Tabel 6. Hasil uji lanjut interaksi kultivar dan umur kalus pada variabel jumlah tunas

Kultivar (V)	Umur Kalus (U)		
	2 bulan (U1)	3 bulan (U2)	4 bulan (U3)
LK 95-127 (V1)	34,20 ^a ^A	15,80 ^{ab} ^B	15,10 ^{ab} ^B
LK 92-17 (V2)	14,60 ^c ^A	14,80 ^{ab} ^A	10,50 ^b ^A
K 93-219 (V3)	24,00 ^b ^A	12,60 ^b ^B	10,20 ^b ^B
K 93-347 (V4)	24,30 ^b ^A	20,00 ^a ^A	19,60 ^a ^A

Keterangan : Angka-angka yang di ikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf nyata 5%. Huruf kecil (a,b,...) dibaca secara vertikal dan huruf besar (A,B,...) dibaca horizontal.

PEMBAHASAN

Kalus merupakan bahan dasar untuk regenerasi *in vitro*. Karakteristik kalus embriogenik adalah struktur kompak nodular, berwarna krem atau kuning keputihan, berkilau, sedangkan karakteristik kalus non embriogenik adalah basah dan berwarna abu abu (Gandonou et al., 2005) seperti pada Gambar 1. Struktur kalus embriogenik yang kompak tersusun dari sel-sel parenkim yang bentuknya tidak beraturan (amorfik) dengan kerapatan yang cukup padat dan kandungan air yang tidak berlebihan (Gambar 3). Struktur tersebut juga memiliki tonjolan-tonjolan nodular yang akan menjadi calon organ apabila dirangsang oleh zat pengatur tumbuh. Struktur kalus kompak biasanya lebih tahan terhadap perlakuan subkultur yang berulang. Warna kalus embriogenik pada semua kultivar adalah kuning keputihan atau krem (Gambar 2A). Warna tersebut disebabkan oleh akumulasi pigmen flavonoid pada sel parenkim penyusun kalus. Khusus untuk kultivar K 93-347 mengalami pencoklatan (*browning*) pada bagian dasar kalus dan media tumbuh (Gambar 2B). Pencoklatan (*browning*) disebabkan oleh oksidasi senyawa fenol (Takahashi and Takamizo, 2013) sebagai bentuk respon dari pelukaan jaringan yang biasanya terjadi saat subkultur. Reaksi pencoklatan yang berlebihan bersifat toksik dan menyebabkan terhambatnya pertumbuhan kultur (Ahmad et al., 2013).

Diameter kalus pada semua kultivar mengalami peningkatan seiring dengan semakin bertambahnya umur kalus. Kalus berumur 4 bulan menghasilkan diameter kalus terbesar dibandingkan kalus berumur 2 dan 3 bulan. Hal ini karena sel dalam kalus yang terus membelah pada media yang sesuai seperti halnya media induksi kalus yang digunakan pada percobaan ini.

Berdasarkan hasil penelitian, pengaruh faktor tunggal kultivar menyebabkan hasil yang berbeda nyata pada variabel pengamatan persentase kalus embriogenik. Hal ini disebabkan oleh perbedaan genotipe dari kultivar tebu yang digunakan. Penelitian ini tidak didukung oleh analisis yang mendalam terkait peran genotip terhadap persentase kalus embriogenik. Kultivar K 93-219 diduga memiliki genotipe yang lebih unggul dalam pembentukan kalus embriogenik dibanding 3 kultivar lainnya.

Selain faktor genotip, keberhasilan kultur kalus juga ditentukan oleh media tumbuh (Sukmadjaja dan mulyana, 2011). Media tumbuh yang digunakan pada penelitian ini adalah seragam dan optimal mendukung kultur kalus. Media induksi kalus tersusun dari media basal Murashige dan Skoog, 20 g/l sukrosa, 10% air kelapa, 3 mg/l 2,4-D dan 7 g/l agar. Untuk tujuan induksi kalus, media tumbuh MS harus diperkaya dengan hormon sintetis dengan nisbah konsentrasi auksin, contohnya 2,4 D dan NAA yang lebih tinggi dari pada konsentrasi sitonikin. Penggunaan 2,4 D lebih baik dibanding penggunaan NAA (Tiwari *et al.*, 2013). Penambahan 3 mg/l 2,4-D pada media MS menginduksi kalus dengan ukuran tertinggi (Mayang dkk, 2011). Air kelapa merupakan senyawa organik kompleks yang juga mengandung sitokinin alami dalam bentuk 1,3-diphenylurea, zeatin, zeatin glucoside, dan zeatin riboside (George *et al.*, 2008). Penambahan sukrosa pada media kultur ditujukan sebagai sumber karbon. Sumber karbon merupakan salah satu faktor yang sangat penting untuk menentukan keberhasilan kultur jaringan selain kombinasi zat tumbuh karena glukosa dan fruktosa sebagai hasil hidrolisis sukrosa dapat merangsang pertumbuhan beberapa jaringan (Sitorus, 2011).

Faktor diluar media tumbuh seperti suhu, fotoperiod, dan jenis eksplan juga menentukan keberhasilan kultur kalus. Kultur kalus pada percobaan ini diseragamkan pada suhu 27°C. Sebagian besar peneliti sebelumnya mengkulturkan kalus pada suhu 26±1°C (Mustafa and Khan, 2012) and 26 ± 2°C (Anjum *et al.*, 2012). Kultur kalus juga diseragamkan pada kondisi gelap. Behbahani *et al.* (2011) melaporkan bahwa berat kering kalus yang dikondisikan dalam kultur gelap lebih berat dibanding dalam kultur terang. Mustafa and Khan (2012) juga melaporkan bahwa dalam kondisi gelap induksi kalus terbukti lebih baik dan membantu dediferensiasi dari jaringan kalus. Jenis eksplan yang digunakan berasal dari gulungan daun muda pucuk tanaman tebu yang berumur 7 bulan. Jaringan muda tanaman terdiri dari sel-sel yang masih aktif membelah dan bersifat responsif terhadap program induksi kalus (Molnar *et al.*, 2011).

Tingginya keberhasilan kultur kalus embriogenik pada percobaan ini berkorelasi terhadap tingginya persentase regenerasi tunas. Kalus embriogenik lebih mudah untuk di regenerasikan secara *in vitro* ketimbang kalus non embriogenik (Sukmadjaja dan Mulyana, 2011). Meskipun demikian, semua kalus dari 12 kombinasi perlakuan yang digunakan pada percobaan kali ini dapat diregenerasikan menjadi tunas, termasuk kalus yang berumur 3 dan 4 bulan. Hal ini bertentangan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Tiwari *et al.* (2013) dan Fiah dkk. (2014). Hasil penelitian Tiwari *et al.* (2013) menunjukkan bahwa 60% kalus berumur 15 minggu yang berasal dari kultivar Cos 8820 dan Cos 767 mati dan tidak dapat diregenerasikan. Fiah dkk. (2014) melaporkan bahwa kalus berumur 3 bulan yang dikultur pada media auksin 2,4D dan didapat dari 4 kultivar tebu bernama PS 862, PS 864, PS 881, dan VMC 86-550 telah mengalami 3 kali subkultur berulang dan menunjukkan penurunan kualitas kalus dan tidak dapat diregenerasikan menjadi tunas karena telah kehilangan daya regenerasinya.

Meskipun semua kalus pada percobaan kali ini dapat diregenerasi menjadi tunas, tidak berarti daya regenerasi tunas tetap seragam seiring dengan penggunaan kalus berumur lebih dari 2 bulan. Hal tersebut nampak pada variabel pengamatan panjang dan jumlah tunas. Berdasarkan hasil penelitian, pengaruh interaksi kultivar dan umur kalus menyebabkan hasil yang berbeda nyata pada variabel panjang tunas dan jumlah tunas.

Penurunan kemampuan regenerasi dapat ditunjukkan dengan semakin menurunnya jumlah tunas yang dihasilkan (Pola *et al.*, 2009). Kultivar LK 95-127 dan K 93-219 memiliki daya regenerasi jangka pendek karena hanya mampu memproduksi banyak tunas pada umur kalus muda yakni 2 bulan, namun seiring dengan penggunaan kalus yang lebih tua (3 dan 4 bulan) jumlah tunas yang diproduksi menurun. Kultivar LK 92-17 memiliki daya regenerasi yang lebih lemah karena menghasilkan jumlah tunas yang dihasilkan paling sedikit dibandingkan 3 kultivar lainnya. kultivar K 93-347 memiliki daya regenerasi yang tinggi terbukti dengan jumlah tunas terbanyak pada semua taraf umur dibanding 3 kultivar lainnya dan berbeda tidak nyata antara kalus yang muda dan kalus tua. Oleh karena itulah, K 93-347 adalah kultivar yang paling layak disebut kultivar regeneratif *in vitro* jangka panjang.

Perbedaan jumlah tunas pada taraf umur yang berbeda disebabkan oleh perbedaan jumlah sel kompeten yang menyusun suatu kalus. Keberadaan sifat kompeten pada sel penyusun bersifat sementara (Pulianmackal *et al.*, 2014). Keberadaan sifat tersebut semakin menurun seiring dengan semakin lamanya periode kultur kalus atau semakin tua kalus. Suatu sel atau jaringan dikatakan kompeten jika sel atau jaringan tersebut mampu memberikan tanggapan terhadap signal lingkungan atau signal hormonal dan bentuk tanggapannya berupa pertumbuhan dan perkembangan diri yang mengarah ke proses organogenesis (Andaryani, 2010). Pada media regenerasi tunas, sel kompeten akan responsif terhadap zat pengatur tumbuh yang didominasi sitokinin. Primordia tunas akan muncul dari tonjolan nodular pada kalus. Warna hijau pada kalus adalah akibat efek sitokinin dalam pembentukan klorofil (Lizawati, 2012).

Perbedaan panjang dan jumlah tunas juga dipengaruhi oleh genotipe dari masing masing kultivar tebu. Penelitian kali ini tidak didukung oleh analisis yang mendalam terkait peran genotip terhadap panas dan jumlah tunas. Penelitian lanjutan yang melibatkan pendekatan molekular dalam menganalisis peran genotip terhadap daya regenerasi *in vitro* terutama panjang dan jumlah tunas sangat dibutuhkan.

KESIMPULAN

Karakteristik kalus pada berbagai umur dan varietas tebu sebagian besar merujuk pada ciri kalus embriogenik yakni warna kuning keputihan, tidak basah, struktur kompak dengan tonjolan nodular, diameter terus bertambah besar. Kalus dari semua kombinasi perlakuan dapat diregenerasikan menjadi tunas dalam waktu 2 bulan. Interaksi umur kalus dan kultivar berpengaruh sangat nyata terhadap panjang dan jumlah tunas. Kultivar regeneratif *in vitro* jangka panjang adalah K 93-347.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada pihak penyelenggara Program Beasiswa Unggulan Strata I Fakultas Pertanian Universitas Jember.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad I, T Hussain, I Ashraf, M Nafees, Maryam, M Rafay, M Iqbal. 2013. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian J Agric and Environ Sci.* 13(4):539-547.
- Andaryani S. 2010. Kajian Penggunaan berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4 D terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*) secara *In Vitro*. *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret.
- Anjum N, S Ijaz, IA Rana, TM Khan, IA Khan, MN Khan, G Mustafa, FA Joyia, A Iqbal. 2012. Establishment of an *in vitro* regeneration system as milestone for genetic transformation of sugarcane (*Saccharum officinarum L.*) against *Ustilago scitamenia*. *Bioscience Methods.* 3(2):7-20.
- Behbahani M, M Shansazzadeh, MJ Hessami. 2011. Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae Family) for lycopene production. *Sci Agric Piracicaba Braz.* 68(1):69-76.
- Comstock JC, JD Miller. 2004. Yield comparisons : disease-free tissue-culture versus bud-propagated sugarcane plants and healthy versus yellow leaf infected plants. *Journal American Society Sugar Cane Technologist.* 24:31-40.

- Fiah RL, Taryono, Toekidjo. 2014. Kemampuan regenerasi kalus empat klon tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Vegetalika*. 3(1):91-101.
- Gallo-Meagher M, RG English, A Abouzid. 2000. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. *In Vitro Cell Dev Bio Plant*. 36:37-40.
- Gandonou CH, T Errabii, J Abrini, M Idaomar, F Chbi, NS Senhaji. 2005. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). *African Journal of Biotechnology*. 4(11):1250-1255.
- George EF, MA Hall, GJD Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition*. Springer, The Netherlands.
- Khan IA, A Khatri. 2006. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane histological studies. *Pak J Bot*. 38(3):631-636.
- Lizawati. 2012. Induksi kalus embriogenik dari eksplan tunas apikal tanaman jarak pagar (*Jatropha Curcas* L.) dengan penggunaan 2,4 D dan TDZ. *Jurnal Universitas Jambi ISSN:2302-6472*. 1(2):75-87.
- Mayang RB, D Hapsoro, Yusnita. 2011. Regenerasi *in vitro* tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) : induksi dan proliferasi kalus serta induksi tunas. *Jurnal Agrotropika*. 16(2):52-26.
- Molnár Z, E Virág, V Ördög. 2011. Natural substances in tissue culture media of higher plants. *Acta Biol Szeged*. 55(1):123-127.
- Mustafa G, MS Khan. 2012. Reproducible *in vitro* regeneration system for purifying sugarcane clones. *African Journal of Biotechnology*. 11(42): 9961-9969.
- Pola S, NS Mani, T Ramana. 2009. Long-term maintenance of callus culture from immature embryo of *Sorghum Bicolor*. *World Journal of Agricultural Sciences*. 5(4):415-421.
- Pulianmackal AJ, AVK Kareem, K Durgaprasad, ZB Trivedi, K Prasad. 2014. Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. *Frontiers in Plant Science*. 5:1-16.
- Purnamaningsih R, S Hutami, I Mariska. 2013. *Iradiasi Sinar Gamma dan Seleksi In Vitro pada Kalus Tebu untuk Meningkatkan Toleransi terhadap Aluminium*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.
- Raja NI, A Bano, H Rashid, MH Khan, Z Chaudhry. 2009. Effect of age of embryogenic callus on plant regeneration in local cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak J Bot*. 41(6):2801-2806.
- Rasullah FFF, T Nurhidayati, Nurmalasari. 2013. Respon pertumbuhan tunas kultur meristem apikal tanaman 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.
- Sitorus EN, ED Hastuti, N Setiari. 2011. Induksi kalus binahong (*Basella rubra* L.) secara *in vitro* pada media murashige dan skoog dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda. *Bioma*. 13(1):1-7.
- Sukmadjaja D, A Mulyana. 2011. Regenerasi dan pertumbuhan beberapa varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara *in vitro*. *AgroBiogen*. 7(2):106-118.
- Takahashi W, T Takamizo. 2013. Plant regeneration from embryogenic calli of the wild sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.) clone 'glagah kloet'. *Bull NARO Inst Livest Grassl Sci*. 13:23-32.
- Tiwari S, A Arya, P Yadav, P Kumari, S Kumar. 2013. Enhanced *in vitro* regeneration of two sugarcane varieties cos 8820 and cos 767 through organogenesis. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 3(4):17-26.
- USDA. 2013. *Sugar: World Markets and Trade*. Department of Agriculture Foreign Agricultural Service, United States.
- Vyver CVD, T Conradie, J Kossmann, J Lloyd. 2013. *In vitro* selection of transgenic sugarcane callus utilizing a plant gene encoding a mutant form of acetolactate synthase. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 49: 198–206.