

6/B10/1991/031

Rie

**PEMBENTUKAN DAN REGENERASI KALUS TANAMAN TEBU**  
**(*Saccharum officinarum* L.) VARIETAS F 154 SECARA *IN VITRO***

ETY AMBARWATI SUMIDJO



JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
B O G O R  
1991

## RINGKASAN

ETY AMBARWATI SUMIDJO. Pembentukan dan Regenerasi Kalus pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Varietas F 154 Secara *In Vitro* (Dibawah bimbingan DIAH R. LUKMAN dan SOEKISMAN TJITROSOEDIRDJO).

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Penelitian dimulai sejak bulan Juni 1990 sampai dengan bulan Maret 1991. Tujuan penelitian ini ialah mengetahui kemampuan pembentukan kalus dan regenerasi kalus tebu varietas F 154 (BZ 132) dalam kultur *in vitro*.

Perlakuan pada tebu ini terdiri dari medium dasar Murashige dan Skoog (MS) dengan 4, 6 dan 8 mg/l 2,4-Diklorofenoksi asam asetat (2,4-D) dan suhu dingin (8°) selama nol dan tiga hari pertama. Masing-masing ulangan 10 kali. Eksplan berasal dari tunas tebu yang berumur dua bulan. Sub kultur dilakukan pada saat umur kultur kalus berumur 12 minggu. Medium yang digunakan untuk regenerasi kalus ini adalah medium MS tanpa 2,4-D.

Pengamatan terhadap percobaan ini meliputi persentase pencoklatan, waktu timbulnya kalus, warna kalus, waktu pembentukan tunas dan akar serta persentase pembentukan tunas dan akar dari kalus.



Dari hasil percobaan diketahui bahwa pencoklatan terjadi pada semua perlakuan. Perlakuan dengan suhu dingin menyebabkan persentase pencoklatan jaringan lebih sedikit dibandingkan perlakuan tanpa suhu dingin. Namun suhu rendah tersebut mengakibatkan lambatnya pertumbuhan jaringan.

Munculnya kalus berkisar antara minggu ke satu sampai minggu ke empat. Pembentukan kalus hanya terjadi pada perlakuan 2,4-D 6 mg/l dan 8 mg/l tanpa suhu dingin dan 6 mg/l dengan suhu dingin. Perlakuan 4 mg/l sama sekali tidak menghasilkan kalus. Warna kalus yang terbentuk umumnya berwarna putih dan bertipe kalus kompak.

Setelah kalus berumur 12 minggu, kalus dipindahkan ke medium regenerasi. Dari semua kalus yang terbentuk tidak semua mampu beregenerasi membentuk tunas dan akar. Regenerasi kalus terjadi pada minggu kedua dan minggu kedelapan. Di dalam medium inisiasi terdapat tunas yang tumbuh langsung dari kalus. Ini diduga adalah tunas yang berasal dari embrio somatik.

PEMBENTUKAN DAN REGENERASI KALUS TANAMAN TEBU  
(*Saccharum officinarum* L.) VARIETAS F 154 SECARA *IN VITRO*

ETY AMBARWATI SUMIDJO

Karya Ilmiah  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Biologi  
pada  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Pertanian Bogor

JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
1991

Judul : PEMBENTUKAN DAN REGENERASI KALUS TANAMAN  
TEBU (*Saccharum officinarum* L.) VARIETAS  
F 154 SECARA *IN VITRO*  
Nama Mahasiswa : ETY AMBARWATI SUMIDJO  
NIM : G23.0097

Menyetujui



Dr. Ir. Diah R. Lukman

Pembimbing I



Dr. Soekisman T., MSc.

Pembimbing II

Mengetahui



drh. Ikin Mansjoer, MSc.

Ketua Jurusan Biologi

Tanggal Lulus : 21 Agustus 1991

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 21 Juli 1967 di Bogor. Orang tuanya adalah Bapak Sumidjo Hadiatmodjo dan Ibu Marsinah sebagai putri keempat dari lima bersaudara.

Pada tahun 1980 penulis lulus dari Sekolah Dasar Bangka III Bogor. Pada tahun 1983 penulis lulus dari Sekolah Menengah Pertama III Bogor dan pada tahun 1986 penulis menyelesaikan pendidikannya di Sekolah Menengah Atas I Bogor.

Penulis diterima di Institut Pertanian Bogor melalui PMDK pada tahun 1986, kemudian pada tahun 1987 penulis diterima di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Penulis pernah menjadi asisten luar biasa untuk mata kuliah Biologi Umum dan Taksonomi Tumbuhan.

## PRAKATA

Puji dan syukur dipanjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga laporan Masalah Khusus ini dapat terselesaikan.

Laporan Masalah Khusus ini merupakan syarat untuk memperoleh gelar sarjana Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dr. Ir. Diah R. Lukman dan Bapak Dr. Soekisman Tjitrosoedirdjo, MSc. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan selama dilaksanakannya penelitian dan penyusunan laporan ini.
2. Kepala Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, FMIPA-IPB beserta seluruh staf dan pegawai atas bantuannya selama penelitian.
3. Yang tersayang bapak, ibu, kakak-kakak dan adik, serta teman-teman tercinta Diah, Mbak Nancy, Dessy, dan Mimiek yang telah memberikan dorongan baik moril maupun material sehingga tersusunnya laporan ini.

Penulis menyadari laporan ini masih jauh dari sempurna, untuk itu saran dan kritik merupakan masukan yang berharga untuk perbaikan di masa mendatang. Harapan penulis

semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Bogor, Agustus 1991

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL .....	iv
DAFTAR GAMBAR .....	v
PENDAHULUAN .....	1
Latar Belakang .....	1
Tujuan .....	2
TINJAUAN PUSTAKA .....	4
Botani Tanaman Tebu .....	4
Sistematika Tebu .....	4
Deskripsi Tebu Varietas F 154 .....	4
Syarat Hidup Tebu .....	7
Kultur Jaringan Tebu .....	8
Kultur Jaringan Tebu .....	8
Sterilisasi Bahan Tanaman .....	9
Medium yang Digunakan .....	11
Zat Pengatur Tumbuh .....	12
Eksplan .....	13
Lingkungan Tumbuh .....	14
Perkembangan Eksplan .....	14
Pencoklatan .....	16
BAHAN DAN METODE .....	18
Waktu dan Tempat .....	18
Metode .....	18
Persiapan Peralatan .....	18

Pembuatan Medium .....	18
Sterilisasi Bahan Tanaman .....	19
Penanaman .....	20
Perlakuan .....	21
Pengamatan .....	21
Perhitungan .....	22
HASIL DAN PEMBAHASAN .....	23
KESIMPULAN DAN SARAN .....	39
Kesimpulan .....	39
Saran .....	39
DAFTAR PUSTAKA .....	41
LAMPIRAN .....	44

## DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Persentase Kematian Jaringan pada Umur Empat Minggu Setelah Tanam .....	23
2.	Persentase Pencoklatan Jaringan yang Terjadi pada Umur 12 Minggu Setelah Tanam .....	26
3.	Persentase Inisiasi Kalus, Saat Muncul Kalus dan Warna Kalus pada Umur 12 Minggu Setelah Tanam .....	30
4.	Regenerasi Kalus menjadi Tunas dan Akar pada Umur 12 Minggu setelah Dipindahkan ke Medium Regenerasi .....	32
<b>Lampiran</b>		
1.	Komposisi Medium Murashige dan Skoog (MS) yang Dimodifikasi untuk Pembentukan Kalus dan Regenerasi Kalus .....	45

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Tebu Varietas F 154 .....	6
2.	Tunas Tebu Varietas F 154 Umur Dua Bulan .....	20
3.	Eksplan yang Mengalami Pencoklatan pada Umur 5 Minggu Setelah Tanam .....	27
4.	Inisiasi Kalus pada Eksplan Tebu Perlakuan 8 mg/l tanpa Suhu Dingin pada Umur 2 MST .....	31
5.	Kalus yang Menumbuhkan Perakaran pada Perlakuan 8 mg/l tanpa Suhu Dingin pada Umur 12 Ming- gu Setelah Dipindahkan ke Medium Regenerasi	34
6.	Kalus yang Mempunyai Bintik-bintik Tunas pada Medium 8 mg/l tanpa suhu dingin pada Umur 12 Minggu di Medium Regenerasi .....	35
7.	Pembentukan Tunas Langsung dari Kalus dalam Me- dium Inisiasi dengan 2,4-D 8 mg/l tanpa Suhu Dingin (7a), Akar yang Terbentuk Sete- lah Pindahan ke Medium Regenerasi (7b) ..	38

## PENDAHULUAN

### Latar Belakang

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman penting di Indonesia sebagai penghasil gula. Dengan bertambahnya jumlah penduduk, maka bertambah pula konsumsi gula setiap tahunnya. Sebagai gambaran, diketahui di Indonesia pada tahun 1980 hanya tersedia 1.2 juta ton gula, sedangkan sampai akhir Pelita IV kebutuhan gula mencapai 2.52 juta ton (Noertjahyo, 1991). Dengan demikian masih perlu tambahan 1.32 juta ton. Untuk itu perlu ada usaha usaha peningkatan produksi gula untuk mengimbangi meningkatnya konsumsi gula, yang ditunjang dengan kegiatan penelitian yang menyangkut berbagai bidang.

Tebu ditanam dengan potongan batang bibit yang ber mata tunas rata-rata delapan sampai dua belas setiap meter guludan. Jarak antar guludan itu kurang lebih 1.35 m dan setelah tumbuh populasi tebu diharapkan dapat mencapai sekitar 100 000 batang/ha<sup>1</sup>. Untuk penyediaan bibit ini diperlukan areal yang cukup luas. Menyadari diperlukannya areal yang luas untuk memenuhi kebutuhan bibit tanaman tebu dalam jumlah banyak, maka dilakukan pemanfaatan metode kultur jaringan sebagai salah satu aspek bioteknologi

---

<sup>1</sup>Keterangan lisan dengan Bapak Dr. Sukisman T., MSc.

untuk pengadaan bibit. Pada umumnya perbanyakan secara *in vitro* digunakan untuk mendapatkan bibit yang seragam, dan dihasilkan secara massal. Perbanyakan *in vitro* ini dilakukan di laboratorium, sehingga pelaksanaannya tidak tergantung pada musim, faktor lingkungan (suhu, cahaya, kelembaban, dan sebagainya) serta tidak memerlukan areal yang luas seperti yang dilakukan di lapang dan bahan yang digunakan relatif sedikit.

Salah satu kendala yang sering dihadapi dalam kultur sel terutama sel friabel adalah turunnya kemampuan morfogenesis sel-sel tersebut, sehingga regenerasi tanaman utuh tidak terjadi (Meredith dan Carlson, 1982). Padahal pekerjaan pemuliaan tanaman melalui kultur sel tak akan bermanfaat bila sel tersebut tak mampu membentuk tanaman utuh. Walaupun regenerasi tanaman sudah diperoleh dalam banyak jenis tanaman, namun proses itu sendiri masih belum sepenuhnya dimengerti (Gunawan, 1987). Dengan menggunakan teknik lanjut kultur jaringan, langkah pertama yang harus dilakukan adalah percobaan regenerasi tanaman dari kalus. Penelitian ini merupakan usaha mendapatkan kondisi kultur yang baik untuk mendorong tumbuhnya sel kalus kemudian bermacamnya menjadi tanaman utuh, karena menurut Thorpe (1982) hilangnya kemampuan morfogenesis sel tidak selalu disebabkan oleh faktor genetik, tetapi kerap kali disebabkan oleh faktor fisiologis.

### Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pembentukan kalus dan regenerasi kalus tebu (*Saccharum officinarum* L.) varietas F 154 dalam kultur *in vitro*.

## TINJAUAN PUSTAKA

### Botani Tanaman Tebu

#### Sistematika Tanaman Tebu

Menurut Hutchinson (1973) sistematika tanaman tebu adalah sebagai berikut :

- Divisi : Spermatophyta
- Anak Divisi : Angiospermae
- Kelas : Monocotyledonae
- Bangsa : Graminales
- Suku : Graminae (Poaceae)
- Anak Suku : Panicoideae
- Puak : Androponeae
- Anak Puak : Saccharinae
- Marga : *Saccharum*
- Jenis : *Saccharum officinarum* L.

#### Deskripsi Tebu Varietas F 154

Varietas F 154 merupakan varietas introduksi dari Taiwan dan dimasukkan ke dalam nomor koleksi BZ (Buitenlandse Zaadrietsoorten), yaitu BZ 132. Varietas ini dilepas sebagai varietas unggul baru oleh Menteri Pertanian dengan SK No 180/Kpts/Um/3/1982 pada tanggal 22 Maret 1982 sebagai usaha pemerintah untuk mengembangkan jenis tebu unggul yang mempunyai produksi lebih tinggi daripada

varietas komersial yang ada (Darmodjo, Soejoto, Mirzawan, dan Soeprijanto, 1983).

Tebu varietas F 154 (BZ 132) merupakan hasil persilangan antara PT 51-213 dengan PT 43-52. Ciri-ciri pengenal dan keunggulan varietas tebu ini menurut Sastrowijono (1982) dan berdasarkan edaran Bagian Pemuliaan Balai Penelitian Perusahaan Perkebunan Gula (BP3G) adalah sebagai berikut (Gambar 1) :

**Daun.** Helai daun berwarna hijau kekuningan dengan ukuran lebar daun yang sedang. Ujung-ujung tajuk daun melengkung kira-kira seperempat dari panjang helai daun.

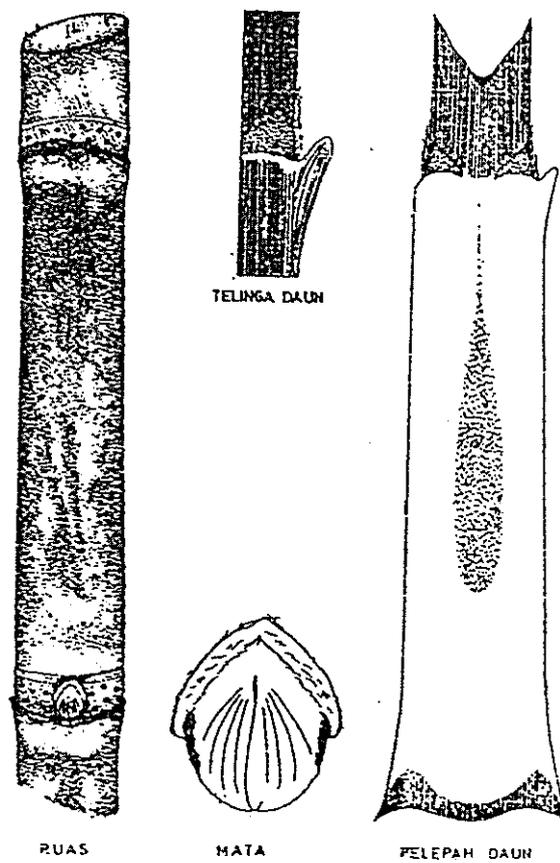
Pada bagian punggung pelepah daun terdapat bulu-bulu lebat yang panjangnya lebih dari 3 mm dengan kedudukan tegak dan rapat. Tidak mempunyai telinga daun, walaupun ada kedudukannya lemah dengan kedudukan miring.

**Batang.** Batang terdiri dari ruas-ruas yang tersusun lurus dengan bentuk silindris dan dengan penampang melintang bulat. Warna ruasnya merah keunguan dengan lapisan lilin sedang. Alur mata dan retak-retak gabus tidak ada. Di tengah-tengah ruas terdapat lubang-lubang kecil. Tinggi batang berkisar antara 3.43 sampai 3.68 m, bobot batangnya 0.57 sampai 0.65 kg/m dengan jumlah batang 76 000 buah/ha.

**Mata.** Mata berbentuk bulat telur dengan sayap mata berpangkal di bawah tengah-tengah tepi mata dengan ukuran

sama besar (rata).

Untuk lahan kering diperoleh hasil tebu sebanyak 55.2 sampai 93.0 ton/ha, hasil hablurnya 4.9 sampai 8.9 ton/ha dan dengan rendemen berkisar antara 8.82 sampai 9.07%.



F 154 (BZ 132)

Gambar 1. Tebu Varietas F 154

Varietas tebu ini disebut varietas unggul harapan, karena bersifat lebih stabil dibandingkan beberapa varietas tebu lain, seperti Ps 30, Ps 41 dan lain-lain (Mirzawan, 1980). Untuk lahan sawah, varietas ini menghasilkan hablur lebih unggul kira-kira 6.5% terhadap Ps 41, 10% terhadap Ps 30 dan 45% terhadap POJ 3016 (Darmodjo *et al*, 1983). Varietas ini tahan terhadap hama penggerek pucuk dan penggerek batang serta tahan terhadap penyakit mosaik dan blendok, walaupun agak peka terhadap pokahbung.

Kelebihan lain varietas ini adalah dapat diusahakan secara ekonomis sebagai tanaman keprasan dan kemampuannya untuk menyesuaikan diri terhadap berbagai tipe iklim, dan jenis tanah.

### **Syarat Hidup Tebu**

Menurut Sudiatso (1980) tanaman tebu tumbuh baik di daerah beriklim panas di tropika dan subtropika di sekitar katulistiwa sampai garis isotherm 20°C, yaitu di antara 39° Lintang Selatan sampai dengan 35° Lintang Utara.

Tanaman tebu dapat ditanam di daerah dataran rendah sampai dengan daerah pegunungan dengan ketinggian di atas permukaan laut sekitar 1 000 meter. Di daerah pegunungan yang suhunya rendah, tebu lambat tumbuh dan rendemennya rendah (Sudiatso, 1980). Barnes (1964) menyatakan bahwa pada suhu kurang dari 21°C pertumbuhan tebu terhambat,

bahkan apabila suhu tanah turun sampai 16°C maka pertumbuhan tebu dapat terhenti.

Tebu membutuhkan banyak air dalam masa pertumbuhannya, sedangkan ketika tebu telah masak dan siap dipanen keadaan yang dikehendaki ialah kering dan tidak ada hujan. Dari hal diatas dapat diketahui bahwa tebu menghendaki adanya perbedaan nyata antara musim hujan dan musim kemarau (Sudiatso, 1980).

### **Kultur Jaringan Tebu**

#### **Kultur Jaringan Tebu**

Kultur jaringan adalah teknik untuk menumbuhkan jaringan dari bagian tanaman pada medium buatan dalam keadaan steril. Perkembangan kultur jaringan ini didasari oleh adanya sifat totipotensi, yang berarti bahwa setiap unit sel tanaman mampu menurunkan sifat dan mempunyai potensi yang sama dengan induknya. Peranan kultur jaringan antara lain menyangkut perbanyakan klonal, penciptaan varietas unggul dan peningkatan mutu tanaman (George dan Sherrington, 1984).

Menurut Heinz, Krishnamurthi, Nickell dan Maretzki (1977) penelitian kultur sel dan jaringan tebu pertama kali dilakukan oleh Nickell pada tahun 1961 di Hawaii untuk mempelajari aspek fisiologis dari jaringan parenkim yang matang dari klon tebu H 50-7209 yang diseleksi untuk

menghasilkan kalus. Kemudian kalus yang dihasilkan diisolasi untuk penelitian-penelitian tebu selanjutnya.

Menurut Liu (1981), Taiwan Sugar Research Institute (TSRI) telah menjalankan program teknik kultur jaringan untuk perbaikan sifat-sifat tebu yang dimulai sejak tahun 1970, kemudian diikuti oleh institut-institut lain di Florida, Louisiana dan Maryland di Amerika Serikat, Perancis dan Fiji untuk melakukan penelitian yang sama seperti TSRI untuk mencari jenis tebu yang unggul dan resisten terhadap hama dan penyakit tebu.

Heinz *et al* (1977) menyatakan bahwa penelitian kultur jaringan tebu bertujuan untuk mengamati variabilitas genetik yang terjadi pada kultur sel dan tanaman hasil regenerasinya, kultur kalus untuk mencari variabilitas genetik yang tahan terhadap penyakit, kultur untuk memperoleh tanaman dengan kandungan gula yang tinggi, mengamati organogenesis dan embriogenesis pada kalus, dan sebagainya.

#### **Sterilisasi Bahan Tanaman**

Dalam kultur jaringan, inisiasi kultur yang bebas dari kontaminan merupakan langkah yang penting. Bahan tanaman yang berasal dari lapangan banyak mengandung debu, kotoran dan berbagai kontaminan lainnya. Pada beberapa tanaman ditemukan juga kontaminan bakteri atau cendawan yang berasal dari dalam jaringan tanaman itu sendiri.

Kontaminasi internal seperti ini sulit diatasi, karena sterilisasi permukaan tidak menyelesaikan masalah. Tanaman yang mengandung kontaminan internal harus diberi perlakuan antibiotik atau fungisida sistemik, tetapi penggunaan antibiotika dengan konsentrasi tinggi selain dapat menyebabkan mikroorganisma menjadi resisten, juga dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Setiap bahan tanaman mempunyai tingkat kontaminasi yang berbeda-beda sehingga untuk setiap bahan tanaman harus ditentukan cara sterilisasi yang tepat melalui percobaan pendahuluan (Gunawan, 1987; Pierik, 1987).

Menurut Bhojwani dan Razdan (1983) senyawa kimia yang biasa digunakan untuk sterilisasi bahan tanaman adalah sodium hipoklorit, kalsium hipoklorit, etil alkohol dan isopropil alkohol. Konsentrasi sterilan dan lamanya perlakuan digunakan selama tidak mematikan jaringan itu sendiri.

Irvine (1985) menggunakan sodium hipoklorit 20% selama 20 menit untuk mensterilkan tebunya, sedangkan Tatt dan Abdul Rahman (1975) menggunakan sodium hipoklorit 10% selama 30 menit. Dalam penelitiannya Heinz dan Mee (1969) menggunakan etil alkohol 95% selama satu menit, fenil merkuri asetat selama 4 menit kemudian kloroks 20% selama 10 menit.

### Medium yang Digunakan

Menurut Gunawan (1987), medium Murashige dan Skoog (MS) dibuat untuk kultur kalus tembakau, tetapi komposisi medium ini ternyata mendukung kultur jaringan banyak tanaman lain pula. Medium MS ini paling banyak digunakan untuk berbagai tujuan kultur, walaupun kebutuhan nutrisi jaringan dalam *in vitro* tidak sama untuk setiap jenis tanaman.

Menurut Heinz *et al* (1977) medium yang umum digunakan untuk pertumbuhan kultur sel dan jaringan tebu adalah modifikasi medium White dan MS dengan penambahan air kelapa, ragi atau tomat. Menurut Barba dan Nickell (1969) medium White memang baik untuk pertumbuhan jaringan tebu, tetapi tidak baik untuk menginduksi perakaran dan pertunasan. Untuk subkultur yang dilakukan lebih dari satu kali dengan menggunakan medium ini biasanya kalus yang terbentuk tidak dapat berdiferensiasi, walaupun konsentrasi auksinnya dikurangi.

Untuk pembentukan kalus tebu digunakan medium MS yang dimodifikasi yang disebut MS-C, medium ini merupakan Medium MS yang mengandung 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asam asetat), air kelapa dan mio-inositol. Sedangkan untuk regenerasi kalus menjadi tunas digunakan medium MS-D, yaitu medium MS yang dimodifikasi dengan penambahan 1 mg/l kinetin, 1 mg/l Naftalena Asam Asetat (NAA), dan 400 mg/l

kasein hidrolisat. Untuk menumbuhkan akar dari tunas digunakan medium Schenk Hildebrandt (SH) yang telah terbukti baik (Liu, 1981).

#### Zat Pengatur Tumbuh

Induksi kalus pada tumbuhan monokotil memerlukan auksin dalam konsentrasi tinggi, dan biasanya digunakan 2,4-D. Sedangkan untuk regenerasi kalus digunakan konsentrasi 2,4-D dengan konsentrasi lebih rendah atau 2,4-D diganti dengan auksin yang lebih lunak seperti Indol Asam Asetat (IAA) atau NAA. Kebanyakan spesies tanaman dapat beregenerasi tanpa tambahan sitokinin asal konsentrasi auksinnya rendah (Liu, 1981). Suprptopo (1987) berpendapat bahwa untuk inisiasi kalus tebu 2,4-D yang digunakan memiliki selang konsentrasi yang cukup luas, yakni dari 1 sampai 8 mg/l, bahkan sampai 20 mg/l. IAA kurang dapat berfungsi dalam pembentukan kalus sebab dari konsentrasi 1 sampai 8 mg/l IAA yang digunakan tidak ada yang mampu mendorong terbentuknya kalus dengan baik.

Heinz dan Mee (1969) melaporkan bahwa pertumbuhan jaringan kalus tercepat terjadi pada medium MS yang mengandung 3 ppm 2,4-D. Menurut Ernawati (1985) pertumbuhan kalus tercepat dengan penambahan 2,4-D pada konsentrasi 3 dan 6 ppm tanpa kinetin. Sedangkan jumlah tunas terbanyak diperoleh dari penambahan 1 ppm 2,4-D dan 1 ppm kinetin.

Penelitian yang dilakukan Barba dan Nickell (1969) menunjukkan bahwa pengaruh pemberian 2,4-D dengan konsentrasi 0; 0.05; 0.5 dan 5.0 mg/l memberikan reaksi yang berbeda pada varietas yang berbeda. Heinz dan Mee (1969) melaporkan bahwa diferensiasi kalus terjadi dengan memin-dahkannya pada media yang tidak mengandung 2,4-D.

### **Eksplan**

Eksplan dapat diambil dari hampir semua jaringan te-bu, seperti jaringan parenkim tunas puncak, daun muda dan perbungaan (Heinz dan Mee, 1969).

Menurut Liu (1984) jaringan eksplan yang dapat dipa-kai adalah meristem subapikal yang meliputi ruas satu sam-pai delapan, bagian dalam gulungan daun muda di atas tunas apeks yang panjangnya 2-3 cm, bagian perbungaan yang masih tertutup sarung daun yang dapat dipetik dengan catut.

Sastrowijono (1976) pada penelitiannya menggunakan eksplan upih daun muda yang masih menggulung dari tanaman tebu berumur tiga bulan setelah tanam. Sedangkan Suprap-topo (1987) menggunakan upih daun muda dari tanaman yang berumur tujuh bulan setelah tanam. Dari ketebalan irisan jaringan yang berkisar 1 sampai 16 mm, ternyata potongan jaringan 2 mm menghasilkan tingkat pertumbuhan yang pa-ling tinggi dibandingkan dengan tebal potongan jaringan yang lain.

### Lingkungan Tumbuh

Setelah dilakukan penanaman pada botol kultur, maka Liu (1981) menyimpan kultur dalam ruangan yang mempunyai suhu 26°C sampai 28°C di bawah lampu neon dengan intensitas cahaya sebesar 3 870 lux selama 12 jam setiap harinya. Sedangkan Suprptopo (1987) memelihara kultur tebunya dalam ruangan kultur dengan suhu 22°C sampai 26°C dengan sinar berintensitas antara 500 sampai 1 000 lux selama 24 jam setiap harinya.

Kelembaban relatif pada ruangan kultur umumnya berkisar antara 70 sampai 80% (George dan Sherrington, 1984). Kelembaban relatif dibawah 50% dapat menyebabkan kultur menjadi lebih cepat kering, sedangkan jika kelembaban relatifnya terlalu tinggi kontaminasi akan lebih banyak terjadi (Bhojwani dan Razdan, 1983).

### Perkembangan Eksplan

Inisiasi kalus terjadi kira-kira empat hari setelah penanaman. Sel-sel kalus merupakan kumpulan sel yang tidak teratur dan tidak berdiferensiasi serta muncul dari jaringan floem. Kira-kira enam minggu kemudian kalus tersebut akan berakumulasi membentuk massa kalus (Liu, 1984), sedangkan Heinz dan Mee (1969) melaporkan bahwa munculnya kalus bervariasi menurut perlakuan, berkisar dari dua sampai enam minggu setelah tanam. Kalus tersebut muncul dari

bagian permukaan eksplan yang terkena irisan. Inisiasi kalus ini ditandai dengan munculnya bintik-bintik putih, kemudian menyebar ke seluruh permukaan eksplan. Kalus dapat tumbuh dengan tekstur yang mengeras (kompak) atau mudah pecah menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Pertumbuhan kalus mudah pecah ini dinamakan kalus friabel.

Menurut Liu (1981) perbungaan dan daun muda mempunyai kapasitas terbesar untuk membentuk kalus dan dapat beregenerasi tanpa perlu dipindah pada medium diferensiasi. Selama lima sampai enam minggu pertumbuhan, massa kalus dapat dipindahkan ke dalam medium lain untuk proliferasi kalus atau dipindahkan ke medium diferensiasi untuk lebih memacu regenerasi kalus menjadi tanaman (Dodds dan Roberts, 1982).

Setelah dipindahkan ke medium diferensiasi, kira-kira 10 sampai 15 hari kemudian terlihat ada bintik-bintik berwarna hijau pada permukaan kalus. Ini merupakan titik tumbuh dengan primordia daun, dan secara perlahan-lahan akan berubah menjadi tunas. Selanjutnya tiga sampai empat minggu kemudian permukaan sel tertutup oleh tunas hijau (Liu, 1981). Sedangkan Ernawati (1985) mendapati bahwa tidak semua kalus mampu membentuk tunas dan ada pula tunas yang telah terbentuk mengalami dediferensiasi membentuk kalus kembali. Suprptopo (1987) menemukan bahwa satu minggu setelah kalus dipindahkan ke medium diferensiasi



biasanya timbul bintik-bintik berwarna merah keunguan. Bintik-bintik tersebut berubah menjadi hijau dan kemudian tampak adanya tunas yang tumbuh.

Menurut Heinz dan Mee (1969) diferensiasi tunas atau akar langsung dari kalus tebu mudah didapat, tetapi untuk mendapatkan akar dari diferensiasi tunas lebih sulit. Re-generasi tanaman yang terjadi apakah tunas dan akar yang didapat atau hanya tunas dan akar saja tergantung dari klon itu sendiri. Liu (1984) telah berhasil mencapai re-generasi akar dengan menggunakan medium Schenk dan Hildebrandt (SH). Akar terbentuk kira-kira 13 hari setelah dilakukan pemindahan dari medium modifikasi MS yang berhasil merangsang timbulnya tunas.

### **Pencoklatan**

Yang menjadi masalah menurut Liu (1981) adalah cara mengurangi eksudat coklat yang sering terjadi pada kultur tebu yang menghambat pertumbuhan eksplan dan kalus sehingga kultur tebu tidak dapat bertahan hidup. Warna coklat terjadi pada jaringan yang baru dipotong, akibat reaksi senyawa fenol pada jaringan dengan oksigen membentuk kuinon dengan dikatalisasi oleh enzim polifenol oksidase. Kuinon bersifat toksik terhadap mikroorganisma dan dapat menghambat pertumbuhan jaringan. Beberapa cara yang digunakan untuk mengurangi pencoklatan adalah penggunaan

sistein, menyimpan kultur di tempat gelap selama beberapa waktu, menggunakan arang aktif, menggunakan medium cair, mempersering subkultur pada medium baru dan penambahan senyawa antioksidan, seperti asam sitrat. Suhu rendah dapat digunakan untuk menghambat aktivitas enzim, sehingga diharapkan dengan adanya suhu dingin aktivitas enzim polifenol oksidase dan tyrosinase dapat dihambat. Kondisi suhu rendah yang cocok ini berbeda-beda untuk setiap jenis tanaman dan tujuan kultur (Pierik, 1987; George dan Sherrington, 1984).

## **BAHAN DAN METODE**

### **Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Juni 1990 sampai dengan bulan Maret 1991, bertempat di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

### **Metode**

#### **Persiapan Peralatan**

Peralatan laboratorium seperti botol kultur dan cawan petri dicuci dengan air sabun hingga bersih dan kemudian dibilas dengan air. Botol-botol dan cawan petri tersebut bersama-sama dengan kertas alumunium dan alat diseksi dimasukkan ke dalam autoklaf selama satu jam pada tekanan 15 psi dan suhu 121<sup>o</sup> dan siap digunakan sewaktu-waktu. Sedangkan peralatan lain seperti pipet, gelas piala dan pengaduk cukup dibilas dengan air bersih saja tanpa dimasukkan ke dalam autoklaf.

#### **Pembuatan Medium**

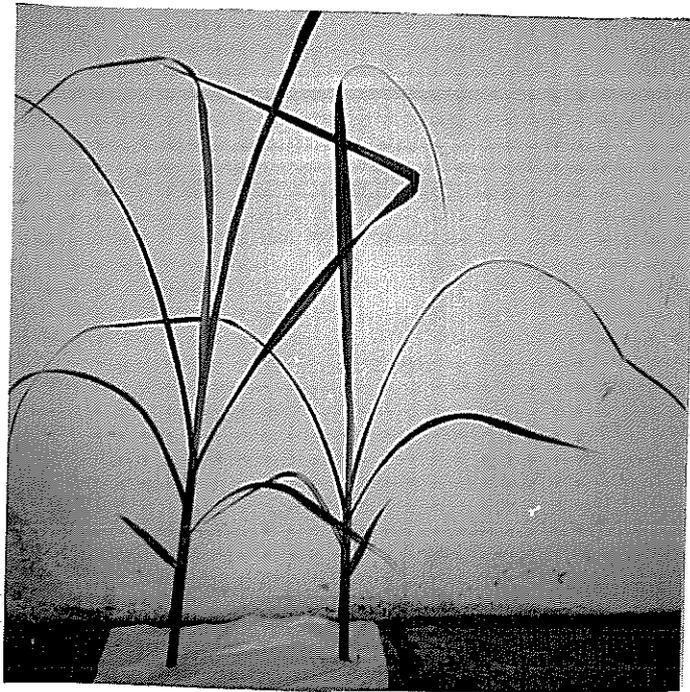
Larutan-larutan baku dikeluarkan dari lemari pendingin. Gelas piala berukuran satu liter diisi sepertiganya dengan akuades. Kemudian larutan baku ditambahkan ke dalam gelas piala sebanyak yang tercantum dalam Tabel Lampiran 1 dengan menggunakan pipet. Campuran di aduk setiap

penambahan larutan baku. Sukrosa dan air kelapa ditambahkan ke dalam gelas piala dan di aduk sampai larut seluruhnya, kemudian ditambahkan akuades secukupnya sampai volume total mencapai satu liter. Larutan itu diukur nilai pHnya dengan menggunakan pH-meter hingga tercapai nilai 5.7 dengan menambah setetes demi setetes larutan HCl 1 N atau NaOH 1 N. Campuran tadi ditambahkan pada agar dan dipanaskan sambil diaduk sampai merata pada penangas air. Setelah itu medium panas dituangkan ke dalam botol kultur kira-kira 20 ml dan kemudian ditutup dengan kertas aluminium. Botol-botol itu disterilkan dalam autoklaf pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C selama 15 menit. Botol-botol berisi medium itu disimpan selama beberapa hari untuk dilihat kesterilannya.

#### **Sterilisasi Bahan Tanaman**

Sterilisasi bahan tanaman yang merupakan tunas tebu yang berupa gulungan daun muda yang masih menggulung dan berumur dua bulan (Gambar 2) dilakukan dengan cara mencucinya dengan air sabun lalu dibilas dengan air sampai bersih. Setelah itu gulungan daun diseka dengan alkohol 70% sambil dilepas helai demi helai daunnya sampai tersisa beberapa gulungan daun terdalam yang berwarna putih kehijauan. Untuk memudahkan perendaman, gulungan itu dipotong-potong menjadi potongan dengan ukuran 2 sampai 4 cm.

Potongan-potongan itu direndam dalam larutan kloroks komersial (5.25% NaOCl) 10% selama 15 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali.



Gambar 2. Tunas Tebu Varietas F 154 Umur Dua Bulan

### Penanaman

Setelah disterilisasi bahan tanaman tersebut dipotong-potong melintang dengan ukuran kira-kira 0.5 cm, kemudian eksplan itu ditanam pada medium MS yang telah disiapkan. Masing-masing botol berisi satu eksplan. Penanaman dilakukan secara aseptik di dalam kotak pindah yang telah disinari sinar UV selama satu malam. Kultur dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 8°C dan gelap selama

nol hari dan tiga hari pertama, kemudian dipindahkan ke ruangan kultur yang bersuhu 25°C-27°C dengan intensitas cahaya sebesar 800-1 000 lux selama 16 jam setiap harinya.

### **Perlakuan**

Perlakuan yang diberikan pada percobaan ini adalah konsentrasi 2,4-D dengan tiga taraf yaitu 4 mg/l, 6 mg/l, dan 8 mg/l dikombinasikan suhu dingin (8°C) selama nol hari dan tiga hari pertama. Masing-masing perlakuan dilakukan ulangan 10 kali sehingga seluruhnya terdapat 60 satuan percobaan.

Setelah kalus yang terbentuk berumur 12 minggu, kalus itu dipindahkan ke medium regenerasi yang komposisinya dicantumkan pada Tabel Lampiran 1.

### **Pengamatan**

Peubah yang diamati adalah persentase pencoklatan, warna kalus, waktu timbulnya kalus, persentase timbulnya kalus, waktu munculnya tunas dan akar yang terbentuk dari kalus, persentase timbulnya tunas dan akar dari kalus. Pengamatan dilakukan secara visual dan dilakukan setiap minggu. Hasil yang diperoleh tidak diolah secara statistik karena sulit untuk mendapatkan jaringan yang seragam.

**Perhitungan**

Perhitungan persentase jaringan eksplan yang mencoklat adalah :

$$\frac{\text{Jumlah Eksplan yang Mencoklat}}{\text{Jumlah Ulangan Setiap Perlakuan}} \times 100\%$$

Untuk perhitungan persentase timbulnya kalus adalah :

$$\frac{\text{Jumlah Eksplan yang Berkalus}}{\text{Jumlah Ulangan Setiap Perlakuan}} \times 100\%$$

Sedangkan untuk perhitungan persentase pembentukan tunas atau akar adalah :

$$\frac{\text{Jumlah Kalus yang Berakar/Bertunas}}{\text{Jumlah Kalus Setiap Perlakuan}} \times 100\%$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan Eksplan

Pada saat penanaman eksplan berwarna putih kehijauan. Pada beberapa eksplan terlihat ada yang mengalami pemanjangan jaringan dan beberapa membuka gulungan. Pemanjangan jaringan mulai terjadi kira kira satu minggu setelah tanam. Jaringan yang hidup terlihat dari kesegaran eksplan itu dan kemampuan berinisiasi membentuk kalus. Kematian eksplan yang ditanam biasanya dimulai sejak beberapa hari sampai empat minggu setelah tanam.

Tabel 1. Persentase Kematian Jaringan pada Umur Empat Minggu Setelah Tanam

Perlakuan (mg/l 2,4-D dan suhu 8°C)	Kematian Eksplan (%)
4, tanpa suhu dingin	40
6, tanpa suhu dingin	20
8, tanpa suhu dingin	30
4, suhu dingin	70
6, suhu dingin	50
8, suhu dingin	60

Pada minggu ke empat persentase kematian jaringan berkisar antara 20 sampai 70%. Pada perlakuan suhu dingin kematian jaringan lebih tinggi dibandingkan tanpa suhu

dingin (Tabel 1). Ini diduga ada hubungannya dengan perlakuan suhu dingin yang diberikan pada awal percobaan. Suhu dingin dapat menekan aktivitas kerja enzim sehingga proses metabolisme tidak terjadi dan akibatnya pertumbuhan jaringan terhambat.

Selain disebabkan adanya perlakuan suhu rendah kematian eksplan yang terjadi disebabkan oleh beberapa hal, antara lain pekanya jaringan eksplan, kontaminasi dan pencoklatan.

Konsentrasi bahan pensteril yang terlalu keras atau waktu sterilisasi yang terlalu lama untuk beberapa bagian eksplan dapat mematikan jaringan. Hal ini dapat terlihat dari warnanya yang putih kecoklatan dan tidak segar. Keadaan ini tidak mengalami perubahan setelah beberapa waktu lamanya. Sedangkan Jaringan yang hidup berwarna putih kehijauan segar, walaupun pada beberapa waktu kemudian ada yang mengalami pencoklatan atau terkontaminasi oleh mikroorganisme. Kemungkinan lain memang bagian jaringan eksplan yang digunakan terlalu peka terhadap bahan pensteril yang diberikan pada percobaan ini, sehingga tingkat persentase tingkat kematian cukup tinggi.

Kematian eksplan lainnya disebabkan oleh kontaminasi. Adanya kontaminasi oleh bakteri atau cendawan ini dapat segera terlihat dua sampai tiga hari setelah tanam. Hal

ini dilihat berdasarkan koloni yang terbentuk. Kontaminasi dimulai dari eksplan dan segera menyebar memenuhi medium. Penyelamatan eksplan dengan subkultur atau mensterilisasi kembali dan meletakkannya pada medium baru tidak memperbaiki keadaan, karena beberapa hari kemudian kontaminasi terjadi kembali. Kemungkinan bakteri atau cendawan ini memang telah terkandung dalam jaringan tebu itu sendiri sehingga sulit diatasi. Untuk menghindari kontaminasi internal, jika tunas yang telah dipotong-potong terdapat noda atau garis-garis kecoklatan, maka potongan tunas itu tidak digunakan sebagai eksplan. Potongan tunas itu diduga sudah mengandung mikroorganisma. Menurut Gunawan (1987) kontaminasi internal seperti ini harus diberi perlakuan antibiotik atau fungisida sistemik. Sterilisasi seperti ini sulit dilakukan karena antibiotik bersifat spesifik untuk jenis tertentu, sedangkan bakteri penyebab kontaminasi tidak diketahui jenisnya.

Terjadinya pencoklatan. Pencoklatan yang terjadi pada jaringan yang terluka yang dapat merubah medium menjadi coklat dan bersifat toksik terhadap jaringan. Pencoklatan ini terjadi melalui aksi enzim polifenol oksidase yang dibentuk ketika jaringan dilukai berada dalam keadaan oksidatif (George dan Sherrington, 1984).

Pencoklatan terjadi pada semua perlakuan. Pencoklatan ini terlihat sejak beberapa hari setelah tanam, sehing-

ga pada umur 12 minggu setelah tanam persentase jaringan mencoklat seperti ditunjukkan dalam Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Persentase Pencoklatan yang Terjadi pada Eksplan pada Umur 12 Minggu Setelah Tanam

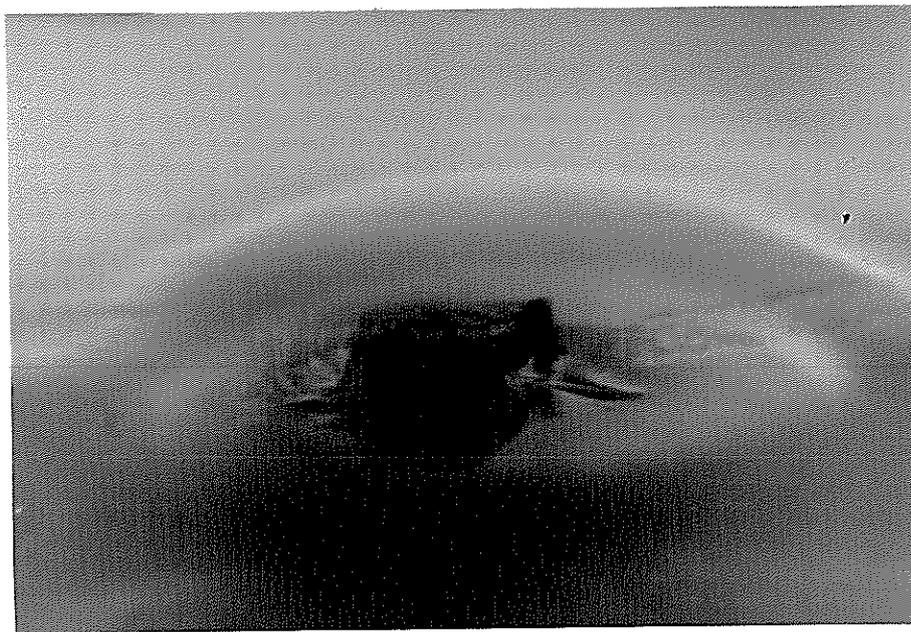
Perlakuan (mg/l 2,4-D dan suhu 8°C)	Persentase (%)
4, tanpa suhu dingin	40
6, tanpa suhu dingin	50
8, tanpa suhu dingin	30
4, suhu dingin	20
6, suhu dingin	10
8, suhu dingin	30

Keterangan : tiap perlakuan terdiri dari 10 ulangan

Berdasarkan hasil pengamatan diperoleh bahwa perlakuan suhu dingin (8°C) selama tiga hari pertama menyebabkan jaringan mencoklat lebih sedikit dibandingkan persentase jaringan dari perlakuan tanpa suhu dingin. Hal ini sesuai dengan pendapat George dan Sherington (1984) bahwa pencoklatan dapat dikurangi atau dicegah bila jaringan diletakkan di ruang gelap selama beberapa waktu sebelum dipindahkan ke tempat biasa, karena baik aktivitas maupun biosintesis enzim polifenol oksidase akan bertambah dengan adanya cahaya. Enzim yang terdapat pada jaringan akan terhambat atau terhenti aktivitasnya bila enzim tersebut peka

terhadap suhu rendah. Nampaknya enzim yang bertanggung jawab dalam proses biosintesis dan oksidasi senyawa polifenol oksidase termasuk dalam golongan ini. Itulah sebabnya persentase jaringan yang mencoklat pada perlakuan suhu dingin relatif lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan tanpa suhu dingin.

Pencoklatan menyebabkan eksplan menjadi coklat tua atau kehitaman dan mediuipun menjadi coklat. Pencoklatan ini menghambat pertumbuhan eksplan, bahkan menyebabkan kematian eksplan dan kalus yang terbentuk. Gambar 3 menunjukkan eksplan yang mengalami pencoklatan.



Gambar 3. Eksplan yang Mengalami Pencoklatan pada Umur Lima Minggu Setelah Tanam

### Inisiasi Kalus

Terjadinya kalus dimulai sekitar minggu pertama sampai minggu keempat setelah tanam, tergantung pada perlakuannya. Pembentukan kalus terjadi pada jaringan yang terluka, yaitu pada bagian irisan dan pada permukaan eksplan. Awal pembentukan kalus ditandai dengan adanya bintik-bintik berwarna putih yang semakin lama bertambah banyak membentuk massa yang berwarna putih, putih kemerahan atau putih kehitaman tergantung pada perlakuannya (Tabel 3). Kalus dalam kultur *in vitro* ini menurut Gunawan (1987) adalah suatu kumpulan sel *amorphous* yang terjadi pada sel-sel jaringan awal yang membelah diri secara terus menerus dari potongan organ yang steril dalam media yang mengandung auksin. Sel-sel penyusun kalus merupakan sel-sel parenkim yang mempunyai ikatan yang renggang antara satu sel dengan sel lain.

Kalus yang terbentuk pada umumnya bertekstur kompak (mengeras). Pembentukan kalus pada eksplan hanya terjadi pada perlakuan 2,4-D 6 mg/l dan 8 mg/l tanpa suhu dingin dan 6 mg/l dengan suhu 8°C selama 3 hari pertama. Perlakuan 2,4-D 4 mg/l sama sekali tidak menghasilkan kalus, walaupun eksplannya tetap segar. Diduga hal ini disebabkan konsentrasi 2,4-D tersebut belum dapat merangsang pembentukan kalus pada tebu varietas F 154 (BZ 132), walaupun menurut Barba dan Nickell (1969) 2,4-D dengan konsentrasi

yang lebih rendah dari 4 mg/l pada beberapa varietas tebu dapat menyebabkan timbulnya kalus. Diketahui bahwa fungsi auksin mendorong pembentukan kalus, meskipun konsentrasi yang digunakan berbeda untuk setiap jenis ataupun varietas tanaman. Auksin 2,4-D ini merupakan jenis yang paling banyak dipakai pada berbagai tanaman karena sifatnya yang efektif untuk menginduksi pembentukan kalus (Suprpto, 1987). Pada tanaman Monokotil, terutama rumput-rumputan kalus memang lebih sulit diinduksi (George dan Sherrington, 1984).

Tabel 3. Persentase Inisiasi Kalus, Saat Muncul dan Warna Kalus pada Umur 12 Minggu Setelah Tanam

Perlakuan (mg/l 2,4-D dan Suhu 8°C)	Kalus		
	%	Saat Muncul (Minggu ke-)	Warna
4, tanpa suhu dingin	0	-	-
6, tanpa suhu dingin	30	2	putih ke- hitaman
8, tanpa suhu dingin	40	1-3	putih
4, suhu dingin	0	-	-
6, suhu dingin	30	4	putih
8, suhu dingin	0	-	-

Keterangan : tiap perlakuan terdiri dari 10 ulangan

Dari hasil pengamatan juga diperoleh bahwa walaupun pencoklatan berkurang tetapi kalus yang terbentuk relatif lebih sedikit pada perlakuan suhu dingin, mungkin adanya suhu dingin ini menyebabkan pertumbuhan jaringan menjadi terhambat. Menurut Prawiranata *et al* (1988) enzim adalah katalisator reaksi-reaksi yang terjadi dalam jaringan. Suhu yang terlalu rendah dapat menghentikan aktivitas enzim, sehingga proses metabolisme jaringan menjadi terhambat.

Pada perlakuan 2,4-D 8 mg/l suhu dingin ternyata kalus tidak dihasilkan sama sekali, padahal pada perlakuan tanpa suhu dingin kalus yang dihasilkan cukup banyak. Ini diduga selain karena pengaruh perlakuan suhu dingin, juga potongan eksplan yang digunakan merupakan jaringan yang daya tumbuhnya rendah dibandingkan potongan eksplan lainnya, sehingga eksplan itu tidak tumbuh seperti halnya pada perlakuan lainnya. Menurut Pierik (1987) eksplan yang sama tetapi posisi yang digunakan berbeda dapat memberikan hasil yang berbeda pula.

Warna kalus putih segar diperoleh pada perlakuan 8 mg/l tanpa suhu dingin, sedangkan pada perlakuan 6 mg/l baik tanpa suhu dingin maupun dengan suhu dingin kalus yang terbentuk pada awalnya berwarna putih kehitaman dan sebagian lagi berwarna putih kemerahan (Gambar 4). Hal

ini diduga karena adanya oksidasi fenol yang menyebar dari eksplan ke kalus yang terbentuk.

Secara keseluruhan, berdasarkan persentase timbulnya kalus, saat muncul dan warna kalus yang terbentuk (Tabel 3), disimpulkan bahwa perlakuan 2,4-D 8 mg/l tanpa suhu dingin menghasilkan kalus terbaik dibandingkan dengan perlakuan lain untuk tebu varietas F 154 (BZ 132). Heinz dan Mee (1969) berdasarkan hasil penelitian mereka, mengemukakan bahwa kalus terbaik diperoleh pada medium MS yang mengandung 3 ppm 2,4-D. Apriyanti (1990) menemukan kalus pada medium MS yang mengandung 2,4-D sebanyak 8 mg/l.



Gambar 4. Inisiasi Kalus pada Eksplan Tebu Perlakuan 8 mg/l tanpa Suhu Dingin pada Umur 2 Minggu Setelah Tanam

### Regenerasi Kalus

Setelah ditumbuhkan pada medium inisiasi selama 12 minggu, kalus segera dipindahkan ke medium regenerasi. Pemindehan medium ini dilakukan, karena menurut Tatt dan Abdul Rahman (1975) proses diferensiasi lebih banyak terjadi pada medium dengan konsentrasi auksin yang rendah atau tidak sama sekali. Pada Tabel 4 terlihat bahwa tidak semua kalus yang terbentuk mampu beregenerasi membentuk tunas dan akar. Tunas yang terbentukpun tidak semua mampu tumbuh membesar.

Tabel 4. Regenerasi Kalus Menjadi Tunas dan Akar pada Umur 12 Minggu Setelah Dipindahkan ke Medium Regenerasi

Perlakuan (mg/l 2,4-D dan Suhu 8°C)	Saat Muncul (Minggu ke-)	Kemampuan Bertunas (%)	Kemampuan Berakar (%)
4, tanpa suhu dingin	-	-	-
6, tanpa suhu dingin	2	-	25 (1/4)
8, tanpa suhu dingin	2	60 (6/10)	50 (5/10)
4, suhu dingin	-	-	-
6, suhu dingin	8	-	33.3 (1/3)
8, suhu dingin	-	-	-

Akar yang terbentuk berwarna putih. Pembentukan akar terjadi pada kalus dari perlakuan medium yang mengandung 6 mg/l tanpa maupun dengan suhu dingin dan 8 mg/l tanpa

suhu dingin. Persentase pembentukan akar yang paling tinggi pada perlakuan 8 mg/l tanpa suhu dingin yaitu 50%. Akar-akar itu muncul setelah dua minggu dipindahkan ke medium regenerasi (Gambar 5). Heinz dan Mee (1969) mendapatkan akar pada medium regenerasi setelah berumur empat minggu setelah pemindahan.

Terbentuknya akar ditandai oleh adanya bintik-bintik putih. Selanjutnya bintik-bintik itu membesar membentuk organ putih berbentuk silinder di permukaan kalus. Ukuran akar itu berkisar antara 0.1 sampai 0.4 cm dan karena ukurannya kecil, maka jumlahnya sulit dihitung. Arah pertumbuhan akar-akar itu menuju ke arah atas (geotropisma negatif).

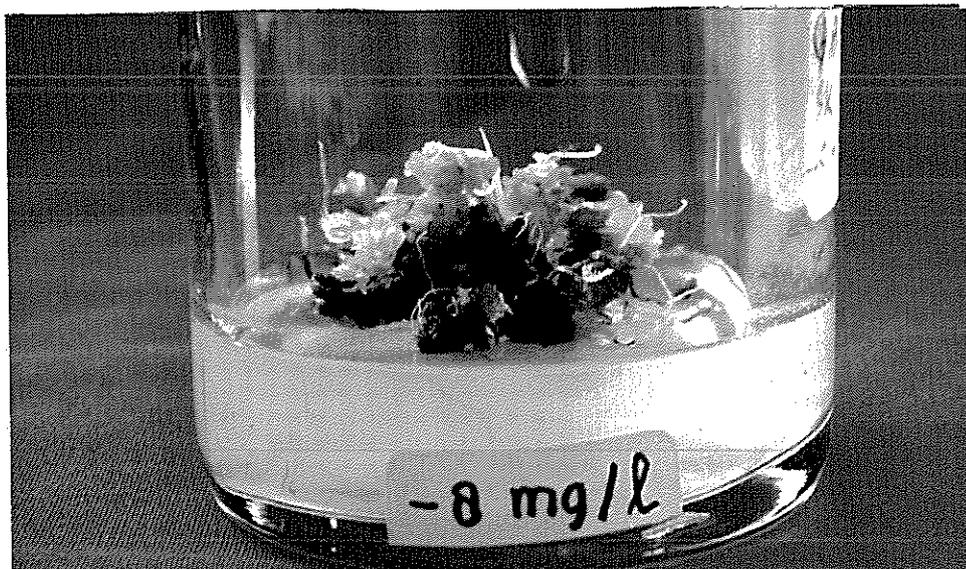
Akar yang terbentuk pada perlakuan 6 mg/l dengan suhu dingin terjadi pada minggu ke delapan. Diduga ini disebabkan adanya pengaruh suhu dingin yang diberikan pada awal kultur sehingga pertumbuhannya relatif lambat.

Tunas yang terbentuk berwarna hijau muda. Pembentukan tunas ini dimulai dengan adanya bintik-bintik hijau keunguan. Bintik-bintik ini makin lama makin menjadi hijau di permukaan kalus (Gambar 6).

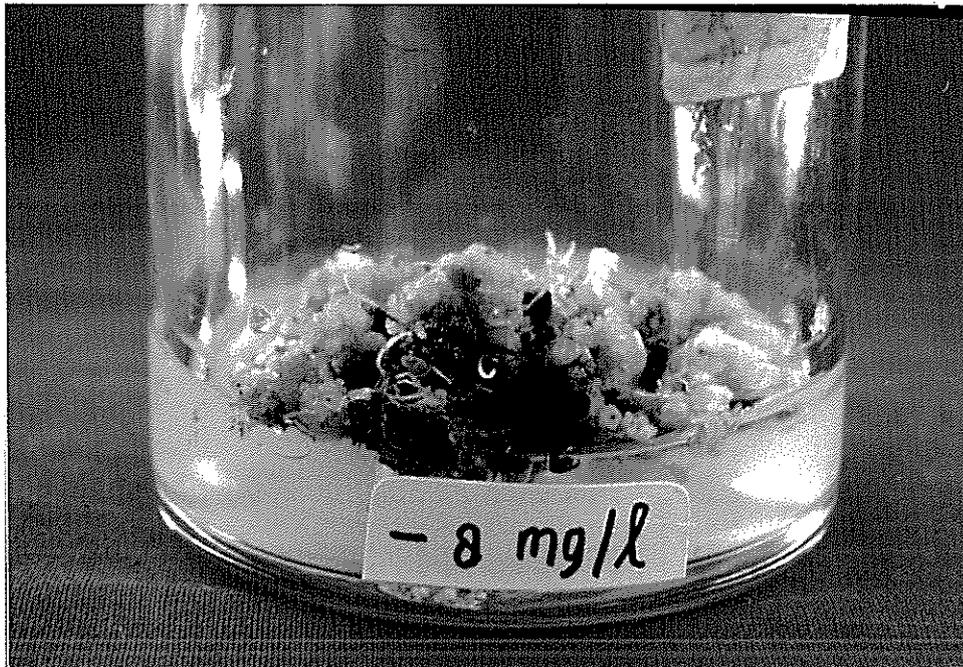
Dibandingkan dengan pembentukan akar, maka pembentukan tunas relatif sedikit, sebab hanya pada perlakuan 8 mg/l tanpa suhu dingin, tunas itu muncul. Tunas-tunas itupun sampai minggu ke-12 belum mampu tumbuh membesar,

tetapi hanya mampu berupa bintik-bintik hijau di permukaan kalus. Menurut Pierik (1987) kalus memang lebih mudah beregenerasi membentuk akar dibandingkan dengan pembentukan tunas.

Menurut Barba dan Nickell (1969) kemampuan regenerasi kalus pada beberapa varietas tebu yang berbeda pada penggunaan komposisi medium yang sama. Vasil (1986) menyatakan bahwa untuk memperoleh regenerasi kalus, eksplan organ muda atau yang masih bersifat meristematik merupakan bahan tanaman yang paling baik digunakan.



Gambar 5. Kalus yang Menumbuhkan Perakaran pada Perlakuan 8 mg/l tanpa Suhu Dingin pada Umur 12 Minggu Setelah Dipindahkan ke Medium Regenerasi



Gambar 6. Kalus yang Mempunyai Bintik-bintik Tunas pada Medium 8 mg/l tanpa Suhu Dingin pada Umur 12 Minggu di Medium Regenerasi

Regenerasi organ yang terjadi di kalus menurut Kohlenbach (1977) tergantung pada beberapa hal, seperti penggunaan jenis auksin dan sitokinin yang digunakan, rasio konsentrasi auksin dan sitokinin yang digunakan, konsentrasi absolut hormon yang digunakan dan pengurangan salah satu unsur atau senyawa pada mediumnya. Sebab lainnya mungkin memang kalus itu sendiri tidak mampu beregene-

rasi akibat pengendalian gennya. Kemungkinan juga bintik-bintik hijau itu tidak mendapatkan nutrisi yang cukup dan baik untuk tumbuh lebih lanjut, karena terhalang oleh kalus yang sebagian besar berwarna kecoklatan. Tatt dan Abdulrahman (1977) berpendapat juga bahwa respon kalus untuk beregenerasi berbeda-beda untuk setiap jenis tebu dan sulit untuk mendapatkan respon yang sama pada jaringan tebu itu.

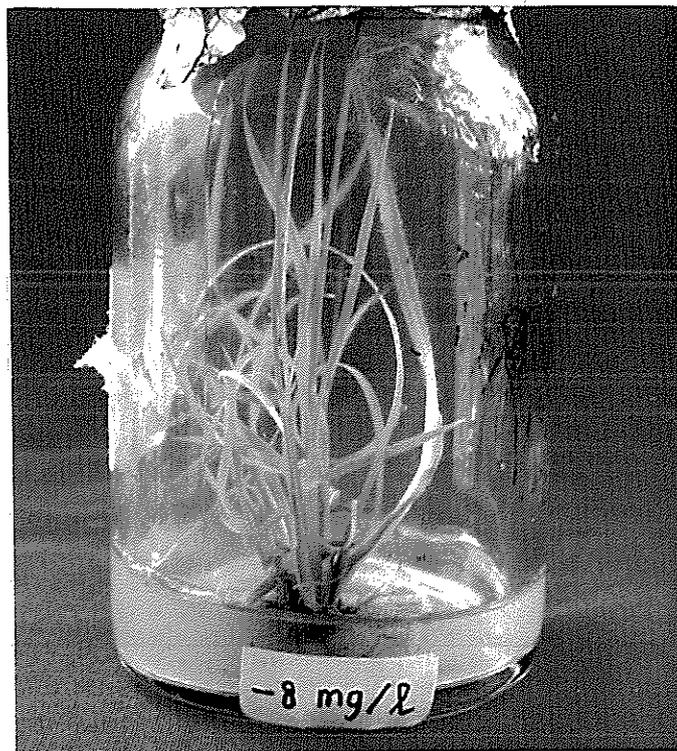
Di dalam medium inisiasi, ada tunas yang tumbuh langsung dari kalus tanpa perlu dipindahkan ke medium regenerasi (Gambar 7a). Tunas terbentuk pada medium dengan perlakuan 6 mg/l 2,4-D tanpa maupun dengan suhu dingin dan 8 mg/l tanpa suhu dingin. Pembentukan tunas pada 6 mg/l tanpa suhu dingin terjadi pada minggu ke delapan, sedangkan tunas dari perlakuan 6 mg/l dengan suhu dingin pada minggu ke-11, dan pada perlakuan 8 mg/l tanpa suhu dingin pada minggu ke enam. Panjang tunas-tunas itu berkisar antara 4 sampai 6 cm. Diduga timbulnya tunas langsung dari medium inisiasi itu berasal dari embrio somatik. Menurut Kochlenbach (1977) pertunasan yang didapat dari kultur kalus didapat melalui dua jalan, yaitu dengan cara pertunasan biasa dan melalui embrio somatik. Embrio somatik adalah suatu bentuk seperti embrio zigotik, tetapi berasal dari sel-sel somatik. Embrio ini mempunyai struktur bipolar, yaitu titik akar dan tunas pada satu poros, berbeda

halnya dengan tunas yang hanya punya satu titik tumbuh saja. Pada Gramineae, titik embriogenik sering didapatkan pada kalus yang kompak dan berwarna putih pucat (Vasil, 1986). Menurut Nadar *et al* (1978) dan Kochlenbach (1977), konsentrasi auksin yang tinggi pada medium kalus dapat merangsang timbulnya embrio somatik. Kalus yang mengandung bintik-bintik embriogenik akan tumbuh menjadi tunas berakar. Perkembangan embrio jadi plantlet biasanya dilakukan pada medium tanpa auksin.

Pada perlakuan 8 mg/l ketika tunas dipindahkan ke medium regenerasi ternyata terjadi pembentukan akar pada minggu kedua setelah pemindahan (Gambar 7b). Sedangkan pada perlakuan 6 mg/l, setelah tunas dipindahkan ke medium regenerasi ternyata tunas-tunas itu menjadi mati beberapa hari setelah pemindahan. Hal ini dapat diketahui dari warna tunas yang menjadi coklat dan lama-lama menjadi kehitaman. Diduga hal ini karena pada saat dilakukan pemindahan tunas-tunas itu belum cukup kuat untuk dipindahkan ke medium baru.



(7a)



(7b)

Gambar 7. Pembentukan Tunas Langsung dari Kalus dalam Medium Inisiasi dengan 2,4-D 8 mg/l tanpa Suhu Dingin (7a), Akar yang Terbentuk Setelah Pindahan ke Medium Regenerasi (7b)

## KESIMPULAN

### Kesimpulan

Dari hasil percobaan ini dapat disimpulkan bahwa untuk menginisiasi kalus tebu varietas F 154 (BZ 132) diperlukan zat pengatur tumbuh 2,4-D dengan konsentrasi terbaik 8 mg/l. Dengan konsentrasi sebesar ini kalus yang dihasilkan relatif lebih banyak dibandingkan dengan penggunaan konsentrasi 2,4-D yang lain.

Penggunaan suhu dingin dan gelap pada eksplan tebu varietas ini dapat mengurangi pencoklatan jaringan namun cenderung menghambat pertumbuhan eksplan menjadi kalus.

Kalus yang terbentuk di medium regenerasi, tidak semua mampu beregenerasi membentuk tunas dan akar. Tunas yang terbentukpun tidak semua mampu tumbuh membesar. Ada pula tunas yang tumbuh langsung di dalam medium inisiasi kalus, yang diduga merupakan embrio somatik.

### Saran

Untuk mendapatkan hasil yang mungkin lebih baik dalam memperoleh kalus tebu pada varietas F 154 ini diharapkan dilakukan percobaan dengan menggunakan 2,4-D dengan konsentrasi yang lebih tinggi.

Untuk menghindari kecenderungan terhambatnya pertumbuhan eksplan menjadi kalus, disarankan dilakukan percobaan dengan menggunakan perlakuan suhu rendah yang lebih

bervariasi, seperti lamanya penyimpanan dalam suhu rendah atau derajat kedinginannya.

Penggunaan medium regenerasi sebaiknya tetap digunakan untuk mendapatkan tunas dan akar. Ini disebabkan tunas tidak selalu dapat tumbuh langsung di medium inisiasi. Namun kalus sebaiknya tidak dipelihara terlalu lama, sehingga diharapkan kemampuan morfogenetiknya masih ada.

## DAFTAR PUSTAKA

- Apriyanti, A. 1990. Percobaan sterilisasi jaringan tebu (*Saccharum officinarum* L.) varietas F 154. Skripsi Sarjana Biologi, Jurusan Biologi, FMIPA-IPB, Bogor. 32hal.
- Barba, R. and L. G. Nickell. 1969. Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugar cane, a monocotyledon. *Planta* 89:299-302.
- Barnes, A. C. 1964. The Sugarcane. 2<sup>nd</sup> edition. Interscience Publishers Inc., New York. 572p.
- Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. 1983. Plant Tissue Culture, Theory and Practice. Elsevier, Amsterdam. 502p.
- Darmodjo, S., Soejoto, Mirzawan dan Soeprijanto. 1983. F 154, M 442-51 dan Ps 56 varietas tebu unggul baru yang dianjurkan untuk lahan sawah dan lahan kering. *Majalah Perusahaan Gula* 19(2-3):25-34.
- Dodds, J. H. and L. W. Roberts. 1982. Experiment in Plant Tissue Culture. Cambridge University, London. 165p.
- George, F. G. and P. D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd., Basingstoke. 729p.
- Ernawati, A. 1985. Pengaruh beberapa zat pengatur tumbuh terhadap pertumbuhan dan perkembangan jaringan tebu kultivar Ps 56 secara *in vitro*. Skripsi Sarjana Pertanian, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian IPB, Bogor. 57hal.
- Gunawan, L. W. 1987. Teknik Kultur Jaringan. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, PAU Bioteknologi IPB, Bogor. 253hal. Tidak Dipublikasikan.
- Heinz, D. J. and W. P. Mee. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Sci.* 9:346-348.
- \_\_\_\_\_, M. Krishnamurti, L. G. Nickell and A. Maretzki. 1977. Cell, tissue and organ culture in sugar-

- cane improvement, p. 3-18. In J. Reinert and Y. P. S. Bajaj, eds. Applied and Fundamental Aspect of Plant Cell, Tissues and Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin.
- Hutchinson, J. 1973. The Families of Flowering Plants. 3<sup>th</sup> edition. Oxford at the Clarendon House Press, London. 968p.
- Irvine, J. E., M. Fitch and P. H. Moore. 1985. The induction of callus in sugarcane tissues cultures by selected chemicals. Plant Cell Tissue Organ Culture 2:141-149.
- Kohlenbach, H. W. 1977. Basic aspect of differentiation and plant regeneration from cell and tissue culture. p. 355-366. In W. Barz, E. Reinhard and M. H. Zenk, eds. Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application. Springer Verlag, Berlin.
- Liu, M. C. and W. H. Chen. 1976. Tissue and cell culture as aid to sugarcane breeding 1. Creation of genetic variability through callus culture. Euphytica 25:393-403.
- \_\_\_\_\_. 1981. *In vitro* methods applied to sugarcane improvement, p. 299-323. In Trevor A. Thorpe, ed. Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, New York.
- \_\_\_\_\_. 1984. Sugarcane, p. 572-602. In Y. Yamada, W. R. Sharp, D. A. Evans dan P. V. Ammirato, eds. Handbook of Plant Cell Culture Crop Species. Macmillan Publishing Company, New York.
- Meredith, C. P. and P. S. Carlson. 1982. Herbicide resistance in plant cell cultures, p. 275-291. In Le Baron and Gressel, eds. Herbicide Resistance in Plants. John Willey and Sons, New York.
- Mirzawan dan S. Darmodjo. 1980. Penelitian untuk mendapatkan varietas tebu tegalan. Majalah Perusahaan Gula 16(4):88-94.
- \_\_\_\_\_. 1981. Hasil pengujian varietas tebu introduksi tahun 1974-1975 di lahan sawah. Bulletin BP3G 97:3-10.
- Nadar, H. M., S. Soeprapto, D. J. Heinz and S. L. Ladd.

1978. Fine structure of sugar cane (*Saccharum* sp.) callus and the role of auxin in embriogenesis. *Crop Sci* 18:210-216.
- Noertjahyo, J. A. 1991. Petani Tebu Tersenyumlah. *Harian Kompas* 1 Juni: 8-9.
- Pierik, R. L. M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants* Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht. 344p.
- Prawiranata, W., Said Harran dan Pin Tjondronegoro. 1988. *Dasar-dasar Fisiologi Tumbuhan*. Departemen Botani, Faperta-IPB, Bogor. 224hal.
- Sastrowijono, S. 1976. *Tissue culture* pada tanaman tebu di Indonesia. *Majalah Perusahaan Gula* 12(2):77-88.
- \_\_\_\_\_. 1982. Tanda pengenal varietas tebu unggul F 154 (BZ 132), M442-51 (BZ 148) dan Ps 56 (BO 653). *Bulletin BP3G* 88:3-5.
- Soeprapto. 1987. *Kajian penggunaan kultur jaringan pada tanaman tebu khususnya klon POJ 3016*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 215hal.
- Sudiatso, S. 1980. *Bertanam tebu*. Departemen Agronomi, Fakultas Pertanian IPB, Bogor. 42hal.
- Tatt, O. H. and Rafeah bte Abdul Rahman. 1975. Regeneration of plantlets from *in vitro* cultures of some varieties of *Saccharum officinarum*, p. 59-63. In J. C. Rajarao and K. Paranjothy, eds. *Proceeding of the National Plant Tissue Culture Symposium 1975*. RRIM, Kuala Lumpur.
- Vasil, I. K. and Vimla Vasil. 1986. Regeneration in cereal and other grass species, p. 121-150. In Indra K. Vasil, ed. *Cell Culture and Somatic Genetics of Plants*. Academic Press, Orlando.

LAMPIRAN

Tabel Lampiran 1 . Komposisi Medium Murashige dan Skoog (MS) yang Dimodifikasi untuk Pembentukan Kalus dan Regenerasi Kalus

Nama Bahan	Pembentukan Kalus (mg/l)	Regenerasi Kalus (mg/l)
I. $\text{NH}_4\text{NO}_3$	1 650	1 650
$\text{KNO}_3$	1 900	1 900
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370	370
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8
NaEDTA	37.25	37.25
II. $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22.3	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
KI	0.83	0.83
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	6.2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25
III. Inositol	100	100
Tiamin-HCl	0.1	0.4
Piridoksin-HCl	0.5	4.0
Asam Nikotinat	0.5	0.5
Biotin	-	0.2
Glisin	2.0	2.0

IV.	2,4-D	4.0	-
		6.0	-
		8.0	-
	Kinetin	1.0	1.0
V.	Sukrosa	30 000	30 000
	Agar	7 500	7 500
	Air Kelapa	10%	15%

---

Sumber : Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi,  
FMIPA, IPB.