

KULTUR *IN VITRO* DI PUSAT PENELITIAN PERKEBUNAN
GULA INDONESIA¹⁾

IN VITRO CULTURE IN INDONESIA SUGAR RESEARCH INSTITUTE

Eka Sugiyarta dan Goeswono Soepardi²⁾

ABSTRACT

In vitro culture technology has been studied by Indonesian Sugar Research Institute since 1975. This technology is developed to support conventional sugarcane breeding program.

Methods of rapid seed multiplication and de-virus-ing plants are employed to increase provision of new promising variety plant materials. *In vitro* selection technique are developed to screen varieties against salinity and Pokah-boeng disease. Protoplast fusion has been successfully done but could not be cultured yet. Effort to obtain haploid plant from anther culture was disappointing. The study of associating simbiotic N-fixer at regeneration stage of cane callus, and the use of *Agrobacterium tumefaciens* on genetic transformation is progress. Biomolecular technique is being sought to find DNA probe for disease resistant. While identification of varieties through isoenzym analysis is being studied. The use monoclonal antibody to detect ratoon stunting disease is being developed.

RINGKASAN

Teknologi kultur *in vitro* telah dipelajari oleh Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia sejak tahun 1975. Teknologi ini dikembangkan untuk mendukung program pemuliaan tanaman tebu secara konvensional.

1) Disampaikan dalam Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer untuk Industri PAU Bioteknologi IPB. Bogor, 10 - 11 Desember 1991

2) Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia.
Jl. Pahlawan No. 25 Pasuruan, 67126

Cara pengakaran bibit secara cepat dan penyehatan bibit tebu bebas virus digunakan untuk membantu mempercepat penyediaan bahan tanaman varietas unggul baru. Selain itu teknik seleksi di tingkat sel untuk mendapatkan varietas tahan kadar garam tinggi dan tahan terhadap penyakit Pokkahboeng terus dikembangkan. Fusi protoplast tebu juga berhasil dilakukan, tetapi belum dapat dikulturkan. Sedangkan upaya mendapatkan tanaman haploid dari kultur anther belum memuaskan. Pemanfaatan mikroba penambat N dalam asosiasinya dengan proses regenerasi kalus tebu dan transformasi genetik dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* sedang diteliti. Saat ini teknologi molekular biologi dicoba digunakan untuk mencari pelacak DNA ketahanan penyakit dan identifikasi varietas dengan isoensim. Selain itu dikembangkan pula penggunaan monoklonal antibodi untuk deteksi penyakit kerdil ratun.

PENDAHULUAN

Lembaga penelitian tebu yang aktif melakukan pemuliaan selalu mengkaitkan gatra kultur *in vitro* sebagai salah satu komponen kegiatannya. Teknik ini tidak dimaksudkan untuk menggantikan seluruh program, tetapi membantu peran pemuliaan secara konvensional dari potensi-potensi yang ada (Maretzki, 1987). Teknik kultur *in vitro* yang diintegrasikan dengan program pemuliaan konvensional terbukti sangat bermanfaat (Evan et al., 1984). Sebagian teknik dapat dipakai untuk menghasilkan tanaman seragam dan secara genetik identik dengan induknya, dan sebagian lainnya dapat menghasilkan tanaman yang justru beraneka ragam.

Teknik *in vitro* digunakan di P3GI sejak tahun 1975 (Sastrowijono, 1976) untuk pengembangan dan perbaikan tanaman tebu. Beberapa penelitian seperti mikropropagasi, penyehatan bahan tanaman, seleksi *in vitro*, fusi protoplast, asosiasi simbiosis mikroba dan transformasi genetik telah dilakukan. Sedangkan beberapa penelitian yang menyangkut biologi molekular sedang dikembangkan.

Tulisan ini bermaksud untuk mengulas potensi-potensi teknologi kultur *in vitro* yang dapat dimanfaatkan untuk perindustrian gula pada umumnya dan pemuliaan tanaman tebu pada khususnya.

PERBANYAKAN CEPAT DAN PENYEHATAN KLONAL TEBU

Lambatnya perbanyakkan tebu secara konvensional merupakan masalah utama dalam pelaksanaan program-program pemuliaan tanaman. Varietas unggul yang dihasilkan setelah 7 - 9 tahun daur seleksi sering pada saatnya menjadi lambat penyediaan bibit tanaman komersial.

Perbanyakkan tanaman-tanaman tebu secara klonal sering secara sistemik terinfeksi virusa dan patogen lain yang dibawa dari generasi sebelumnya ke generasi vegetatif berikutnya. Khusus penyakit sistemik yang laten, gejalanya sulit dideteksi, tetapi potensi produksi secara nyata terus menurun atau dikenal sebagai proses degenerasi klonal. Keadaan ini bersifat akumulatif dari waktu ke waktu sejak perbanyakkan di kebun bibit.

Teknik *in vitro* dapat secara efektif menghilangkan sumber infeksi untuk menghasilkan bibit tanaman bebas penyakit. Dengan demikian mekanisme degenerasi klonal akibat akumulasi penyakit sistemik dapat dihambat.

Kegiatan mikropropagasi di P3GI dimulai sejak tahun 1986. Tujuan utama kegiatan tersebut adalah untuk membantu penyediaan bahan tanam asal varietas unggul baru. Dengan mikropagasi dari satu pucuk dapat dihasilkan 40 - 50 ribu rumpun tanaman umur enam bulan. Sedangkan secara konvensional hasil pengandaan hanya berkisar 6 - 12 kali dalam waktu yang sama (Sugiyarta dan Widiyaningsih, 1989).

Suatu hal yang dapat dipandang menguntungkan bahwa teknik mikropropagasi dapat dilaksanakan setiap saat, tanpa tergantung pada musim. Disamping itu juga hanya memerlukan ruangan yang kecil untuk melaksanakan.

Teknik mikropropagasi telah diterapkan secara komersial di Louisiana dan Florida (Maretzki, 1987). Saat ini sekitar 60 persen dari bibit tebu di Louisiana disediakan melalui teknik mikropropagasi (B.L. Legendre, komunikasi pribadi). Sedangkan di Indonesia baru diterapkan untuk penyediaan varietas unggul tahun 1990/1991. Harga bibit lebih mahal, tetapi produksinya meningkat, baik pada tanaman pertama maupun keprasannya. Alasannya ialah bahwa bibit asal mikropropagasi telah bebas hama dan penyakit.

KERAGAMAN SOMAKLONAL DALAM KULTUR

Dari studi literatur dapat disimpulkan bahwa kultur *in vitro* dapat menyebabkan keragaman genetik. Keragaman genetik merupakan bahan baku penemuan varietas unggul. Oleh karena itu pemulia tanaman perlu cepat tanggap terhadap munculnya cara-cara baru yang potensial sebagai sumber keragaman genetik. Kultur *in vitro* telah memberikan pandangan baru yang menarik untuk menambah keragaman genetik atau juga dikenal dengan keragaman somaklonal tanpa teknologi yang rumit.

Tampaknya, keragaman somaklonal sangat mudah didapat dari tanaman tebu. kejadiannya sangat meluas, mempengaruhi banyak sifat-sifat penting dan memberikan harapan untuk perbaikan varietas terutama yang memiliki kelemahan tunggal (Larkin dan Scowcroft, 1981). Tetapi keragaman somaklonal, seperti halnya dengan keragaman akibat perlakuan radiasi atau mutagen kimia pada tanaman, tidak dapat diarahkan untuk mengubah ciri-ciri seperti yang kita kehendaki.

Sugiyarta dkk. (1988) di P3GI telah mengamati keragaman beberapa sifat morfologi pada sejumlah tanaman hasil kultur jaringan. Keragaman somaklonal dalam kenyataannya tidak sebanyak seperti yang dilaporkan sebelumnya karena sebagian darinya berubah kembali ke fenotipa normal setelah penangkaran bibit (Lourens dan Martin, 1987).

Arah penelitian terhadap somaklonal dalam waktu dekat akan meliputi:

- 1) Identifikasai somaklonal dalam tabung. Dengan demikian, pemuliaan akan lebih efisien dan murah. hal ini memerlukan korelasi antara daya tanggap sel dan daya tangga tanaman terhadap bahan kimia atau "selective agents" tertentu.
- 2) Apabila korelasi tersebut dijumpai pada banyak sifat, maka seleksi di tingkat sel akan berkembang.
- 3) Untuk meningkatkan dan menambah keragaman somaklonal, maka fusi protoplast, penyuntikan DNA dan RNA dari luar, dan mungkin pemakaian mutagen kimia maupun fisika akan berkembang.

SELEKSI DAN INDUKSI MUTASI *IN VITRO*

Mutan tebu yang diperoleh dari kalus merupakan mutan sejati karena dianggap plantlet berasal dari sel tunggal (Nadar et al., 1978). Seleksi dapat dilakukan pada tingkat sel tunggal *in vitro* dengan memberikan tekanan seleksi di dalam tabung. Keuntungan dari teknik seleksi di tingkat sel ialah bahwa jutaan sel dapat ditumbuhkan dalam ruang yang kecil dan dapat diperlakukan secara lebih seragam terhadap tekanan lingkungan. Prosedur ini analog dengan teknik seleksi mikroba yang telah banyak berhasil di sektor industri. Kelemahannya ialah bahwa hanya ciri-ciri tertentu saja yang dapat diseleksi di tingkat sel. Ciri-ciri seperti bobot tebu, rendemen, ketahanan rebah yang

diwariskan secara kuantitatif dan kompleks tidak dapat disarankan untuk diseleksi dalam tabung.

Perubahan genetik untuk sifat-sifat yang dapat diidentifikasi di tingkat sel mungkin dapat dilakukan dengan cara seleksi langsung dalam kultur *in vitro*. Sifat-sifat itu pada umumnya ialah ketahanan terhadap penyakit, herbisida, dan tekanan lingkungan.

Fitch dan Moore (1981) dan Liu dan Yeh (1982) telah berhasil mengisolasi sel-sel tebu yang dapat tumbuh pada 1.5% NaCl. Dix et al (1986) dan Sugiyarta (1990a) berkesimpulan tentang adanya harapan nyata untuk mendapatkan varietas tahan terhadap kadar garam tinggi melalui seleksi *in vitro*.

Larkin dan Scowcroft (1983) menambahkan toksin yang diisolasi dari *Helminthosporium sacchari* digunakan untuk seleksi ketahanan terhadap penyakit noda mata. P3GI telah mengembangkan studi untuk seleksi ketahanan terhadap penyakit pokkahboeng yang disebabkan oleh toksin jamur *Fusarium moniliforme* dan seleksi ketahanan terhadap kadar garam tinggi.

Pemakaian mutagen untuk menginduksi mutasi pada kalus pernah diupayakan. menurut Heinz et al (1977), pemakaian mutagen tidak menambah keragaman somaklonal terhadap penyakit noda mata yang disebabkan oleh *Helminthosporium sacchari*.

Sinar gamma dengan berbagai dosis pernah diaplikasikan terhadap kalus dari varietas F 177. Sejauh ini belum ada laporan yang menunjukkan keberhasilan sinar gamma untuk menginduksi laju muasi yang lebih tinggi pada kultur kalus (Liu, 1984).

FUSI PROTOPLAST

Persilangan seksual tidak selalu mudah dikerjakan. Kendalanya diantaranya ialah: tergantung musim; pembungaan tidak sinkron, inkompatibilitas genetik, varietas tidak berbunga, masa pembungaan pendek, pollen mandul, dan lain sebagainya. Persilangan somatik melalui fusi protoplast dapat merupakan teknik alternatif untuk masa mendatang. Syahrani et al (1987) dan Sastrowijono (1990 dan 1991) telah melakukan penelitian fusi protoplast tanaman tebu di P3GI, namun belum berhasil mengkulturkannya. Tanaman tebu asal protoplast telah diperoleh di beberapa laboratorium tetapi belum dapat berkembang secara utuh (Vasil, 1988).

TANAMAN HAPLOID

Untuk mendapatkan tanaman homozygous dari tanaman tahunan menyerbuk silang seperti tebu sangatlah tidak bijaksana kalau dilakukan dengan cara silang-dalam (inbreeding) dari generasi ke generasi. Secara teori, tanaman homozygous diploid dapat diperoleh dari tanaman haploid asal pollen melalui kultur anter dengan menggandakan jumlah kromosonnya. Melalui prosedur terobosan ini dapat diperoleh galur murni yang dapat menjadi dasar untuk merakit tebu hibrida yang menunjukkan sifat heterosis. Selain itu, tanaman haploid dapat dimanfaatkan sebagai alat penelitian metabolisme tanaman dan tanda bukti dari persilangan somatik (Nickell, 1977).

Moore et al (1989) berhasil memperoleh tanaman haploid dan double haploid dari enam klon *S. spontaneum* L. melalui kultur anter, tetapi mengalami kegagalan pada tebu komersial maupun spesies *Saccharum* lainnya. Populasi yang terdiri dari 500 tanaman androgenik (tanaman asal anter) diperoleh dari klon SES 208. Sepertiga dari populasi

tersebut adalah tanaman haploid sedangkan sisanya diploid. Tanaman androgenik diploid ini yang diperoleh berdasarkan analisis isoensim, adalah double-haploid karena itu analog dengan galur murni dari tanaman-tanaman lain. Sejauh ini pengkulturan anter di P3GI baru berhasil mengkaluskannya, tetapi tidak berhasil berkembang maupun meregenerasikannya.

ASOSIASI SIMBIOSIS TEBU DENGAN MIKROBA

Akumulasi *Spirillum lipoferum* pada tanah-tanah perawan yang ditanami tebu di Brasil telah mendorong penyelidikan tentang asosiasi organisme penambat N pada berbagai tanaman rerumputan tropika (Day et al., 1975; Dobereiner et al., 1976). *Azospirillum brasiliense* yang telah diidentifikasi dan diisolasi dari zone perakaran tebu, ternyata dapat berkembang dan tetap hidup di dalam dan di sekitar interselular dari kultur tebu (Vasil et al., 1979). Aktivitas nitrogenase tetap terpelihara dan kalus tebu mampu dirgenerasikan dengan baik:

Penelitian Santosa (1991) di P3GI, menunjukkan bahwa infeksi *Azospirillum sp.* pada tingkat regenerasi kalus tebu ternyata mampu masuk ke dalam jaringan akar plantlet dengan sempurna. Penampilan plantlet yang terinfeksi menunjukkan kecepatan pertumbuhan dan pembentukan tunas anakan yang lebih baik. Disamping membantu dalam penambatan N, terdapat dugaan bahwa *Azospirillum sp.* juga menghasilkan hormon-hormon pertumbuhan, seperti auksin (IAA), yang ikut berperan dalam pertumbuhan tanaman (Reynders dan Vlassak, 1979).

TRANSFORMASI GENETIK

Diperolehnya tanaman normal setelah mengandung dan mengekspresikan gen asing akan membuka kemungkinan pemanfaatan teknik ini untuk perbaikan varietas. Pemindahan gen asing dimungkinkan karena adanya bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang mempunyai kemampuan alami untuk memindahkan gen. Studi pendahuluan tentang transformasi *A. tumefaciens* pada protoplast tebu di P3GI telah dilakukan, namun belum memberikan hasil yang memuaskan (Sugiyarta, 1990). Saat ini COPERSUCAR (Brasil) dan Universitas Texas A&M mempunyai program bersama dalam penelitian transformasi gen ke dalam tanaman tebu (G.R. Machado, Komunikasi Pribadi). Demikian juga antara HSPA (Hawaii) dengan Universitas Iowa (C. Nagai, komunikasi pribadi).

PENUTUP

Sebagai lembaga penelitian tebu tertua di dunia, P3GI pada saat ini berupaya melandasi penelitiannya dengan kaidah biologi molekular. Upaya menemukan pelacak DNA untuk ketahanan penyakit penting, pemanfaatan teknologi isoensim untuk membantu identifikasi genotipe varietas (Sugiyarta dan Moeljopawiro, 1988), dan penggunaan monoklonal antibodi untuk deteksi penyakit kerdil ratun terus dikembangkan. Dengan demikian diharapkan adanya kerjasama penelitian ini dengan Lembaga Pendidikan dan Lembaga Penelitian lain, sehingga akan memacu keberhasilan di masa akan datang.

DAFTAR PUSTAKA

- Day, J.M. ; M.D.P. Neves dan J. Dobereiner. 1975. Nitrogen fixation on the roots of tropical forage grasses. *Soil Biol. Biochem* 7 : 107-112.
- Dobereiner, J.; I.E. Marriell dan M. Nery. 1976. Ecological distribution of *spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22 : 1464-1473.
- Dix, P.J., U.A. McLysaght dan A. Plunkett. 1986. Salt stress: Resistance mechanisms and *in-vitro* selection procedures. In *Plant Tissue Culture and Its Agricultural Application* (Withers, L.A. dan P.G. Anderson eds.) pp. 469-478, Butterworths, London.
- Evans, D.A., W.R. Sharp dan J.E. Bravo. 1984. Cell culture methods of crop improvement. *In Handbook of Plant Cell Culture* vol. 2. (Sharp et al eds) Macmillan, New York.
- Fith, M.M. dan P.H. Moore. 1981. The selection for salt resistance in sugarcane (*Saccharum sp Hybrids*) tissue culture. *Plant Physiol. Suppl.* 67 : 26.
- Heinz, D.J., M. Krishnamurthi, L.G. Nickell dan A. Maretzki. 1977. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement. *In Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* (Reinert J. dan Y.P.S. Bajaj eds) pp. 3-17, Berlin, Springer.
- Larkin, P.J. dan W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- _____ dan _____. 1983. Somaclonal variation and eye spot toxinc tolerance in sugarcane. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2 : 111-121.
- Liu, M.C. 1984. Sugarcane. *In Handbook of Plant Cell Culture* 2:572-605 (Sharp et al esd) Macmillan, New York.
- _____ dan H.S. Yeh. 1982. Selection of NaCl tolerant line through stepwisw salinized sugarcane cell culture. dalam A. Fujiwara (ed) *Plant Tissue Culture. Japanese Assn. for Plant Tissue Culture*, Tokyo. pp. 447-478.

- Lourens, A.G. dan F.A. Martin. 1987. Evaluation of *in-vitro* propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation. *Crop Sci.* 27:793-796.
- Maretzki, A. 1987. Tissue culture : its prospect and problems. dalam D.J. Heinz (ed) *Sugarcane Improvement Through Breeding*. Elsevier. pp 343-384
- Moore, P.H., C. Nagai dan M.M. Fitch. 1989. Production and evaluation of sugarcane haploids. *Proc. ISSCT* 20:000-000 (in press)
- Nadar H.M., S. Soeprapto, D.J. Heinz dan S.L. Ladd. 1978. Fine structure of sugarcane (*Sccharum sp.*) callus and the role of ausin in embryo genesis. *Crop Sci.* 18:210-216.
- Nickell, L.G. 1977. Crop improvement in sugarcane: Studies using *in-vitro* methods. *Crop. Sci.* 17:717-719.
- Reynders, L. dan K. Vlassak. 1979. Conversion of tryptophan to indole acetic acid by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* 7 : 107-112.
- Santosa, D.W. 1991. Interaksi antara cendawan MVA, *Azospirillum* dan pupuk nitrogen pada padi sawah dan tebu dari kultur jaringan, serta pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan kandungan P dan N dan hasil tanaman. Tesis Magister Sains, Univ. Padjadjaran Bandung.
- Sastrowijono, S. 1976. Tissue culture pada tanaman tebu di Indonesia. *MPG XII* (2):77-81.
- _____. 1990. Isolasi dan fusi protoplast tebu. Laporan Hasil Penelitian P3GI tahun 1990.
- _____. 1991. Studies on isolation, fotion of protoplasts from the sugarcane callus and green leaves. Workshop on Agricultural Biotechnology, Bogor, May 21-24, 1991.
- Sugiyarta, E. dan S. Moeljopawiro. 1988. Identifikasi isoensi, peroksidase dan esterase pada tanaman tebu dan kerabatnya. *Media Penelitian Sukamandi*, VI : 36-43.
- _____; Widijaningsih dan S. Sastrowijono. 1988. Evaluasi keragaman morfologi subklon hasil kultur jaringan tebu. *Proc. Seminar Kultur Jaringan UNIBRAW*, Malang.

- _____ dan _____. 1989. Mikropropagasi, alternatif multiplikasi klonal tanaman tebu. Proc. Pertemuan Teknis Budidaya Tebu Lahan Kering, P3GI, 21-22 Desember 1989.
- _____. 1990a. Seleksi 'in vitro' untuk toleransi terhadap kadar garam tinggi pada tanaman tebu. Seminar Hasil Penelitian Kursus Singkat Kultur Jaringan Lanjut PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- _____. 1990b. Studi pendahuluan transformasi gen pada tanaman tebu dengan vektor *Agrobacterium spp.* Seminar Hasil Penelitian Kursus Singkat Kultur Jaringan Lanjut PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Syahrani, A., G. Indrayanto, G. Sukarso, dan Sutarjadi. 1987. Fusi sel *Saccharum officinarum L.*. Seminar Bioteknologi Pertanian, PAU, IPB Bogor. 21 Desember 1987.
- Vasil, I.K. 1988. *In-vitro* techniques. ISSCT Joint Breeding and Physiology Technical Workshop, Honolulu.
- Vasil, V.; I.K. Vasil; D.A. Zuberer dan D.H. Hubbell. 1979. The biology of *Azospirillum sugarcane* association. I. Establishment of the association. Z. Pflanzenphysiol, 95 : 141-147.
- Zhenghua, C., Q. Changfa, Xu Xuen dan D. Zhongtao. 1982.. Anther culture techniques of rubber tree and sugar cane. dalam A. Fujiwara (ed) Plant Tissue Culture. Japanese Assn. for Plant Tissue Culture, Tokyo. pp. 447-478.