

# REGENERASI *IN VITRO* TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.): INDUKSI DAN PROLIFERASI KALUS, SERTA INDUKSI TUNAS

Ronald Bunga Mayang<sup>1</sup>, Dwi Hapsoro<sup>2</sup> dan Yusnita<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Magister Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Lampung

<sup>2</sup>Dosen Fakultas Pertanian Universitas Lampung

Email: ronald.bm007@gmail.com

## ABSTRACT

***IN VITRO* PLANT REGENERATION OF SUGARCANE (*Saccharum officinarum* L.): CALLUS INDUCTION, PROLIFERATION, AND SHOOT INDUCTION.** This research is a series of activities that studies the embryogenesis for somatic clonal reproduction plant sugarcane multiplication *in vitro* which includes the callus induction of explant pieces rolls up the leaves, the proliferation of embriogenic callus, and shoots induction of embriogenic callus. Those of three researchs were conducted in a series. This experiment were carried out in The Plant Science Laboratory, the Faculty of Agriculture, the University of Lampung, Indonesia, from Oktober 2010 until April 2011. All experiments were conducted in a completely randomized design. Treatments of Experiment I were 2,4-D concentrations (0, 1, 2, and 3 mg/l) with and without 250 mg/l of casein hydrolysate, while those of Experiment II were combinations of those two chemicals, 2,4-D concentrations (1, 2, and 3 mg/l) with and without 250 mg/l of casein hydrolysate. Treatments of Experiment III were BA concentrations (1 mg/l and 2.5 mg/l). Results of the experiments showed that the best callus induction was achieved using MS media containing 3 mg/l 2,4-D, and callus induction was not significantly affected by casein hidrolysates. Concentrations of 2,4-D did not significantly influence embriogenic callus proliferation. The best shoot proliferation was attained in MS media containing 2.5 mg/l. **Keywords:** Benzyladenine (BA), 2,4-D, Casein Hydrolysate, sugarcane, and culture *in vitro*.

## PENDAHULUAN

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan salah satu komoditas pertanian yang menempati posisi penting, karena 70% produksi gula dunia berasal dari tanaman tebu (Khan and Khatri, 2006). Oleh karenanya investasi di industri gula berbasis tebu dinilai cukup prospektif untuk dilakukan (Suryana *et al.*, 2005). Hal tersebut terlihat dari jumlah produksi gula Indonesia yang tidak sebanding dengan jumlah konsumsi. Berdasarkan data Ikatan Ahli Gula Indonesia (IKAGI), produksi gula konsumsi bulan Januari—Oktober 2011 hanya sebesar 2,11 juta ton. Sementara konsumsi gula dalam negeri sekitar 2,7—2,8 juta ton/tahun (Julian, 2011). Untuk menutupi defisit gula konsumsi tersebut, harus dilakukan impor gula dari luar negeri. Selain itu, menurut Dewan Gula Indonesia (DGI) sejak tahun 2008—2010 terjadi penurunan luas areal tanam tebu dari 436.504 Ha (2008) menjadi 422.935 Ha (2009), dan pada tahun 2010 menjadi 418.259 Ha (Julian, 2011).

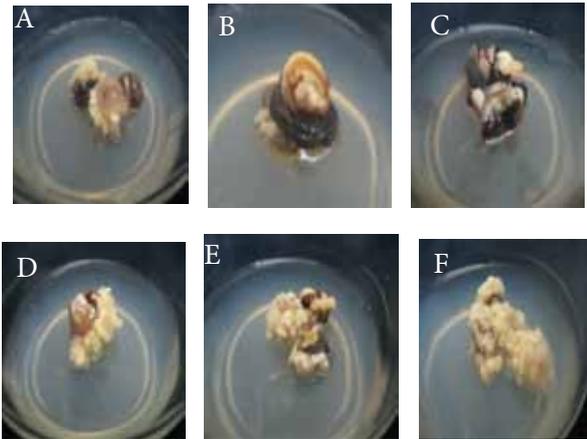
Untuk memenuhi kebutuhan gula dalam negeri sekaligus mengurangi impor gula, dan mewujudkan swasembada gula tahun 2014, maka salah satu usaha yang dilakukan yaitu melalui perluasan areal tanaman tebu. Perluasan areal yang sedang dilakukan saat ini meliputi daerah Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, dan Jawa (Yakub, 2011). Perluasan tanaman tebu dalam areal yang besar harus didukung oleh ketersediaan bibit yang bermutu tinggi dalam jumlah

yang besar. Salah satu cara perbanyak tanaman yang mampu menghasilkan bibit dalam jumlah besar, seragam, dan dalam waktu yang relatif singkat adalah dengan cara kultur *in vitro*.

Kultur *in vitro* meliputi tahap-tahap penanaman eksplan, induksi kalus, proliferasi kalus, induksi tunas, induksi akar, *hardening in vitro*, dan aklimatisasi yang kemudian diperoleh tanaman yang siap ditanam di lapang. Setiap tahapan mulai dari induksi kalus hingga pembentukan akar mungkin membutuhkan media kultur dengan zat pengatur tumbuh yang berbeda-beda baik jenis maupun konsentrasinya.

Media kultur merupakan salah satu penentu keberhasilan perbanyak tanaman secara kultur jaringan (Gamborg and Phillips, 1995; Yusnita, 2003). Media dasar yang umum digunakan dalam kultur *in vitro* adalah yang mengandung unsur hara makro, mikro, sukrosa, vitamin, asam amino, bahan organik, dan zat pengatur tumbuh. Induksi kalus embriogenik dapat dilakukan pada media Murashige dan Skoog (*full* atau *half-strength*) dengan penambahan auksin, seperti 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Rival dan Parveez, 2005; George *et al.*, 2008). Sitokinin dalam kultur jaringan terbukti dapat memacu diferensiasi tunas (Farid, 2003). Golongan sitokinin yang umum digunakan adalah BA (6-benzyladenine) dan kinetin.

Untuk memacu kalus berproliferasi lebih cepat, biasanya ditambahkan senyawa kompleks sebagai sumber N organik ke dalam media kultur jaringan.



**Gambar 1.** Penentuan skor pembentukan kalus pada 2 bulan setelah tanam. (A) kalus skor 0, (B) kalus skor 1, (C) kalus skor 2, (D) kalus skor 3, (E) kalus skor 4, dan (F) kalus skor 5

Salah satu sumber N organik yang biasa digunakan adalah kasein hidrolisat yang merupakan gabungan dari 20 jenis asam amino dan amonium (Trigiano dan Gray, 2010). Kasein hidrolisat yang berperan sebagai sumber asam amino dan oligopeptida merupakan suatu produk yang dibuat dari protein keju (Siregar et al, 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian 2,4-D dan kasein hidrolisat dalam media dasar pada induksi kalus, pengaruh media induksi kalus pada proliferasi kalus, dan pengaruh pemberian BA dalam media dasar pada induksi tunas.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Lampung mulai bulan Oktober 2010 sampai dengan April 2011.

#### Eksplan

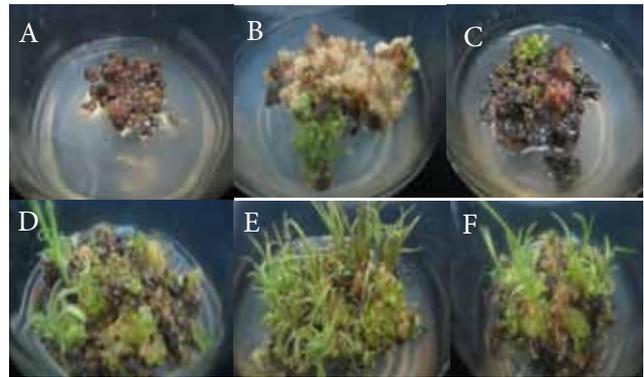
Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini berupa potongan gulungan daun muda pada pucuk tanaman tebu bagian terdalam yang berukuran 0,5—1 cm. Sumber eksplan adalah tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) klon Ragnar yang didapat dari PT. Gunung Madu Plantation. Eksplan ini digunakan untuk percobaan induksi kalus. Untuk percobaan proliferasi kalus, eksplan yang digunakan adalah kalus embriogenik yang didapatkan dari hasil induksi kalus. Untuk percobaan induksi tunas, digunakan kalus embriogenik yang didapatkan dari proliferasi kalus.

### Media

Media dasar untuk induksi kalus, proliferasi kalus, dan induksi tunas adalah media Murashige dan Skoog (MS). Media yang digunakan berupa media cair yang di masukkan ke dalam botol berukuran 250 ml, sebanyak 35 ml. Sterilisasi media dilakukan dengan autoclave tekanan 1,55 kg f cm<sup>-2</sup> selama 12 menit.

### Induksi Kalus

Tahap induksi kalus dilaksanakan dengan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS) dengan yang disusun secara faktorial 2 x 4. Faktor



**Gambar 2.** Penentuan skor pembentukan tunas pada umur 2 bulan setelah tanam. (A) tunas skor 0, (B) tunas skor 1, (C) tunas skor 2, (D) tunas skor 3, (E) tunas skor 4, dan (F) tunas skor 5

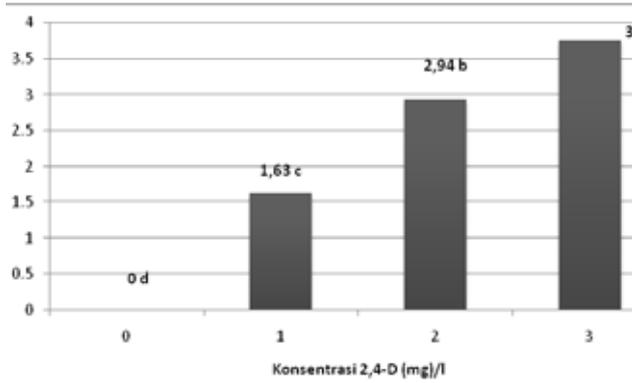
pertama adalah tanpa dan dengan pemberian kasein hidrolisat (CH) 250 mg l<sup>-1</sup> dan faktor kedua adalah konsentrasi 2,4-D dengan empat taraf, yaitu 0, 1, 2, dan 3 mg l<sup>-1</sup>. Unit percobaan terdiri dari 1 botol kultur yang berisi 1 eksplan tebu yang diulang 8 kali. Pengamatan dilakukan pada umur 2 bulan setelah penanaman eksplan dengan variabel banyaknya kalus yang terbentuk yang ditentukan dengan cara skoring dengan enam level, yaitu 0 (tidak ada), 1 (sangat sedikit), 2 (sedikit), 3 (sedang), 4 (banyak), dan 5 (sangat banyak) seperti yang dicontohkan pada Gambar 1.

### Proliferasi

Tahap proliferasi kalus dilaksanakan dengan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS) yang disusun secara faktorial 2 x 3. Faktor pertama adalah tanpa dan dengan pemberian kasein hidrolisat (CH) 250 mg l<sup>-1</sup> dan faktor kedua adalah konsentrasi 2,4-D dengan tiga taraf, yaitu 1, 2, dan 3 mg l<sup>-1</sup>. Setiap unit percobaan terdiri dari 1 botol kultur yang berisi satu clump kalus per botol, yang diulang 7 kali. Pengamatan dilakukan pada kultur berumur 1 bulan setelah tanam pada media proliferasi, dengan mengukur diameter dan bobot kalus yang terbentuk.

### Induksi Tunas

Tahap induksi tunas dilaksanakan dengan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS) dengan perlakuan dua taraf konsentrasi BA, yaitu 1 mg l<sup>-1</sup> dan 2,5 mg l<sup>-1</sup>. Setiap unit percobaan terdiri dari 19 botol kultur, yang masing-masing botolnya berisi 1 clump kalus sebagai eksplan. Pengamatan dilakukan pada 2 bulan setelah tanam pada media induksi tunas secara visual dengan menggunakan sistem skor. Skor yang digunakan didasarkan pada banyaknya jumlah tunas yang tumbuh pada kalus (skor 0: tidak tumbuh tunas, skor 1: sedikit, skor 2: sedang, skor 3: banyak, dan skor 4: sangat banyak), seperti yang dicontohkan pada Gambar 2.



**Gambar 3.** Pengaruh konsentrasi 2,4-D pada ukuran kalus. Ukuran kalus dinilai dengan skor h(0—5) yang diuraikan dalam metode penelitian. Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 0,05.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

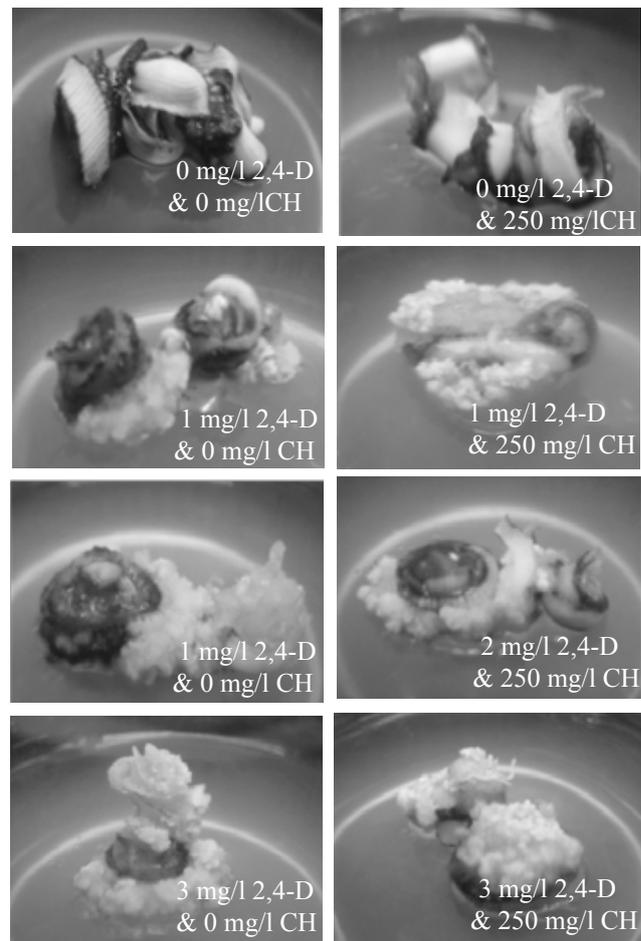
### Induksi Kalus

Hasil rekapitulasi analisis ragam terhadap ukuran kalus yang terbentuk pada eksplan selama 2 bulan menunjukkan bahwa penambahan 2,4-D pada berbagai konsentrasi dapat mempengaruhi ukuran kalus yang terbentuk. Sedangkan pemberian CH tidak mempengaruhi ukuran kalus.

Pengaruh penambahan 2,4-D pada ukuran kalus yang terbentuk disajikan dalam Gambar 2 dan Gambar 3. Dari Gambar 2 terlihat bahwa penambahan 2,4-D pada taraf 3 mg/l menghasilkan skor ukuran kalus tertinggi (3,75), yang selanjutnya berturut-turut diikuti oleh taraf 2 mg/l (2,94), lalu 1 mg/l (1,63), dan tanpa pemberian 2,4-D (0). Gambar 3 menunjukkan pertumbuhan kalus tanaman tebu dengan pemberian beberapa konsentrasi 2,4-D dengan atau tanpa kasein hidrolisat pada media dasar MS pada umur 6 minggu setelah tanam.

Penambahan kasein hidrosilat tidak berpengaruh pada proses induksi kalus eksplan tanaman tebu. Hal ini terbukti bahwa semua konsentrasi 2,4-D mampu menginduksi kalus, baik yang diperlakukan dengan atau tanpa kasein hidrosilat. Fenomena tersebut dimungkinkan, karena kasein hidrolisat tidak mempengaruhi proses pembentukan kalus, tetapi berefek pada proses pembentukan embrio somatik pada kalus tua (setelah proses proliferasi) (Nasir *et al.*, 2011). Selain itu, Shaheen dan Mirza (1989) menyatakan bahwa kasein hidrosilat meningkatkan jumlah tunas yang terbentuk. Hasil yang serupa diperoleh pada penelitian Supriyatdi (2010), yang penelitiannya menunjukkan bahwa pemberian kasein hidrolisat 200 mg/l pada saat induksi kalus meningkatkan jumlah tunas rata-rata per eksplan sekitar satu tunas.

Berbeda dengan kasein hidrolisat, penambahan 2,4-D terbukti mempengaruhi ukuran kalus yang terbentuk. Ukuran kalus yang terbesar dihasilkan oleh perlakuan 3 mg/l 2,4-D dan yang terendah di-



**Gambar 4.** Penampakan kalus primer pada media MS dan 2,4-D dengan atau tanpa kasein hidrolisat pada umur 2 bulan

tunjukkan oleh perlakuan yang tidak menggunakan 2,4-D. Hasil serupa juga diutarakan oleh Ali *et al.* (2008), yang menyatakan bahwa pemberian konsentrasi 3 mg/l 2,4-D dapat memberikan hasil terbaik dalam memaksimalkan induksi kalus dan proliferasi kalus yang dihasilkan baik dari eksplan daun segar maupun tunas meristem apikal. Selain itu, George, *et al.* (2008) menyebutkan bahwa 2,4-D merupakan auksin kuat dengan efektivitas yang tinggi dalam induksi kalus.

### Proliferasi Kalus

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan taraf konsentrasi 2,4-D dan CH tidak memberikan pengaruh yang nyata pada variabel diameter kalus dan bobot kalus. Tidak terdapat interaksi antara konsentrasi 2,4-D dan CH pada setiap variabel yang diamati. Pengaruh konsentrasi 2,4-D dan kasein hidrolisat terhadap proliferasi kalus pada diameter dan bobot kalus disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan data pada Tabel 1, tidak terlihat perbedaan yang signifikan pada diameter dan bobot kalus yang dihasilkan antara media dengan atau tanpa kasein hidrolisat.

Berdasarkan data pada Tabel 1 tidak terlihat perbedaan yang signifikan pada diameter dan bobot kalus yang dihasilkan antara media dengan atau tanpa

**Tabel 1.** Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan Kasein Hidrolisat pada Media Induksi Kalus terhadap Proliferasi Kalus pada Umur 1 Bulan Setelah Tanam

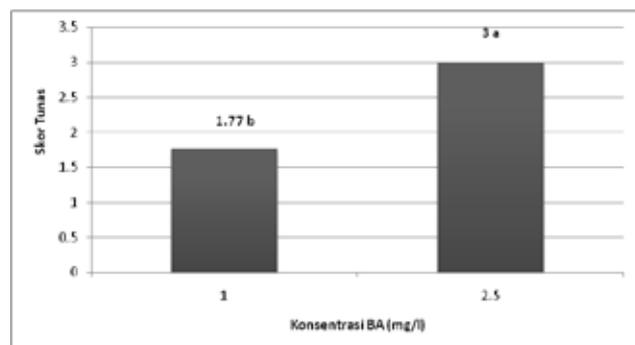
No	Media Induksi Kalus	Diameter (cm)	Bobot (g)
1	Dengan kasein hidrolisat		
	1 mg/l 2,4-D	1,64	0,83
	2 mg/l 2,4-D	1,77	0,98
	3 mg/l 2,4-D	1,82	0,98
2	Tanpa kasein hidrolisat		
	1 mg/l 2,4-D	1,46	0,80
	2 mg/l 2,4-D	1,82	0,97
	3 mg/l 2,4-D	1,76	0,95

kasein hidrolisat. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa pada proses proliferasi, media tanam asal kalus dikulturkan, yaitu dengan pemberian 2,4-D dengan atau tanpa kasein hidrolisat tidak mempengaruhi besar diameter kalus yang beproliferasi. Demikian juga dengan bobot kalus yang dihasilkan tidak dipengaruhi konsentrasi 2,4-D dan kasein hidrolisat. Hasil yang diperoleh tersebut diduga karena jenis media tanam yang digunakan selama proses proliferasi hanya terdiri dari satu jenis media, yaitu MS dengan pemberian 3 mg/l 2,4-D. Selain itu, ukuran kalus yang digunakan pada awal proliferasi diseragamkan yaitu dengan ukuran 0,5—0,8 cm, sehingga mempunyai kisaran ukuran yang relatif sama. Akibatnya respon yang dihasilkan pada semua perlakuan menjadi relatif sama.

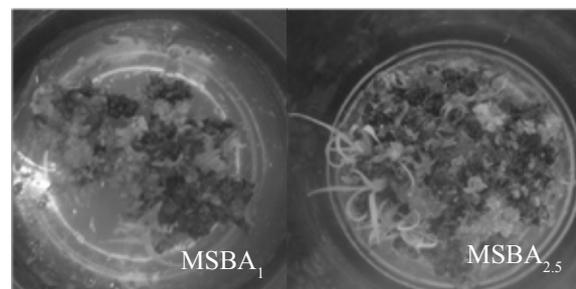
### Induksi Tunas

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan BA untuk semua konsentrasi pada media mempengaruhi pembentukan tunas pada *clump* kalus sebagaimana tersaji pada Gambar 5. Pada Gambar 5 terlihat bahwa rata-rata jumlah tunas yang terbentuk paling tinggi ditunjukkan pada perlakuan 2,5mg/l BA, yaitu skor 3. Perlakuan 1 mg/l BA menghasilkan jumlah tunas yang lebih sedikit, yaitu skor 1,77. Pada Gambar 6 dapat dilihat penampilan visual jumlah tunas yang terbentuk untuk perlakuan 1 mg/l dan 2,5 mg/l BA.

Penambahan BA pada media MS meningkatkan jumlah tunas yang terbentuk pada *clump* kalus umur 2 bulan setelah tanam pada media induksi tunas. Jumlah tunas yang dihasilkan per *clump* kalus dalam skor pada media MS yang ditambah 2,5 mg/l BA meningkat hampir 2 kali lipat dari pemberian 1 mg/l BA, yaitu dari skor 1,77 menjadi skor 3. Fenomena ini sesuai dengan yang didapatkan oleh Behera dan Sahoo (2009), yang melaporkan bahwa persentase eksplan yang membentuk tunas dan jumlah tunas per eksplan, mengalami kenaikan dengan meningkatnya konsentrasi BA dari 0,5—2,5 mg/l, yang selanjutnya mengalami penurunan kembali pada konsentrasi 3—4 mg/l. Febrianie (2008) melaporkan bahwa media MS dengan 2,5 mg/l BA menghasilkan jumlah tunas adventif tebu terbanyak.



**Gambar 5.** Pengaruh konsentrasi BA pada jumlah tunas. Jumlah tunas dinilai dengan skor (0—5) yang diuraikan dalam metode penelitian. Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 0,05.



**Gambar 6.** Penampilan tunas yang terbentuk dari kalus pada media MS yang mengandung benziladenin (BA) 1 mg/l dan 2,5 mg/l pada umur 2 bulan setelah tanam pada media induksi tunas

Kesamaan pola di atas, diduga karena efek dari BA yang dapat merangsang pembentukan tunas. Sitokinin dalam kegiatan kultur jaringan telah terbukti dapat menstimulasi terjadinya pembelahan sel, proliferasi kalus, pembentukan tunas, mendorong proliferasi meristem ujung, menghambat pembentukan akar, dan mendorong pembentukan klorofil pada kalus (Nuryani, 2006). Ditambahkan oleh George *et al.* (2008) bahwa induksi tunas dan proliferasi tunas dapat dirangsang dengan hanya menggunakan BA. BA merupakan sitokinin sintetik yang tidak diproduksi dalam tubuh tanaman dan merupakan analog sitokinin alami yang perannya sangat penting dalam mengatur pertumbuhan dan morfogenesis eksplan di dalam kultur (Murashige, 1974).

## KESIMPULAN

Berdasarkan data hasil pengamatan yang telah dikemukakan, dapat disimpulkan sebagai berikut: (1) Penambahan 3 mg/l 2,4-D pada media MS menginduksi kalus dengan ukuran tertinggi, (2) Pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap ukuran kalus yang terbentuk tidak dipengaruhi oleh konsentrasi kasein hidrolisat, (3) Konsentrasi 2,4-D dan penambahan kasein hidrolisat dalam media induksi kalus tidak berpengaruh terhadap diameter dan bobot kalus yang berproliferasi, dan (4) Penambahan 2,5 mg/l BA pada media induksi tunas menghasilkan jumlah tunas terbanyak.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A., S. Naz, F.A. Siddiqui, and J. Iqbal. 2008. Rapid clonal multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) through callogenesis and organogenesis. *Pakistan Journal Botany*. 4(1): 123—128.
- Behera, K.K. and S. Sahoo. 2009. Rapid *In vitro* micro propagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) through callus culture. *Nature and Science*. 7(4): 1-10.
- Farid, M. 2003. Perbanyak tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara *in vitro* pada berbagai konsentrasi IBA dan BAP. *J. Sains & Teknologi*. 3(30): 103—109.
- Febriani, A. P. 2008. Pengaruh benziladenin (BA) pada pembentukan tunas dari kalus tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara *in vitro* melalui organogenesis. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Gamborg, O.L. and G.C. Phillips. 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. Springer Lab Manual. Germany.
- George, E.F., M.A. Hall, dan G.J.D. Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer. Netherlands.
- Julian. 2011. Produksi Gula Jalan di Tempat. <http://www.agroindonesia.co.id>. Diakses 26 Desember 2011.
- Khan, I.A., and A. Khatri. 2006. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: Histological studies. *Pak. J. Bot.* 38(3): 631—636.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135—166.
- Nasir, I.A., G.Z. Jahangir, Z. Qamar, Z. Rahman, and T. Husnain. 2011. Maintaining the regeneration potential of sugarcane callus for longer span. *African Journal of Agricultural Research*. 6(1): 113—119.
- Nuryani, I. 2006. Tanggapan pertumbuhan nilam (*Pogostemon cablin* Benth) terhadap jenis media dasar dan penambahan benzyladenin secara *in vitro*. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Rival, A. dan G.K.A. Parveez. 2005. *Elaeis guineensis* Oil Palm. In: R.E. Litz (ed). *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. CABI Publishing. USA. p 113—143.
- Shaheen, M.S. and M.S. Mirza. 1989. *In vitro* production of plants from sugarcane tissue. *Journal of Agric. Sci.* 26: 302—312.
- Siregar, L.A.M., C. Lai-Keng, dan B. Peng-Lim. 2010. Pengaruh kasein hidrolisat dan intensitas cahaya terhadap produksi biomassa dan alkaloid *canthinone* di dalam kultur suspensi sel pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack). *Makara Sains*. 14(1): 12—21.
- Supriyaldi, Dedi. 2010. *Respons Eksplan Tebu (Saccharum officinarum L.) Terhadap 2,4-D dan Kasein Hidrolisat Dalam Proses Induksi Kalus, Induksi Tunas, dan Pengakaran In Vitro*. Tesis. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Suryana, A., D. H. Goenadi, W. R. Susila, Nahdodin, dan H. Malihan. 2005. *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Tebu*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian.
- Trigiano, R.N. and D.J. Gray. 2010. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press. Florida.
- Yakub, M. 2011. *Pabrik Gula Berkapasitas 10 Ribu Ton Dibangun di Lamongan*. [http: MediaIndonesia.com](http://MediaIndonesia.com). Diakses pada tanggal 17 Juni 2011.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. AgroMedia Pustaka. Jakarta.