

Embriogenesis Somatik Tidak Langsung pada Tanaman Sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) Menggunakan Sistem Kultur Suspensi, Perendaman Sesaat, dan Media Padat

(Indirect Somatic Embryogenesis on Sago Palm [*Metroxylon sagu* Rottb.] Using Suspension Culture and Temporary Immersion Solid Media System)

Imron Riyadi^{1,2*}, Darda Efendi^{2*}, Bambang S. Purwoko², dan Djoko Santoso¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16128 Indonesia

Telp. (0251) 8327449, 8324048; Faks. (0251) 8328516; *E-mail: dardaefendi@yahoo.com, imron_riyadi@yahoo.co.id, imron.riyadi@iribb.org

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680 Indonesia

Diajukan: 14 Desember 2015; Direvisi: 26 Februari 2016; Diterima: 22 April 2016

ABSTRACT

The accurate method of *in vitro* culture will increase the effectiveness and efficiency of sago palm callus proliferation and somatic embryogenesis induction. The research was conducted to evaluate the effectiveness of three methods for tissue culture, i.e. suspension, temporary immersion system (TIS), and solid media culture, for indirect somatic embryogenesis of sago palm "Alitir" derived from Merauke, Papua. A clump of friable calli derived from sucker's tip meristem culture was used as starting material. The calli were cultured on a modified Murashige and Skoog medium with 5.0–15.0 mg/l 2,4-D combined with 0.1 mg/l kinetin using three culture methods. There were twelve treatment combinations. The results showed that the highest fresh weight of calli was 12.0 g/flask achieved by suspension culture method supplemented with 15 mg/l 2,4-D combined with 0.1 mg/l kinetin. The highest number of somatic embryo was 384.7 pcs/flask achieved by suspension culture method with supplemented 5 mg/l 2,4-D combined with 0.1 mg/l kinetin. The best survival rate (100%) was obtained by suspension culture method for all treatments with 2,4-D concentration. During the somatic embryo induction of sago palm, the color of calli has changed from mostly yellowish to light yellow and yellowish-white.

Keywords: Calli proliferation, culture method, *Metroxylon sagu* Rottb., plant growth regulator, somatic embryo induction.

ABSTRAK

Metode kultur *in vitro* yang tepat akan meningkatkan efektivitas dan efisiensi pada proses penggandaan kalus dan induksi embriogenesis somatik. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efektivitas tiga metode kultur jaringan, yaitu sistem kultur suspensi, sistem perendaman sesaat (SPS) atau *temporary immersion system* (TIS), dan media padat, untuk proliferasi kalus dan pembentukan embrio somatik secara tidak langsung pada tanaman sagu "Alitir" yang berasal dari Merauke, Papua. Bahan tanaman atau eksplan awal yang digunakan adalah kalus remah hasil induksi dari kultur meristem pucuk tunas anakan sagu. Kalus tersebut dikulturkan pada media Murashige dan Skoog (MS) modifikasi dengan penambahan 2,4-D 5,0–15,0 mg/l dikombinasikan dengan kinetin 0,1 mg/l menggunakan ketiga metode kultur sehingga terdapat dua belas kombinasi perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bobot segar kalus tertinggi sebesar 12,0 g/bejana dicapai pada metode kultur suspensi dengan penambahan 2,4-D 15,0 mg/l dikombinasikan dengan kinetin 0,1 g/l. Perolehan jumlah embrio somatik tertinggi dicapai pada metode kultur suspensi dengan penambahan 2,4-D 5,0 mg/l dikombinasikan dengan kinetin 0,1 g/l sebesar 384,7 buah/bejana. Daya hidup kultur sagu terbaik dan tertinggi (100%) diperoleh pada metode kultur suspensi pada semua perlakuan konsentrasi 2,4-D. Selama proses induksi embrio somatik, terjadi perubahan warna kalus dari sebagian besar kekuningan menjadi krem dan putih-kekuningan.

Kata kunci: Induksi embrio somatik, metode kultur, *Metroxylon sagu* Rottb., zat pengatur tumbuh, proliferasi kalus.

PENDAHULUAN

Tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) merupakan salah satu tanaman penghasil karbohidrat yang sangat potensial dalam mendukung program peningkatan ketahanan pangan nasional (Djoefrie *et al.*, 2013; Ehara, 2009; Kanro *et al.*, 2003). Karbohidrat atau pati disimpan di dalam batang tanaman sagu dalam jumlah yang cukup besar antara 150–700 kg pati kering/batang (Flach, 1997). Sagu telah digunakan sejak dahulu sebagai makanan pokok bagi sebagian besar penduduk Indonesia bagian timur, yaitu di Maluku dan Papua (Flach, 1997; Kanro *et al.*, 2003). Selain sebagai sumber bahan pangan, tanaman sagu mempunyai banyak manfaat penting lain, yaitu sebagai sumber energi terbarukan, berupa bioetanol; sumber bahan industri, seperti lem (*adhesive gel*), sirup, mie, aneka kue, dan roti; bahan farmasi; pakan ternak (Djoefrie *et al.*, 2013; Flach, 1997; Rostiwati *et al.*, 2008;).

Untuk penyediaan secara massal benih sagu unggul, metode perbanyak *in vitro* menggunakan embriogenesis somatik penting untuk dikembangkan. Aplikasi auksin yang dikombinasikan dengan sitokinin sering ditambahkan ke dalam media untuk menginduksi baik kalus maupun embrio somatik dengan gradasi konsentrasi auksin. Auksin yang sering digunakan adalah 2,4-D karena daya induksinya lebih kuat dan harganya lebih murah dibanding dengan jenis auksin lainnya (Alkhateeb, 2006; Boufis *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2009; Hajong *et al.*, 2013; Munoz-Concha *et al.*, 2011; You *et al.*, 2011). Penelitian embriogenesis somatik tanaman sagu telah berhasil dikembangkan oleh Tahardi *et al.* (2002) dengan menggunakan sistem kultur media padat. Namun untuk pengembangan secara komersial, teknik media padat tersebut masih memiliki beberapa kendala, terutama tingkat efektivitas dan efisiensi yang rendah. Oleh karena itu, teknik embriogenesis somatik sagu dengan media cair penting untuk dikembangkan.

Penerapan kultur cair ditujukan untuk otomatisasi dan *scale-up* serta meningkatkan pertumbuhan dan keseragaman kultur (Gupta *et al.*, 2014; Jova *et al.*, 2011; Murugantham *et al.*, 2010). Beberapa teknik kultur cair potensial adalah perendaman periodik yang dikenal dengan sistem perendaman sesaat (SPS) atau *temporary immersion system* (TIS) dan kultur suspensi (*suspension culture*). Hasil penelitian pada kelapa sawit menggunakan metode SPS menunjukkan bahwa produksi embrio somatik dari kalus noduler cukup tinggi dan embrio somatik yang dihasilkan lebih seragam (Tahardi, 1998). Pada sistem kultur suspensi, perendaman berlangsung secara terus-menerus dengan dikocok (*shake*) di atas *orbital shaker* sehingga oksigen dan nutrisi yang ter-

kandung di dalam media dapat merata dan homogen (Boufis *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2014; Jova *et al.*, 2011; Muñoz-Concha *et al.*, 2011). Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efektivitas tiga metode kultur jaringan, yaitu sistem kultur suspensi, SPS/TIS, dan media padat, untuk proliferasi kalus dan pembentukan embrio somatik secara tidak langsung pada tanaman sagu “Alitir”.

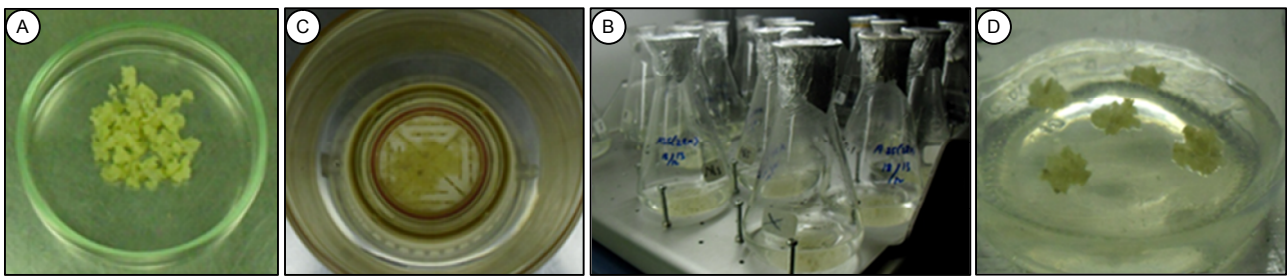
BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biak Sel dan Mikropropagasi, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia yang dimulai pada 18 Desember 2013 sampai dengan 31 Maret 2014. Bahan tanaman yang digunakan berupa kalus remah yang diinisiasi dari jaringan meristem pucuk anakan tanaman sagu jenis “Alitir” yang berasal dari Merauke, Papua.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan tiga ulangan. Data bobot basah biomassa dan jumlah embrio somatik diuji statistik menggunakan analisis keragaman (Anova). Perbedaan antar perlakuan ditentukan dengan Uji Jarak Berganda Duncan atau *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji $\alpha = 0,05$. Analisis statistik untuk data-data setiap peubah menggunakan program SPSS versi 19. Perlakuan yang digunakan adalah kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) dan metode kultur yang terdiri atas beberapa level sub-perlakuan. Perlakuan konsentrasi 2,4-D terdiri atas empat level, yaitu 0, 5, 10, dan 15 mg/l yang masing-masing dikombinasikan dengan kinetin 0,1 mg/l, kecuali pada 0 mg/l (kontrol). Perlakuan metode kultur terdiri atas tiga macam, yaitu kultur suspensi (Gambar 1B), SPS/TIS (Gambar 1C), dan media padat (Gambar 1D). Secara rinci, terdapat dua belas kombinasi perlakuan yang diuji.

Proses kultur sagu ini diatur dalam kondisi yang sama dan homogen yang meliputi sumber eksplan, kondisi *laminar air flow*, dan peralatan kultur (spatula, pinset, jarum, dan lain-lain.), serta kondisi ruang kultur yang dijaga dari kontaminasi faktor eksternal. Penelitian ini terdiri atas dua kultur yang berkesinambungan (kultur-1 dan kultur-2). Pada kultur awal atau kultur-1, sebanyak 0,5 g kalus remah sagu dimasukkan ke dalam bejana/wadah sesuai dengan perlakuan (Gambar 1A), baik perlakuan ZPT maupun metode kultur.

Eksplan kalus remah sagu dikulturkan pada media padat MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang dimodifikasi (MMS), seperti dilaporkan oleh Tahardi *et al.* (2002), sampai terbentuk kalus. Kalus yang dihasilkan dijadikan eksplan untuk menginduksi embrio somatik sesuai perlakuan yang diuji. Tingkat



Gambar 1. Kultur awal kalus remah sagu (inisiasi embriogenesis somatik) pada tiga metode kultur. A = eksplan kalus remah sebelum dikulturkan, B = kultur suspensi di atas *orbital shaker* (bar = 5 cm), C = kultur SPS, dan D = kultur media padat di dalam botol/jar (bar = 1 cm).

keasaman media diatur pada pH 5,7, selanjutnya ditambahkan *gelrite* 3 g/l khusus pada media padat, sedangkan pada media SPS ditambahkan antibiotik rifampisin dan tetrasiklin dengan konsentrasi masing-masing 15 mg/l. Selanjutnya, media tersebut disterilisasi di dalam otoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 kg/cm² selama 20 menit.

Kalus sagu pada semua perlakuan diinkubasikan di dalam ruang terang di bawah lampu TL dengan intensitas cahaya 30 $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{detik}$ dan lama penyinaran 12 jam dengan suhu ruangan 26 \pm 1°C selama 6 minggu. Setelah hasil pertumbuhan dan perkembangan pada kultur-1 diamati, subkultur (kultur-2) dilakukan pada media yang sama dengan kultur-1 yang disesuaikan dengan perlakuan masing-masing secara akumulatif. Durasi kultur-2 selama 6 minggu sehingga total lama kultur-1 dan kultur-2 selama 12 minggu.

Sampel yang digunakan untuk pengamatan histologis adalah embrio somatik pada fase perkembangan/stadium *scutellar*. Sampel tersebut difiksasi dengan formaldehid/asam asetat/alkohol (FAA) dengan konsentrasi 50% (v/v) selama 48 jam menurut protokol Johansen (1940). Selanjutnya, sampel ditransfer ke dalam etanol 70% dan didehidrasi dalam seri etanol. Sampel direndam di dalam parafin dengan temperatur 60°C. Selanjutnya, sampel dipotong secara melintang menggunakan mikrotom (*rotary microtom*) dengan mata pisau terbuat dari baja dengan ketebalan 10 μm . Hasil potongan ditempatkan di atas kaca objek (*slide*) dan diwarnai (*staining*) dengan Safranin dan Fast Green selama 10 menit (O'Brien *et al.*, 1965). Kaca objek permanen yang mengandung sampel ditutup dengan resin sintetik (Entelan®). Pengambilan foto histologis embrio somatik menggunakan alat bantu mikroskop kamera Nikon Eclipse E100 dengan perbesaran 4 \times 10 menggunakan perangkat lunak Optilab. Skala gambar diatur dengan memproyeksikan pada kondisi optik yang sama.

Peubah yang diamati pada penelitian ini terdiri atas aspek pertumbuhan dan perkembangan,

histologis embrio somatik, dan daya hidup (*survival rate*) kultur *in vitro*. Secara rinci, terdapat lima peubah yang diamati, yaitu proliferasi kalus (dihitung berdasarkan pertumbuhan biomassa berupa bobot segar), jumlah embrio somatik yang terbentuk, daya hidup total kultur, dan perubahan warna dominan kultur.

Daya hidup merupakan salah satu faktor yang penting pada kultur *in vitro* karena menentukan jumlah atau kuantitas hasil kultur yang dapat bertahan hidup lebih lanjut. Definisi daya hidup adalah jumlah sisa kultur yang bertahan hidup dibanding dengan total kultur pada awal kultur yang dinyatakan dalam persentase.

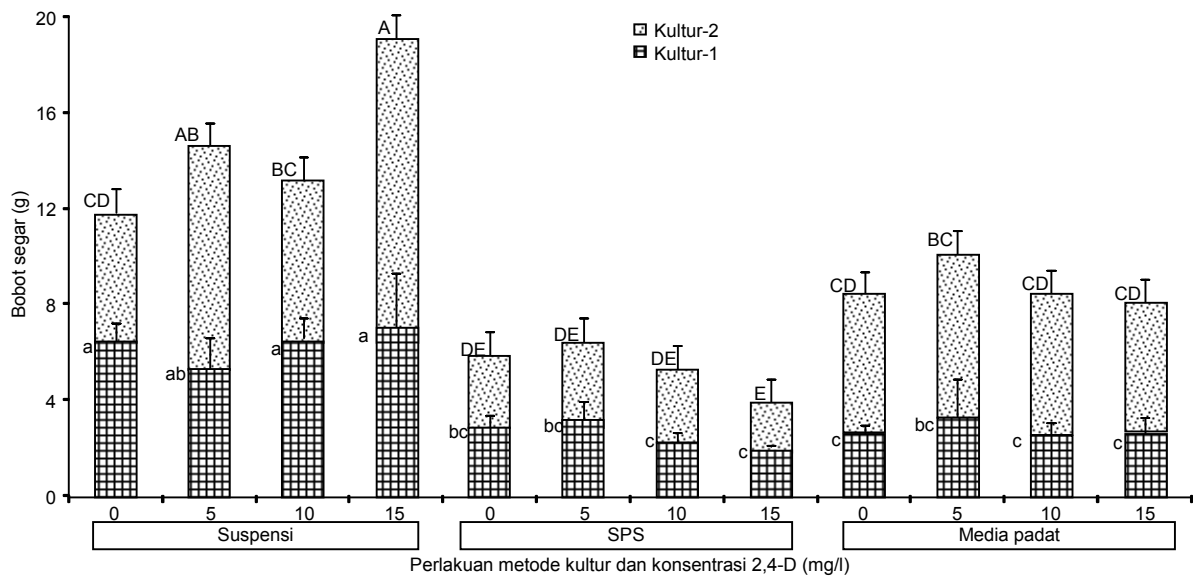
HASIL DAN PEMBAHASAN

Proliferasi Kalus dan Pertumbuhan Biomassa

Kalus yang dikulturkan pada semua perlakuan mengalami proliferasi yang cukup pesat. Setelah 6 minggu kultur, pertumbuhan biomassa kalus pada kultur-1 meningkat lebih dari 500% dibanding dengan bobot segar awal. Setelah disubkultur, pertumbuhan biomassa masih meningkat pesat, terutama pada metode kultur suspensi (Gambar 2).

Pada kultur-1, proliferasi kalus yang diukur berdasarkan bobot segar tertinggi dicapai pada perlakuan kultur suspensi dengan penambahan 2,4-D 15 mg/l dan kinetin 0,1 mg/l dengan rerata bobot segar 7,07 g/bejana atau empat belas kali lipat bobot basah pada saat awal kultur yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya (Gambar 2). Tingkat proliferasi kalus terendah diperoleh pada perlakuan SPS dengan penambahan 2,4-D 15 mg/l dan kinetin 0,1 mg/l dengan rerata bobot segar 2,06 g/bejana atau empat kali lipat bobot segar awal kultur.

Pada kultur-2, proliferasi kalus dan pertumbuhan biomassa tertinggi masih dicapai pada metode kultur suspensi dengan penambahan 2,4-D 15 mg/l dan kinetin 0,1 mg/l yang menghasilkan bobot segar sebanyak 12 g/bejana atau 22 kali lipat dibanding dengan kultur-1 atau inisiasi sebanyak 0,5 g/bejana.



Gambar 2. Proliferasi kalus dan pertumbuhan biomassa sagu pada periode kultur-1 (umur 6 minggu) dan kultur-2 (umur 12 minggu) pada kombinasi perlakuan konsentrasi ZPT dan tiga metode kultur. Bar yang sama dengan perbedaan huruf menunjukkan berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada $\alpha = 0,05$.

Secara umum, biomassa mengalami pertumbuhan pada semua perlakuan, namun lajunya mulai menurun dibanding dengan kultur-1 (Gambar 2). Adanya penurunan laju biomassa sagu ini karena terjadi perkembangan kalus embriogenik membentuk embrio somatik sehingga energi yang ada pada kalus digunakan untuk perkembangan atau menginduksi embrio somatik (Deo *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015).

Induksi Embriogenesis Somatik

Pada kultur-1, peubah perolehan embrio somatik hasil induksi menunjukkan kondisi yang berlainan dengan peubah proliferasi kalus. Meskipun pada metode SPS dihasilkan proliferasi kalus terendah, perolehan rerata embrio somatiknya merupakan yang tertinggi dibanding dengan metode kultur suspensi dan media padat dengan hasil yang berbeda nyata secara statistik (Gambar 2 dan 3).

Pada kultur-2, terjadi perkembangan yang sangat pesat untuk induksi embriogenesis somatik. Meskipun dengan metode kultur suspensi pada kultur-1 dihasilkan embrio somatik paling sedikit, pada kultur-2 dapat terbentuk embrio somatik yang banyak dan jauh di atas kedua metode kultur lainnya. Perolehan embrio somatik tertinggi sebanyak 384,7 embrio dicapai pada metode kultur suspensi dengan perlakuan 2,4-D 5 mg/l + kinetin 0,1 mg/l yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya (Gambar 3). Pada metode SPS dihasilkan embrio somatik lebih tinggi dibanding dengan media padat.

Adanya induksi embriogenesis somatik yang sangat pesat pada metode kultur suspensi ini juga

akibat pengaruh pertumbuhan biomassa yang sangat pesat pada tahap kultur-1 (Gambar 2). Pada saat kultur-2, sejalan dengan perkembangan menjadi embrio somatik, didorong oleh pengaruh ZPT 2,4-D konsentrasi relatif rendah (5 mg/l) dikombinasikan dengan kinetin 0,1 mg/l, sebagian besar biomassa yang besar tadi berkembang menjadi embrio somatik sehingga perolehan embrio somatik menjadi paling besar. Fenomena ini mirip dengan induksi embriogenesis pada tanaman kurma yang menggunakan 2,4-D konsentrasi 1–100 mg/l dikombinasikan dengan BAP 1 mg/l (Alkhateeb, 2006; Boufis *et al.*, 2014) dan pada tanaman karet yang menggunakan 2,4-D 1,0 mg/l dan BA 1,0 mg/l (Zhao *et al.*, 2015).

Perolehan embrio somatik sagu yang tinggi pada metode kultur suspensi pada penelitian ini juga disebabkan adanya pembentukan embrio somatik sekunder atau *secondary somatic embryos* (SSE). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian induksi dan proliferasi SSE pada tanaman *Cyclamen persicum* yang dapat mencapai 3.306 embrio/g bobot segar dengan penambahan 2,4-D 2 mg/l dikombinasikan dengan 0,2 mg/l BA (You *et al.*, 2011). ZPT 2,4-D yang dikombinasikan dengan kinetin pada penelitian ini tampaknya cukup untuk memacu proliferasi kalus dan pembentukan embrio somatik primer yang diikuti dengan SSE sehingga produksi embrio somatik lebih banyak.

Daya Hidup Kultur

Daya hidup kultur sagu pada kultur-1 dan kultur-2 terdapat sedikit perbedaan. Secara umum, terjadi peningkatan daya hidup pada kultur-2 dibanding

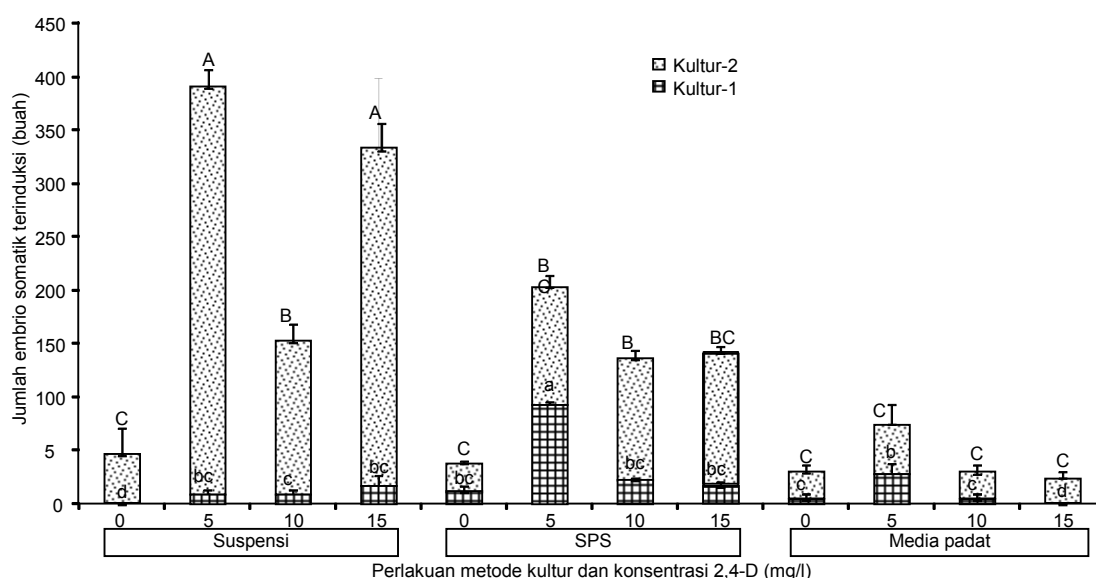
dengan pada kultur-1, kecuali pada metode SPS yang mengalami penurunan. Sebaliknya, pada metode kultur suspensi terjadi peningkatan yang sangat baik, bahkan mencapai 100% pada semua perlakuan (Tabel 1).

Tingkat daya hidup kultur sagu sangat dipengaruhi oleh kontaminasi bakteri atau fungi. Namun, sebagian besar kontaminasi tersebut disebabkan oleh bakteri. Oleh karena itu, perbedaan daya hidup pada semua kultur ini bukan disebabkan oleh faktor internal eksplan yang dikulturkan ataupun respons pertumbuhan dan perkembangan dari media yang digunakan.

Secara umum, tingkat daya hidup kultur sagu tertinggi dicapai pada metode kultur suspensi, baik kultur-1 maupun kultur-2 (Tabel 1). Hal ini disebabkan pada metode kultur suspensi proses pengerjaan kultur lebih singkat serta digunakannya tutup yang

rapat dan bersifat statis sehingga tidak ada pertukaran dengan udara luar. Konstruksi SPS mempunyai susunan yang paling rumit dan banyak celah yang dapat menjadi peluang terjadinya pertukaran udara dari luar sehingga mudah terkontaminasi. Metode media padat di dalam botol/jar mempunyai celah dan peluang rentan kontaminasi, yaitu antara tutup dan *drat* botol. Pada metode kultur suspensi tidak terdapat celah penyebab kontaminasi karena tutup bejana atau botol erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil* dengan diikat karet sehingga sangat rapat dan lebih kedap udara dibanding dengan metode SPS dan media padat. Udara yang masih dapat masuk ke dalam bejana kultur merupakan penyebab utama kontaminasi.

Dengan demikian, metode kultur suspensi merupakan metode yang paling efektif dan efisien dibanding dengan kedua metode lainnya. Secara teknis



Gambar 3. Induksi embrio somatik sagu pada periode kultur-1 (umur 6 minggu) dan kultur-2 (umur 12 minggu) pada kombinasi perlakuan konsentrasi ZPT dan tiga metode kultur. Bar yang sama dengan perbedaan huruf menunjukkan perbedaan nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada $\alpha = 0,05$.

Tabel 1. Daya hidup kultur sagu pada kombinasi perlakuan konsentrasi ZPT dan tiga metode kultur.

Metode kultur	Perlakuan		Daya hidup (%)	
	2,4-D (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Kultur-1 (6 minggu)	Kultur-2 (12 minggu)
Suspensi	0	0,0	87,5	100
Suspensi	5	0,1	100	100
Suspensi	10	0,1	75,0	100
Suspensi	15	0,1	62,5	100
SPS	0	0,0	62,5	60,0
SPS	5	0,1	100	37,5
SPS	10	0,1	75,0	50,0
SPS	15	0,1	100	50,0
Media padat	0	0,0	70,0	85,7
Media padat	5	0,1	80,0	100
Media padat	10	0,1	100	80,0
Media padat	15	0,1	100	100

dan proses kultur, SPS merupakan metode yang paling rentan kontaminasi, meskipun telah digunakan kertas saring *millipore* dengan ukuran pori (*mesh*) sangat halus ($0,22 \mu\text{m}$), terkait dengan bentuk bejana SPS dan perangkatnya yang lebih rumit, banyak menggunakan udara luar yang dipompa, dan adanya sambungan pada bagian kultur.

Perubahan Warna Dominan Kultur

Seiring dengan pertumbuhan dan perkembangan kalus menjadi embrio somatik, perubahan warna dominan juga terjadi pada permukaan kalus yang akan membentuk embrio somatik. Perubahan warna dominan tersebut agak bervariasi dari warna kuning muda pada saat inisiasi menjadi semakin pekat, tergantung stadium dan metode kultur. Secara umum, sebagian besar permukaan kalus berwarna krem dan sebagian kekuningan atau kuning keputihan pada kultur-1 (Tabel 2).

Pada kultur-2, perubahan warna dominan tidak terlalu kontras dibanding dengan kultur-1, yaitu hampir semua berwarna krem, sedikit putih-kekuningan (Tabel 2). Semakin banyak embrio somatik yang terbentuk pada kalus, semakin pekat warna kalus yang berkembang menjadi embrio atau kalus embriogenik. Embrio somatik yang terbentuk mempunyai permukaan halus (*smooth*) dan mengkilap (*shiny*) sehingga

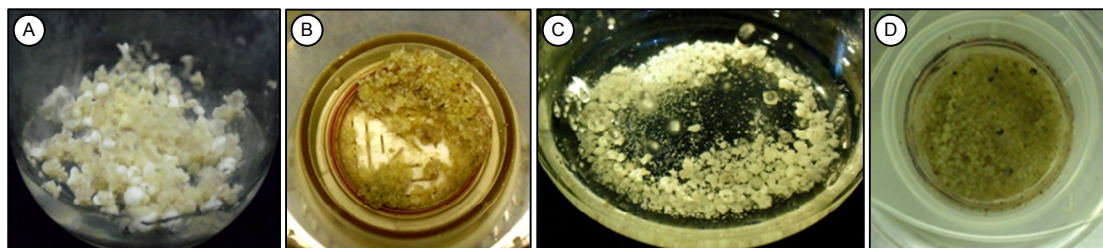
pada kultur-2 dapat dibedakan antara kalus dan embrio somatik (Gambar 4 dan 5). Kondisi ini hampir sama dengan hasil penelitian Cai *et al.* (2009) pada tanaman obat *Gentiana straminea* Maxim yang menghasilkan kalus dan embrio somatik berwarna kekuningan dan hijau-kekuningan. Perubahan warna kalus berkaitan dengan adanya pembentukan embrio somatik. Semakin tinggi atau dewasa tingkat perkembangan embrio somatik, semakin pekat perubahan warnanya, yaitu ke arah krem, keputihan, kekuningan, kehijauan, dan kemerahan (Riyadi dan Sumaryono, 2009).

Perkembangan Embriogenesis Somatik

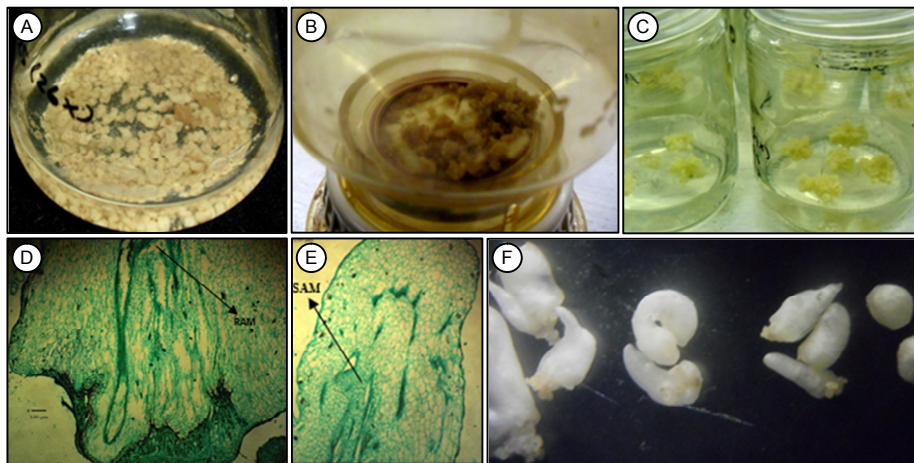
Perkembangan embrio somatik pada ketiga metode kultur dengan kandungan ZPT yang sama menunjukkan bentuk dan pola yang hampir sama. Sedikit perbedaan yang tampak adalah ukuran embrio somatik yang dihasilkan. Embrio somatik pada kultur SPS sebagian besar memperlihatkan ukuran yang lebih kecil dibanding dengan kedua metode lainnya (Gambar 5B). Sebaliknya, embrio somatik pada kultur suspensi sebagian menunjukkan ukuran yang lebih besar dibanding dengan kedua metode lainnya (Gambar 5A). Embrio somatik pada media padat menunjukkan ukuran yang lebih variatif, sebagian berukuran besar, namun ada juga yang agak kecil (Gambar 5C).

Tabel 2. Perkembangan perubahan warna dominan kultur sagu pada kombinasi perlakuan konsentrasi ZPT dan tiga metode kultur.

Metode kultur	Perlakuan		Perubahan warna dominan	
	2,4-D (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Kultur-1 (6 minggu)	Kultur-2 (12 minggu)
Suspensi	0	0	Krem	Krem
Suspensi	5	0,1	Krem	Krem
Suspensi	10	0,1	Krem	Krem
Suspensi	15	0,1	Kuning	Krem
SPS	0	0	Krem	Krem
SPS	5	0,1	Krem	Putih kekuningan
SPS	10	0,1	Krem	Krem
SPS	15	0,1	Krem	Krem
Media padat	0	0	Krem	Krem
Media padat	5	0,1	Krem	Krem
Media padat	10	0,1	Kuning	Putih kekuningan
Media padat	15	0,1	Kuning	Krem



Gambar 4. Pertumbuhan dan perkembangan kalus menjadi embrio somatik pada tiga metode kultur pada periode kultur-1 (umur 6 minggu). A = kultur suspensi, B = kultur SPS, C = kultur media padat, D = penyaringan atau pengambilan embrio somatik saat panen metode kultur suspensi.



Gambar 5. Pertumbuhan dan perkembangan kalus menjadi embrio somatik tiga metode kultur pada periode kultur-2 (umur 12 minggu). A = kultur suspensi, B = kultur SPS, C = kultur media padat, D = penampang melintang embrio somatik stadium *scutellar* bagian pangkal (calon akar), E = penampang melintang embrio somatik stadium *scutellar* bagian ujung (calon tunas), dan F = embrio somatik berbagai stadium (dari kiri ke kanan: *coleoptilar-scutellar elongated-globular*) hasil panen dengan kekuatan perbesaran mikroskop 4×10 . Bar = 1 cm, kecuali pada E sebesar 1 mm.

Pada kultur-2, semua perlakuan telah menghasilkan embrio somatik dengan stadium yang lengkap, meskipun jumlahnya berbeda bergantung pada perlakuan. Stadium embrio somatik mulai dari *globular*, *elongated*, *scutellar*, dan *coleoptilar* yang telah dihasilkan terlihat jelas pada pengamatan di bawah mikroskop model Zeiss dengan perbesaran 4×10 (Gambar 5F). Perkembangan embrio somatik pada setiap stadium dapat dibedakan secara jelas berdasarkan bentuk dan arah perkembangan calon tunas (*plumulae*) dan calon akar (*radicle*) yang dapat diperhatikan pada ujung dan pangkal embrio somatik tersebut (Gambar 5F).

Hasil pengamatan histologis menetapkan bahwa embrio somatik sagu yang dihasilkan sempurna karena mempunyai dua kutub perkembangan (*bipolar*) berupa *shoot apical meristem* (SAM) dan *root apical meristem* (RAM). Preparat embrio somatik yang telah diwarnai dengan FAA dan Fast Green menunjukkan adanya SAM dan RAM dengan pengamatan mikroskop Nikon Eclipse E100 dengan perbesaran 4×10 menggunakan perangkat lunak Optilab (Gambar 5D dan 5E). Posisi SAM dan RAM berturut-turut disajikan pada Gambar 5E dan 5D.

Berdasarkan preparat embrio somatik stadium *scutellar* (Gambar 5D dan 5E), terlihat adanya lapisan yang menunjukkan SAM dan RAM dengan ciri-ciri warna yang lebih gelap dengan susunan sel yang lebih padat dan rapat, serta ukuran sel yang lebih homogen dan relatif lebih kecil (Gambar 5D dan 5E). Hal ini mirip dengan hasil pengamatan histologis pada *Arabidopsis* (Takada *et al.*, 2001) dan tanaman obat *G. straminea* Maxim (Cai *et al.*, 2009) yang menunjukkan adanya susunan sel yang lebih padat dan rapat dengan ukuran relatif lebih kecil pada

meristematic zone untuk perkembangan proembrio dan embrio. Hasil pengamatan histologis embrio somatik normal sagu tersebut menunjukkan kecenderungan susunan sel yang sama dengan tanaman kurma cv. Gundila (El Dawayati *et al.*, 2012) dan tebu (Alcantara *et al.*, 2014).

KESIMPULAN

Proliferasi kalus embriogenik dan induksi embriogenesis somatik tanaman sagu dapat dilakukan dengan metode kultur suspensi, SPS, dan media padat. Secara histologis dan morfologis, embrio somatik yang dihasilkan mempunyai potensi tumbuh dan berkembang secara normal karena memiliki SAM atau calon tunas dan RAM atau calon akar. Proses proliferasi kalus embriogenik dan induksi embrio somatik sagu terbaik dicapai pada perlakuan metode kultur suspensi dengan aplikasi 2,4-D 5 mg/l dikombinasikan dengan kinetin 0,1 mg/l. Kultur suspensi mempunyai efektivitas paling tinggi untuk menginduksi embrio somatik dibanding dengan metode SPS dan media padat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT RPN atas pendanaan Proyek Revitalisasi Sagu. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Laboratorium Mikroteknik, Fakultas Biologi, IPB dan Laboratorium Mikroteknik, Departemen Biologi, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI atas bantuannya untuk analisis histologis embrio somatik sagu. Tidak lupa disampaikan terima kasih atas bantuan Tim Laboratorium Biak Sel dan Mikropropagasi, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia,

Sdr./Sdri. R. Ridwan, Yuniasari, dan Aliyah khususnya, atas dukungan waktu dan tenaganya.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcantara, G.B.D., R. Dibax, R.A.D. Oliveira, J.C.B. Filho, and E. Daros. 2014. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. *Acta Sci. Agron.* 36(1):63–72.
- Alkhateeb, A.A. 2006. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Sukary in response to sucrose and polyethylene glycol. *Biotechnol.* 5(4):466–470.
- Boufis, N., M.K. Slaoui, Z. Djillali, D. Zaoui, A. Morsli, M.A. Bernards, A. Makhzum, and L. Khelifi. 2014. Effects of growth regulators and types of culture media on somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida). *Sci. Hort.* 172:135–142.
- Cai, Y., Y. Liu, Z. Liu, F. Zhang, F. Xiang, and G. Xia. 2009. High-frequency embryogenesis and regeneration of plants with high content of gentiopricosida from the Chinese medicinal plant *Gentiana straminea* Maxim. In *Vitro Cell. Dev. Biol.* 45:730–739.
- Deo, P.C., A.P. Tyagi, M. Taylor, R. Harding, and D. Becker. 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *SPJNS* 28(1):27–40.
- Djoefrie, H.M.H.B., S.A. Syafruddin, R.K. Dewi, dan D. Ahyuni. 2013. Sagu, mutiara hijau khatulistiwa yang dilupakan. Digreat Publishing, Indonesia.
- Ehara, H. 2009. Potency of sago palm as carbohydrate resource for strengthening food security program. *J. Agron. Indonesia* 37(3):209–219.
- El Dawayati, M.M., H.A.E. Ola, Z.E. Zaid, and A.F.M.Z. El Din. 2012. *In vitro* morpho-histological studies of newly developed embryos from abnormal malformed embryos of date palm cv. Gundila under desiccation effect of polyethylene glycol treatments. *Ann. Agri. Sci.* 57(2):117–128.
- Flach, M. 1997. Sago palm *Metroxylon sagu* Rottb. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 13. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Gupta, P., S. Sharma, and S. Saxena. 2014. Effect of salts (NaCl and Na₂CO₃) on callus and on culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172:2894–2906.
- Hajong, S., S. Kumaria, and P. Tandon. 2013. Effect of plant growth regulators on regeneration potential of axenic nodal segments of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. *J. Agr. Sci. Tech.* 15:1425–1435.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York, NY, US.
- Jova, M.N., G.K. Rafael, and E.C. Ernesto. 2011. Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. 'Pacala Duclos'). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(4):515–521.
- Kanro, M.Z., A. Rouw, A. Widjono, Syamsuddin, Amisnaipa, dan Atekan. 2003. Tanaman sagu dan pemanfaatannya di Propinsi Papua. *J. Litbang Pertanian* 22(3):116–124.
- Muñoz-Concha, D., S. Mayes, G. Ribas, and M.R. Davey. 2011. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and shoot-tips of the Chilean tree *Gomortega keule*. *Plant Cell Tiss. Org.* 109:123. doi:10.1007/s11240-011-0080-y.
- Murashige, T. and F. Skooge. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473–479.
- Muruganantham, M., S. Amutha, and A. Ganapathi. 2010. Somatic embryo productions by liquid shake culture of embryogenic calluses in *Vigna mungo* (L.) Hepper. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 46:34–40.
- O'Brien, T.P., N. Feder, and M.E. McCully. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59(2):368–373.
- Riyadi, I. dan Sumaryono. 2009. Pengaruh interval dan lama perendaman terhadap pertumbuhan dan pendewasaan embrio somatik tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.). *Menara Perkebunan* 77(2):94–103.
- Rostiwati T., Y. Lisnawati, S. Bustomi, B. Leksono, D. Wahyono, S. Pradjadinata, R. Bogidarmanti, D. Djaenudin, E. Sumadimangsa, dan N. Haska. 2008. Sagu (*Metroxylon* spp.) sebagai sumber energi bioetanol potensial. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan dan Perkebunan, Jakarta.
- Tahardi, J.S. 1998. Improvement of oil palm somatic embryogenesis by periodic immersion in liquid medium. In: A. Jatmika, D. Bangun, D. Asmono, E.S. Sutarta, K. Pamin, P. Guritno, S. Prawirosukarto, T. Wahyono, T. Herawan, T. Hutomo, W. Darmosarkoro, Y.T. Adiwiganda, dan Z. Poeloengan, editors, *Proceedings of International Oil Palm Conference*, Bali, Indonesia. p. 595–601.
- Tahardi, J.S., N.F. Sianipar, and I. Riyadi. 2002. Somatic embryogenesis in sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.). In: K. Kaimuna, M. Okazaki, Y. Toyoda, and J.E. Cecil, editors, *Proceedings of International New Frontiers of Sago Palm Studies*. Universal Academic Press, Tokyo, Japan. p. 75–81.
- Takada, T.S., K. Hibara, T. Ishida, and M. Tasaka. 2001. The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128:1127–1135.
- You, C.R., T.J. Fan, X.Q. Gong, F.H. Bian, L.K. Liang, and F.N. Qu. 2011. A high-frequency cyclic secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tiss. Org.* 107:233–242.
- Zhao, H., R.Z. Jia, Y.J. Zhu, A.P. Guo, H.C. Zeng, and M. Peng. 2015. Efficient induction, proliferation, and regeneration of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) via somatic embryogenesis. *J. Anim. Plant Sci.* 25(1):134–140.