Pengaruh berbagai Formulasi Media terhadap Regenerasi Kalus Padi Indica

Endang G. Lestari dan Ika Mariska

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Kultur *in vitro* merupakan aplikasi yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan genotipe baru yang tahan terhadap faktor biotik maupun abiotik. Untuk men-capai hasil sesuai dengan yang diharapkan maka sistem regenerasi harus dikuasai terlebih dahulu antara lain pada padi Indica yang banyak dilaporkan sulit diregenerasikan. Dengan diperolehnya sistem regenerasi maka penelitian perbaikan dapat dilakukan antara lain untuk sifat tahan terhadap kekeringan melalui metode seleksi *in vitro*. Varietas yang digunakan untuk diuji sistem regenerasinya adalah Cisadane, Bengawan Solo, Towuti, Gajahmungkur, dan Jati Luhur. Kalus yang diperoleh dari embrio zigotik dengan media tumbuh MS + 2 mg/l 2,4-D + 2 g/l kasein hidrolisat diregenerasikan pada media MS + BA (1-5 mg/l) + IAA 0,1 mg/l atau thidiazuron (0,2-0,4 mg/l) + zeatin 0,1 mg/l atau prolin 100 mg/l. Untuk perakaran digunakan media dasar MS (1, ½) + IAA 1 mg/l. Hasil penelitian menunjukkan untuk varietas Gajahmungkur persentase keberhasilan regenerasi yang tinggi (30%) diperoleh dari media MS+ BA 3 mg/l + thidiazuron 0,5 mg/l. Dengan varietas yang sama keberhasilan dapat lebih meningkat, yaitu 80% apabila digunakan media MS + BA 3 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l dan perakaran dengan MS ½ + IAA 1 mg/l. Regenerasi tunas pada varietas Cisadane dan Bengawan Solo dapat meningkat menjadi 70 dan 60% dengan melakukan subkultur seawal mungkin pada media yang sama, yaitu MS + BA 3 dan 5 mg/l + IAA 0,1 mg/l + zeatin 0,1 mg/l.

Kata kunci: Kultur *in vitro*, padi Indica, sistem regenerasi

ABSTRACT

In vitro culture can be applied for producing new genotype which is tolerant to biotic and abiotic factors including water stress resistant. To obtain the optimum result of variety improvement, regeneration system should firstly found out. It is sufficiently difficult to regenerate Indica rice. Hence, with this system, the improvement of Indica rice can produce tolerant character to water stress through *in vitro* selection with PEG (0-30%). Cisadane, Bengawan Solo, Towuti, Gajahmungkur, and Jatiluhur were Indica rice varieties using this experiment. Callus was produced from zygotic embryo which is cultured at medium MS + 2.4-D 2 mg/l + casein hidrolisat 2 g/l and regenerated at MS + BA 1-5 mg/l + IAA 0.1 mg/l or thidiazuron (0.2-0.4 mg/l), zeatin 0.1 mg/l or prolin 100 mg/l. MS (1, ½) + IAA 0.1 mg/l was used for root development. Regeneration of Cisadane and Bengawan Solo were 70 and 60% respectively with subculture at the same medium (MS + BA 3 and 5 mg/l + IAA 0.1 mg/l + zeatin 0.1 mg/l).

Key words: *In vitro* culture, Indica rice and regeneration

PENDAHULUAN

Regenerasi tunas dari eksplan kalus merupakan proses yang kompleks, banyak faktor yang mempengaruhi, antara lain genotipe tanaman, keseimbangan zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin baik yang terdapat di luar maupun di dalam sel serta kondisi fisiologi kalus. Kalus yang masih segar terutama pada padi mempunyai respon lebih baik dibandingkan dengan kalus yang telah disubkultur berkali-kali atau mengalami periode kultur yang panjang dan telah mengalami perlakuan radiasi atau seleksi, kerusakan kalus karena radiasi juga menurunkan kemampuan regenerasi. Padi dari jenis Japonica hanya varietas Taipei-309 dan Niponbare saja yang sudah dikuasai metode regenerasinya. Sehingga belum ada teknik regenerasi yang dapat diaplikasikan untuk semua varietas padi. Pembentukan tunas dari kalus embriogenik dipengaruhi oleh genotipe (Lutts *et al.*, 1999)

Untuk memacu pembentukan tunas dapat dilakukan dengan memanipulasi dosis auksin dan sitokinin (Poonsapaya *et al.*, 1989). Varietas Taipei-309 merupakan tanaman model, karena regenerasi pada tanaman ini lebih mudah dibandingkan dengan varietas lainnya. Dengan demikian, untuk mendapatkan formulasi media regenerasi yang optimal pada varietas Indica perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan kombinasi berbagai auksin dan sitokinin serta beberapa genotipe. Sampai saat ini, belum ada laporan lengkap mengenai formulasi media yang dapat diterapkan untuk semua varietas atau semua genotipe (Ogawa, 2000).

Faktor lain yang berpengaruh dalam proliferasi dan regenerasi tunas adalah perbandingan antara NH_4^+ dan NO_3^- di dalam media, kandungan asam amino serta tekanan osmotik (Zhu *et al.*, 1996), namun demikian banyak hasil penelitian menunjukkan bahwa zat pengatur tumbuh sangat berperan dalam menentukan arah morfogenesis. Pada penelitian Maftuchah *et al.* (2000) kalus dari padi varietas Indica dapat beregenerasi pada media MS + BA 0,7 mg/l + IAA 0,1 mg/l.

Telah diperoleh formulasi media untuk regenerasi tunas varietas Cisadane, yaitu BA 5 mg/l + IAA 0,1 mg/l, pada varietas Bengawan Solo adalah BA 3 mg/l + NAA 0,1 mg/l + kinetin 1 mg/l + zeatin 0,1 mg/l. Pada varietas Gajahmungkur adalah BA 3 mg/l + IAA 0,1 mg/l + zeatin 0,2 mg/l, namun persentase kalus beregenerasi masih rendah. Untuk meningkatkan persentase kalus bertunas dicoba media yang baru atau melakukan subkultur berulang untuk meningkatkan kemampuan kalus beregenerasi.

Tujuan penelitian adalah mendapatkan metode regenerasi tunas adventif pada beberapa varietas padi Indica.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi dan Pertumbuhan Tanaman, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian,

dari bulan Januari-November 2002. Varietas padi yang digunakan adalah Cisadane, Bengawan Solo, Towuti, Gajahmungkur, dan Jatiluhur. Penelitian terdiri dari 2 tahap yang berurutan, yaitu pembentukan kalus dan regenerasi kalus membentuk tunas adventif.

Pada tahap pertama, yaitu pembentukan kalus digunakan eksplan embrio zigotik yang dikulturkan pada media MS + 2,4-D 2 mg/l + kasein hidrolisat 2 g/l + sukrosa 3 g/l, vitamin MS (meso inositol 100 mg/l, piridoksin 0,5 mg/l, asam nikotinat 0,5 mg/l, thiamin 0,1 mg/l) dan gelrite 2,5 g/l. Pada tahap kedua kalus embrionik yang terbentuk kemudian disubkultur pada media regenerasi, yaitu MS + BA 1-5 mg/l + IAA 0,1 mg/l atau thidiazuron (0,2-0,4 mg/l), zeatin 0,1 mg/l atau prolin 100 mg/l. Konsentrasi sukrosa, gelrite, dan vitamin yang diberikan sama dengan tahap pertama. Percobaan disusun dengan Rancangan Acak Lengkap masing-masing perlakuan terdiri dari 10 botol.

Tunas adventif yang terbentuk kemudian diakarkan pada media MS (1, ½) + IAA 1 mg/l. Pengenceran media (MS ½) hanya dilakukan pada garam-garam makro saja.

Peubah yang diamati pertumbuhan kalus menghasilkan tunas, persentase kalus berunas, dan penampakan visual tunas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada percobaan ini eksplan yang digunakan adalah embryo zigotik agar di-dapatkan kalus yang embrionik. Eksplan tumbuh dengan cepat membentuk kalus dengan ukuran mencapai diameter 1 cm pada umur 8-10 minggu setelah tanam. Untuk mendapatkan kalus yang remah, maka dilakukan subkultur satu sampai dua kali pada media baru dengan formulasi yang sama.

Formulasi media induksi kalus untuk kelima varietas yang dicoba (Cisadane, Bengawan Solo, Towuti, IR64, dan Gajahmungkur) sama, yaitu MS + 2,4-D 2 mg/l + kasein hidrolisat 2 g/l. Kalus yang dihasilkan dari perlakuan tersebut berwarna putih kekuningan dengan struktur yang remah.

Penambahan kasein hidrolisat pada media yang sudah mengandung auksin 2,4-D dapat meningkatkan pertumbuhan kalus embrionik (George, 1993). Kasein hidrolisat merupakan asam amino sebagai sumber N organik yang akan lebih cepat diserap oleh sel/jaringan daripada N organik. Selanjutnya George (1993) menyatakan bahwa penambahan asam amino (kasein hidrolisat) pada media yang sudah mengandung auksin dapat meningkatkan keberhasilan pembentukan kalus embrionik, karena di dalam kloroplas, asam amino mempunyai peran sebagai pre-kursor untuk pembentukan asam nukleat dan proses seluler lainnya.

Kemampuan regenerasi tunas dapat meningkat dengan melakukan subkultur spot hijau yang sudah terbentuk pada media yang sama (Tabel 1). Dari Tabel 1 dapat dilihat adanya peningkatan keberhasilan persentase

regenerasi tunas yang dihasilkan. Pada seleksi *in vitro* umumnya terjadi penurunan kemampuan regenerasi setelah massa sel diinkubasi dalam kondisi stres. Seperti halnya pada sel-sel somatik tanaman tomat yang diseleksi dengan Al dan pH rendah. Diperlukan waktu yang lama untuk regenerasi sel yang telah terseleksi (Ojima dan Ohira, 1982). Dengan demikian, sebelum seleksi dengan PEG, sistem regenerasi dengan keberhasilan yang tinggi harus dikuasai terlebih dahulu.

Spot berwarna hijau pada kalus pada umumnya akan mati atau menjadi coklat bila tidak segera disubkultur pada media baru, atau terjadi dediferensiasi di mana massa sel terus membelah dan tidak terorganisasi. Beberapa kemungkinan yang menyebabkan kalus tidak dapat beregenerasi antara lain karena media tidak sesuai disebabkan keseimbangan zat pengatur tumbuh yang ada di dalam sel dan di luar sel baik antara auksin dan sitokinin tidak sesuai (Thorpe, 1994) atau kalus telah mengalami kerusakan atau penurunan kemampuan regenerasi karena pengaruh perlakuan radiasi dan seleksi (Biswas *et al.*, 2002).

Tanda bahwa kalus yang diregenerasikan dapat membentuk tunas antara lain terjadinya perubahan warna dari kecoklatan atau dari kuning menjadi putih kekuningan selanjutnya menjadi kehijauan, perubahan warna tersebut merupakan tanda adanya morphogenesis (George, 1993). Perubahan warna ini umumnya terjadi pada minggu kedua setelah subkultur.

Kalus dari varietas Gajahmungkur yang disubkultur pada beberapa komposisi media regenerasi dapat membentuk kalus yang embriogenik namun spot hijau (nodul bakal tunas) yang dihasilkan berbeda (Tabel 2). Persentase pembentukan spot hijau tertinggi dihasilkan pada perlakuan MS + BA 3 mg/l + IAA 0,3 mg/l + zeatin 0,1 mg/l (50%), tetapi tunas yang dihasilkan hanya sedikit (10%) begitu pula pada perlakuan lainnya, bahkan dari perlakuan media MS + BA 3 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l tidak ada satupun

Tabel 1. Pengaruh formulasi media dan subkultur terhadap kemampuan regenerasi kalus

Varietas	Formulasi media (mg/l)	Persentase kalus beregenerasi asal dari kalus yang tidak disubkultur	Persentase kalus beregenerasi asal dari kalus yang disubkultur
Cisadane	MS + BA 5 mg/l + IAA 0,1 mg/l + zeatin 0,1 mg/l	50	70
Bengawan Solo	MS + BA 3 mg/l + IAA 0,1 mg/l + zeatin 0,1 mg/l	45	60

Tabel 2. Pengaruh formulasi media terhadap regenerasi kalus membentuk tunas pada varietas Gajahmungkur

Formulasi media	Persentase kalus dengan spot hijau	Persentase kalus berwarna kuning	Persentase kalus bertunas
BA 3 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l	25	75	0
BA 3 mg/l + thidiazuron 0,5 mg/l	30	40	30
BA 3 mg/l + IAA 0,1 mg/l + zeatin 0,2 mg/l	20	40	20
BA 3 mg/l + IAA 0,3 mg/l + zeatin 0,1 mg/l	50	40	10

kalus yang dapat beregenerasi membentuk tunas.

Persentase pembentukan tunas tertinggi dihasilkan pada perlakuan MS + BA 3 mg/l + thi 0,5 mg/l. Untuk meningkatkan jumlah kalus yang beregenerasi dilakukan subkultur kalus pada media yang sama namun keberhasilannya tidak meningkat. Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik maka percobaan selanjutnya ditambahkan prolin 100 mg/l pada media MS + BA (1 dan 5 mg/l) + IAA 0,1 mg/l. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan jumlah spot (nodul) berwarna hijau pada kalus (Tabel 3). Di samping ada peningkatan pembentukan spot yang berwarna hijau pada kalus, penambahan prolin dapat mempercepat waktu terbentuknya spot hijau tersebut.

Penambahan prolin ke dalam media yang sudah mengandung BA dan IAA menunjukkan bahwa spot hijau yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan sebelumnya. Spot (nodul) hijau yang didapatkan segera disubkultur pada media baru dengan komposisi media yang sama, dan ternyata kalus dapat beregenerasi membentuk tunas. Prolin adalah asam amino yang berperan sebagai osmoregulator di dalam sel. Komponen organik tersebut telah banyak digunakan untuk meningkatkan kemampuan kalus membentuk tunas pada berbagai tanaman. Prolin berperan untuk menjaga keseimbangan antara kompartemen sel, vital sebagai stabilisator protein dan aktivitas enzim (Maestri *et al.*, 1995).

Formulasi media yang terbaik untuk regenerasi tunas pada varietas

Tabel 3. Pengaruh penambahan prolin terhadap pembentukan spot hijau pada kalus varietas Gajahmungkur

Formulasi media regenerasi (mg/l)	Persentase kalus dengan spot hijau
BA 1 + IAA 0,1 + prolin 100	60
BA 5 + 0,1 + 100	80

Tabel 4. Pengaruh komposisi media terhadap regenerasi kalus membentuk spot hijau dan tunas varietas Jatiluhur

Formulasi media regenerasi (mg/l)	Persentase pembentukan spot hijau	Persentase pembentukan tunas
MS + BA 3 + IAA 1	70,35	68,10
MS + BA5 + IAA 1	65,50	60,25
MS + BA 3 + thidiazuron 0,2	74,15	71,20
MS + BA 3 + IAA 0,1 + zeatin 0,2	70,50	70,10

Tabel 5. Pengaruh komposisi media terhadap pembentukan akar, varietas Jatiluhur

Formulasi media	Jumlah akar	Panjang akar (cm)
½ MS + IAA 1	8,5	2,4
MS + IAA 1	7,0	2,0

Jatiluhur, ternyata sama dengan untuk varietas Bengawan Solo dan Cisadane (Tabel 4). Pada media MS + BA 3 mg/l + IAA 0,1 mg/l + zeatin 0,1 mg/l, kalus yang dapat membentuk spot hijau mencapai 70,5% dan tunas sebesar 70,1%. Hasil tersebut tidak berbeda dengan perlakuan media MS + BA 3 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l, kalus yang bertunas sebesar 71,2%.

Untuk memacu perakaran pada varietas Jatiluhur telah dicoba 2 formulasi media (Tabel 5), dan akar terbanyak dihasilkan dari perlakuan media $\frac{1}{2}$ MS + IAA 1 mg/l, yaitu 8,5 dan panjang akar 2,4 cm.

Pengenceran kandungan unsur makro sampai dengan setengahnya dari media dasar MS memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan media MS penuh kandungannya. Unsur N yang tinggi pada media MS (NH_4^+ dan NO_3^-) dapat menginduksi biosintesis sitokinin yang banyak berperan dalam pertunasan sehingga dalam media MS penuh yang diberi IAA akan terjadi suatu keseimbangan antara pertunasan dan perakaran.

KESIMPULAN

1. Pada varietas Cisadane dan Bengawan Solo keberhasilan regenerasi meningkat dari 45-50% menjadi 70 dan 60% apabila kalus disubkultur pada media yang sama dengan media awal, yaitu MS + BA (3 dan 5 mg/l) + zeatin 0,1 mg/l.
2. Untuk varietas Gajahmungkur persentase kalus pertunas mencapai 30% apabila kalus dikulturkan pada media MS + BA 3 mg/l + thidiazuron 0,5 mg/l.
3. Pembentukan spot hijau paling tinggi (80%) dari media MS + BA 5 mg/l + IAA 0,1 mg/l + prolin 100 mg/l.
4. Pada varietas Jatiluhur media MS + BA 3 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l dan MS + BA 3 mg/l + IAA 0,1 mg/l + zeatin 0,2 mg/l memberikan keberhasilan regenerasi tinggi, yaitu 71,20% dan 70,10%.
5. Keberhasilan perakaran yang baik berasal dari MS ($\frac{1}{2}$) + IAA 1 mg/l.

DAFTAR PUSTAKA

- Biswas, J., B. Chowdhury, A. Bhattacharya, and B. Mandal. 2002.** *In vitro* screening for increases drought tolerance in rice. *In Vitro Cell. Dev Biol-Plant* 38:525-530.
- George, E.F. 1993.** Plant propagation by tissue culture. Part 2 In Practice. Exegetics Lim. England. p. 1361.
- Luts, S., J.M. Kinet, and J. Bouharmont. 1999.** Improvement of rice callus regeneration in presence of NaCl. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. 57:3-11.

- Ogawa. 2000.** Improvement of cell culture condition for rice. JARC 34(4):215-223.
- Ojima, K. and K. Ohira. 1982.** Characterization and regeneration of aluminum tolerant from carrot cell culture. Jap. Ann. Plant Tissue Culture. Tokyo.
- Maftuchah, I.H. Slamet-Loedin, dan S.H. Aswidinnor. 2000.** Induksi tunas dari kalus embriogenik padi Cisadane dalam berbagai konsentrasi IAA dan BAP. Makalah *dalam* Kongres dan Seminar Nasional II PBPI. Yogyakarta, 7-8 November 2000.
- Maestri, M., F.M. Da Matta, A.J. Ragazzi, and R.S. Barros. 1995.** Accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in mature leaves of water stressed coffee plants (*Coffea arabica* and *C. caneflora*). Journal of Hort Science 70(2):228-223.
- Poonsapaya, P., M.W. Nabors, W. Kersi, and M. Vajrabhaya. 1989.** A comparison of methods for callus culture and plant regeneration of RD 25 rice (*Oryza sativa* L.) *in vitro* laboratories. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture 16:175-186.
- Thorpe, T.A. 1994.** Morphogenesis and regeneration. *In* I.K. Vasil and T.A. Thorpe (Eds). Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Acad Publisher. Dordrecht. p. 17-36.
- Zhu, Y., W. Ouyang, Y. Lie, dan Z. Chen. 1996.** The effects of 2ip and 2.4-D on rice calli differentiation. Plant Growth Regulation 19:19-24.