Jurnal Agro*Biogen* 13(1):35–42

Optimasi Regenerasi Padi *Indica* melalui Jalur Organogenesis

(Optimization of *Indica* Rice Regeneration Method through Organogenesis System)

Rossa Yunita[1]*, Nurul Khumaida[2], Didy Sopandie[2], dan Ika Mariska[1]

[1]Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: rossa_yunita@yahoo.com
[2]Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680 Indonesia

Diajukan: 4 Januari 2017; Direvisi: 27 Februari 2017; Diterima: 28 April 2017

ABSTRACT

Crop regeneration is an important step that needs to be mastered first before its application for variety development using *in vitro* culture breeding method. The aims of this research was to optimize the regeneration method of *indica* rice done through organogenesis technique. The experimental design used was a completely randomized factorial. Five rice varieties were used in this study namely Ciherang, Inpari 13, Inpara 3, Pokkali, and IR29. The treatments were MS + 2,4-D (0, 1, 3, 5, 7 mg/l) + 3 g/l casein hidrolysate for organogenic callus induction and MS + BA (0, 1, 5 mg/l) + zeatin (0, 0.1, 0,3 mg/l) for shoot regeneration. For shoot multiplication, the treatment was MS + thidiazuron/TDZ (0, 0.1, 0,3 mg/l) and for root induction, the treatment was MS+ IBA (0, 1, 2, 3 mg/l). The result showed that the best medium for callus induction for Ciherang, Inpari 13, and Pokkali was MS + 3 mg/l 2,4-D, while the best medium for Inpari 3 and IR29 was MS + 5 mg/l 2,4-D. The best medium for shoot regeneration for Ciherang was MS + 5 mg/l BA + 0.1 mg/l zeatin + 100 mg/l prolin 100, for Inpari 13 the best medium was MS + 3 mg/l BA + 0.3 mg/l zeatin + 100 mg/l prolin, for Inpara 3 the best medium was MS + 5 mg/l BA + 0.3 mg/l zeatin + 100 mg/l prolin, while for Pokkali and IR29, the best medium was MS + 3 mg/l BA + 0.1 mg/l zeatin. The best medium for shoot multiplication was MS + 0.3 mg/l TDZ and for root induction was MS + 3 mg/l IBA. Each stage of planlet formation requireds different media formulations.

Keywords: Callus organogenic, adventif shoot, *Oryza sativa* L., rooting.

ABSTRAK

Regenerasi tanaman merupakan tahapan penting yang perlu dikuasai sebelum diaplikasikan untuk perakitan varietas unggul secara kultur *in vitro*. Penelitian bertujuan mengoptimasi teknik regenerasi *in vitro* beberapa varietas padi *indica* melalui jalur organogenesis. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang disusun secara faktorial. Materi yang dicobakan, yaitu Ciherang, Inpari 13, Inpara 3, Pokkali, dan IR29. Perlakuan yang diberikan untuk induksi kalus organogenik adalah 2,4-D (0, 1, 3, 5, 7 mg/l) + kasein hidrolisat 3 g/l, untuk regenerasi kalus membentuk tunas adventif adalah BA (0, 1, 5 mg/l) + zeatin (0, 0,1, 0,3 mg/l) + prolin 100 mg/l, untuk multiplikasi tunas adalah MS + thidiazuron/TDZ (0, 0,1, 0,3 mg/l) dan untuk perakaran adalah IBA (0, 1, 2, 3 mg/l). Hasil penelitian menunjukkan media terbaik untuk induksi kalus untuk padi varietas Ciherang, Inpari 13, dan Pokkali adalah MS + 2,4-D 3 mg/l, sedangkan untuk varietas Inpari 3 dan IR 29 adalah MS + 2,4-D 5 mg/l. Media terbaik untuk regenerasi tunas untuk varietas Ciherang adalah BA 5 mg/l + zeatin 0,1 mg/l + prolin 100 mg/l, untuk Inpari 13 adalah MS + BA 3 mg/l + zeatin 0,3 mg/l + prolin 100 mg/l, untuk Inpara 3 adalah BA 5 mg/l + zeatin 0,3 mg/l + prolin 100 mg/l dan untuk Pokkali dan IR29 adalah MS + BA 3 mg/l + zeatin 0,1 mg/l. Media terbaik untuk multiplikasi tunas adalah MS + TDZ 0,3 mg/l dan untuk induksi perakaran adalah MS + IBA 2 mg/l. Setiap tahapan kegiatan pembentukan planlet membutuhkan formulasi media yang berbeda.

Kata kunci: Kalus organogenik, tunas adventif, *Oryza sativa* L., perakaran.

Hak Cipta © 2017, BB Biogen

PENDAHULUAN

Perakitan varietas unggul melalui rekayasa genetika dan kultur *in vitro* pada umumnya menggunakan populasi sel somatik yang dikenal dengan nama kalus, karena lebih efektif untuk mendapatkan individu baru dengan perubahan genetik yang lebih solid. Masalah yang sering dihadapi dalam perakitan tanaman secara bioteknologi adalah meregenerasikan kalus membentuk planlet. Apabila metode regenerasi belum dikuasai dengan baik, maka keberhasilan perakitan varietas unggul dengan bioteknologi akan sulit dicapai.

Pada penelitian ini, digunakan padi varietas Ciherang, Inpari 13, Inpara 3, IR29, dan Pokkali yang merupakan golongan *indica*. Kalus padi *indica* pada umumnya lebih sulit diregenerasikan dibanding dengan *japonica* sehingga untuk mendapatkan keberhasilan regenerasi tunas yang cukup tinggi diperlukan formulasi media yang kompleks (Saharan et al. 2004). Padi *indica* yang telah berhasil diregenerasikan adalah Inpari 6 dan Dodokan (Apriana et al. 2013).

Regenerasi tunas dari kalus merupakan proses yang kompleks, banyak faktor yang mempengaruhi, antara lain genotipe, umur eksplan, kondisi fisiologis pohon induk, dan formulasi media tumbuh (Hoque et al. 2013), termasuk rasio antara auksin dan sitokinin (Cheng et al. 2013). Kalus yang baru terbentuk mempunyai respons lebih baik dibanding dengan kalus yang telah disubkultur dengan frekuensi tinggi dan telah mengalami periode kultur *in vitro* yang lama. Faktor lain yang menentukan keberhasilan regenerasi kalus adalah faktor fisik seperti kondisi lingkungan tumbuh antara lain temperatur ruangan, intensitas cahaya, lama penyinaran, dan kelembaban udara pada ruang kultur (Bhojwani dan Dantu 2013).

Regenerasi organogesis kalus membentuk organ tunas maupun akar bergantung pada rasio auksin dan sitokinin (Cheng et al. 2013). Sitokinin endogen diproduksi di akar dan ditransportasikan ke organ tumbuhan, yaitu xilem melalui suatu *cytokinin transporter* yang berperan sebagai zat pengatur tumbuh (ZPT) pada pertumbuhan tunas (Ko et al. 2014). Beberapa jenis sitokinin yang umum digunakan dalam meregenerasikan kalus pada tanaman padi adalah benziladenine (BA), kinetin, dan zeatin. Setiap genotipe atau jaringan mempunyai respons yang berbeda terhadap ZPT yang diberikan ke dalam media karena memiliki kandungan hormon endogen yang berbeda pula (Islam et al. 2004). Banyak hasil penelitian menunjukkan bahwa ZPT sangat berperan dalam menentukan arah morfogenesis. Pada penelitian (Hoque et al. 2013) kalus beberapa padi *indica* dapat beregenerasi pada media MS yang mengandung *naphthalene acetic Acid* (NAA) yang dikombinasikan dengan BA atau kinetin.

Varietas padi yang digunakan pada penelitian ini adalah varietas Ciherang, Inpari 13, dan Inpara 3. Ciherang merupakan varietas populer yang umum digunakan oleh masyarakat pada sentra-sentra produksi padi, di Pulau Jawa khususnya. Varietas ini memiliki potensi hasil yang tinggi (8,5 t/ha) juga relatif tahan terhadap hama wereng cokelat biotipe 2 dan 3 dan penyakit hawar daun bakteri ras tertentu. Di samping itu varietas tersebut masih diminati masyarakat, meskipun varietas ini telah dilepas sejak tahun 2000. Sampai saat ini, varietas tersebut masih digunakan oleh petani walaupun varietas-varietas baru telah dihasilkan dengan keunggulannya masing-masing. Inpari 13 merupakan varietas unggul baru yang dilepas pada tahun 2009. Varietas tersebut memiliki keunggulan potensi hasil sebesar 8,0 t/ha dan mempunyai umur yang sangat genjah (umur panen sekitar 103 hari) (Jamil et al. 2015). Inpara 3 merupakan padi rawa yang mempunyai keunggulan toleran rendaman selama 6 hari dan toleran terhadap keracunan Fe dan Al. Pokkali merupakan varietas yang toleran pada kondisi salin sehingga umumnya digunakan sebagai kontrol toleran pada uji toleran salinitas, sedangkan untuk kontrol peka salinitas umumnya digunakan varietas IR29. Tujuan penelitian ini ialah mengoptimasi teknik regenerasi *in vitro* beberapa varietas padi *indica* melalui jalur organogenesis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor, Jawa Barat. Penelitian ini terdiri atas empat percobaan, yaitu (1) induksi kalus organogenik, (2) regenerasi kalus membentuk tunas adventif, (3) multiplikasi tunas, dan (4) induksi akar.

Induksi Kalus Organogenik

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah embrio zigotik Ciherang, Inpari 13, Inpara 3, Pokkali, dan IR20. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama adalah varietas padi (Ciherang, Inpari 13, Inpara 3, Pokkali, dan IR29). Faktor kedua adalah 2,4-D (0, 1, 3, 5, 7 mg/l). Percobaan ini dimulai dengan melakukan sterilisasi biji di dalam *laminar flow* menggunakan bahan sterilan alkohol 70%, NaOCl 1,575%, dan NaOCl 1,05%, yang

diikuti dengan isolasi embrio zigotik. Embrio zigotik kemudian ditanam pada media induksi kalus, yaitu media MS yang mengandung 2,4-D dan casein hydrolysate (CH) 3 g/l. Media MS ditambahkan sukrosa 3%, agar 0,8%, dan pH media diatur menjadi ±5,7 dengan penambahan KOH atau HCl 0,1 N. Setiap perlakuan terdiri atas 10 ulangan (botol). Dalam satu botol ditanam sebanyak 10 eksplan. Botol yang berisi eksplan diinkubasi di rak kultur dalam keadaan gelap, ditutup dengan kain berwarna hitam. Temperatur ruangan diatur pada 25±1°C. Peubah yang diamati adalah persentase eksplan membentuk kalus dan kalus organogenik. Kalus organogenik dicirikan dengan wana putih mengkilat dan remah.

Regenerasi Kalus Membentuk Tunas Adventif

Penelitian menggunakan RAL yang disusun secara faktorial dengan tiga faktor. Faktor pertama adalah varietas padi (Ciherang, Inpari 13, Inpara 3, Pokkali, dan IR29), faktor kedua adalah BA (0, 1, 3, 5 mg/l), dan faktor ketiga adalah zeatin (0, 0,1, 0,3 mg/l). Percobaan diulang 10 kali dan setiap ulangan terdiri atas 4 kalus. Percobaan ini mengunakan kalus organogenik yang berasal dari media induksi kalus yang terbaik yang diperoleh dari percobaan induksi kalus organogenik. Percobaan dilakukan dengan memindahkan kalus ke media untuk regenerasi tunas. Media untuk regenerasi tunas terdiri atas media dasar MS yang mengandung BA dan zeatin. Media perlakuan pada penelitian ini mengandung prolin 100 mg/l dan sukrosa 3%. Media dibuat padat dengan menggunakan agar 0,8%. Eksplan diinkubasi di dalam ruangan kultur pada kondisi terang dengan penyinaran selama selama 16 jam sehari (dengan intensitas cahaya 1.000–1.400 lux) dan suhu ruang kultur dijaga berkisar antara 25–27°C. Peubah yang diamati, yaitu persentase kalus nodular, jumlah spot hijau per kalus, dan jumlah tunas yang di hasilkan per kalus.

Multiplikasi Tunas

Rancangan percobaan yang digunakan adalah RAL yang disusun secara faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama adalah varietas padi (Ciherang, Inpari 13, Inpara 3, Pokkali, dan IR29) dan faktor kedua adalah TDZ, yaitu 0, 0,1, 0,3 mg/l. Tunas yang digunakan diperoleh dari tunas yang berasal dari media terbaik pada percobaan regenerasi kalus membentuk tunas. Tunas dikulturkan pada media MS mengandung BA 1 mg/l dan TDZ, agar 0,8%, dan sukrosa 3% ditanami satu tunas per botol. Kultur kemudian diinkubasi di ruang kultur dengan kondisi terang selama 16 jam sehari (dengan intensitas cahaya 1.000–1.400 lux). Suhu ruang kultur dijaga 25±1°C. Peubah yang diamati, yaitu jumlah tunas yang terbentuk per botol.

Induksi Akar

Percobaan induksi akar dilakukan pada tunas *in vitro* yang diperoleh dari media yang terbaik dari percobaan multiplikasi tunas. Penelitian ini menggunakan RALyang disusun secara faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama adalah varietas padi (Ciherang, Inpari 13, Inpara 3, Pokkali, dan IR29) dan faktor kedua adalah IBA (0, 1, 2, 3 mg/l). Percobaan dilakukan dengan 10 ulangan. Media yang digunakan adalah media dasar MS yang ditambah IBA, agar 0,8%, dan sukrosa 3%. Peubah yang diamati adalah jumlah akar per tunas dan panjang akar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus Organogenik

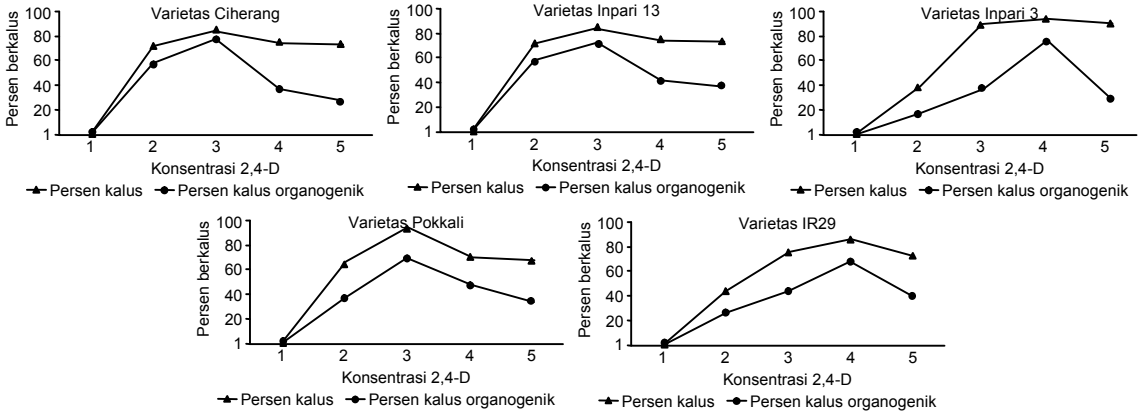
Hasil analisis ANOVA menunjukkan terjadi interaksi yang nyata antara varietas padi dan konsentrasi 2,4-D, terhadap jumlah kalus yang terbentuk. Pada minggu kedua setelah tanam, eksplan embrio zigotik mulai memberikan respons terjadinya pembengkakan dan mulai membentuk kalus. Eksplan yang dikulturkan pada media tanpa 2,4-D tidak mampu membentuk kalus (Tabel 1). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa 2,4-D merupakan auksin yang dapat menginisiasi terbentuknya kalus dari embrio zigotik pada berbagai varietas padi (Din et al. 2015; Poraha et al. 2016; Sah et al. 2014; Vennapusa et al. 2015).

Secara umum, perlakuan 2,4-D 3 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk induksi kalus pada padi varietas Ciherang, Inpari 13, dan Pokkali, sedangkan 2,4-D 5 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk induksi kalus Inpara 3 dan IR29 dengan kisaran pembentukan kalus sebesar 80–90% dan pembentukan kalus organogenik sebesar 60–80% (Gambar 1). Peningkatan 2,4-D hingga 7 mg/l menurunkan kemampuan eksplan membentuk kalus dan persentase kalus yang bersifat organogenik juga menurun, yaitu sebesar 26 kalus pada varietas Ciherang. Hal yang sama juga terjadi pada padi *indica* varietas Hati Bormasi, yaitu media yang mengadung 2,4-D 3 mg/l merupakan media terbaik untuk menginduksi kalus organogenik (Hoque et al. 2013).

Kalus varietas Ciherang, Inpari 13, dan Pokkali yang dihasilkan pada media yang mengandung 2,4-D 3 mg/l dan kalus varietas Inpara 3 dan IR29 yang dihasilkan dari media yang mengandung 2,4-D 5 mg/l berwarna putih kekuningan, nodular, dan remah atau mudah dipisah-pisahkan (Gambar 2). Menurut Wani

Tabel 1. Pengaruh varietas, BA, dan zeatin terhadap pesentase terbentuknya kalus nodular dari eksplan embrio zigotik lima varietas padi *indica*.

BA (mg/l)	Zeatin (mg/l)	Varietas				
		Ciherang	Inpari 13	Inpara 3	Pokkali	IR29
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0	0,1	56,79	50,77	39,23	39,23	26,56
0	0,3	63,44	56,79	39,23	50,77	26,56
1	0	33,21	39,23	39,23	0,00	0,00
1	0,1	63,44	90,00	63,44	56,79	45,00
1	0,3	63,44	90,00	71,56	63,44	50,77
3	0	39,23	45,00	50,77	0,00	39,23
3	0,1	63,44	90,00	63,44	71,56	90,00
3	0,3	71,56	90,00	63,44	71,56	63,44
5	0	39,23	45,00	45,00	0,00	45,00
5	0,1	90,00	71,56	90,00	63,44	56,79
5	0,3	90,00	63,44	90,00	63,44	63,44



Gambar 1. Pengaruh konsentrai 2,4-D terhadap pembentukan kalus pada beberapa varietas padi *indica*, umur 8 minggu setelah kultur.

(2011), kalus yang memiliki ciri-ciri berwana putih kekuningan dan remah memiliki kemampuan yang lebih tinggi untuk diregenerasikan membentuk tunas.

Regenerasi Kalus Membentuk Tunas

Persentase kalus nodular

Hasil analisis ANOVA menunjukkan interaksi yang nyata antara konsentrasi BA, zeatin, dan varietas terhadap persentase kalus nodular yang terbentuk. Pada umumnya kalus yang dikulturkan pada media tanpa BA dan zeatin tidak mampu membentuk kalus nodular (Tabel 1). Tiap varietas memiliki respons yang berbeda terhadap jenis dan konsentrasi sitokinin yang ditambahkan pada media. Pada varietas Ciherang dan Inpara 3 media yang mampu membentuk kalus nodular sebesar 90% adalah MS yang diperkaya BA 5 mg/l dikombinasikan dengan zeatin 0,1 atau 0,3 mg/l (Tabel 1).

Pada varietas Inpari 13 dan Pokkali media terbaik untuk membentuk kalus nodular adalah MS yang diperkaya dengan BA 3 mg/l dan zeatin 0,1 atau 0,3 mg/l dengan nilai tertinggi masing-masing adalah 90% untuk Inpari 13. Respons setiap varietas terhadap media umumnya berbeda-beda. Hasil serupa juga telah dilaporkan oleh (Roy et al. 2012) bahwa kalus varietas berbeda memberikan respons pertumbuhan yang berbeda terhadap suatu formulasi media.

Jumlah spot hijau

Hasil analisis ANOVA menunjukkan interaksi yang nyata antara BA, zeatin, dan varietas terhadap jumlah spot hijau yang terbentuk. Pada minggu ke-4 setelah kultur pada media regenerasi, mulai terjadi perubahan pada kalus, yaitu mulai terlihat adanya spot-spot hijau walaupun persentasenya masih sangat rendah (Gambar 2F, G, H, I, J). Pada pengamatan minggu ke-8 terbentuk formasi tunas dari kalus nodular yang mengandung banyak spot hijau yang merupakan bakal tunas.

Kalus varietas Ciherang dan Inpari 13 yang dikulturkan pada media MS yang diperkaya dengan BA 3 mg/l dan zeatin 0,3 mg/l paling banyak membentuk spot hijau, yaitu 4,4 dan 5,5. Perlakuan BA 5 mg/l yang dikombinasikan dengan zeatin 0,3 mg/l merupakan perlakuan terbaik pada varietas Inpara 3 karena

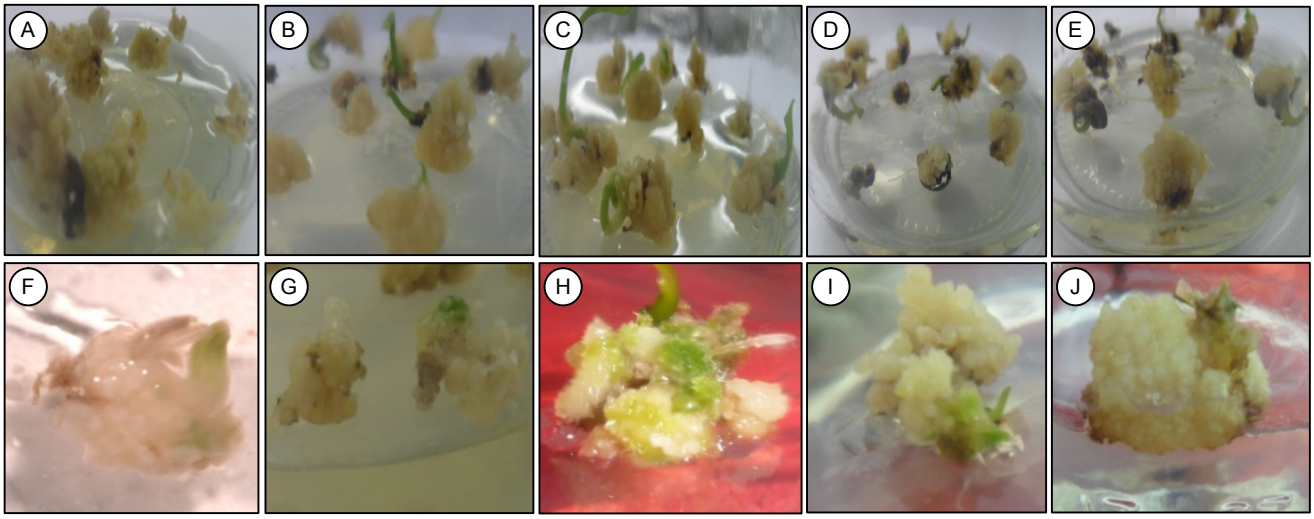
mampu membentuk spot hijau terbanyak, yaitu 4,3. Pada varietas Pokkali dan IR29, kalus yang ditumbuhkan pada media MS yang diperkaya dengan BA 3 mg/l dan zeatin 0,1 mg/l menghasilkan kalus yang membentuk spot hijau yang paling tinggi di antara perlakuan lainnya, yaitu 3,8 dan 4,5 (Tabel 2).

Jumlah tunas

Hasil analisis ANOVA menunjukkan interaksi antara varietas, BA, dan zeatin memberikan pengaruh yang nyata terhadap terbentuknya tunas. Kombinasi BA dan zeatin mampu meningkatkan kemampuan kalus padi untuk beregenerasi membentuk tunas. Pada kalus varietas Cisadane dan Bengawan Solo yang disubkulturkan pada media yang mengandung BA dan zeatin, kedua ZPT dilaporkan dapat meningkatkan jumlah tunas yang terbentuk (Lestari dan Mariska 2003). Begitu pula pada kalus tomat, pemberian zeatin dapat meningkatkan pembentukan kalus menjadi tunas melalui jalur organogenesis (Pawar et al. 2012).

Pada varietas Ciherang, perlakuan BA 5 mg/l dan zeatin 0,1 mg/l memberikan respons terbaik dengan rerata jumlah tunas sebesar 3,3 (Tabel 3). Pada perlakuan BA 5 mg/l dan zeatin 0,3 mg/l terjadi penurunan jumlah tunas menjadi 1,4 tunas/eksplan. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi zeatin dapat menurunkan jumlah tunas yang terbentuk. Kencendrungan hasil yang sama telah dilaporkan pada kalus tomat. Pemberian zeatin 1 mg/l mampu menginduksi tunas 100%, sedangkan pada peningkatan konsentrasi zeatin menjadi 2 mg/l, tunas yang terbentuk menurun menjadi 80% (Kalyani dan Rao 2014).

Pada varietas Inpari 13 perlakuan BA 3 mg/l dan zeatin 0,3 mg/l menghasilkan tunas yang beregenerasi



Gambar 2. Kalus organogenik dan struktur tunas lima varietas padi *indica*. Kalus organogenik (bagian atas) dan struktur tunas (bagian bawah): Ciherang (A dan F), Inpari 13 (B dan G), Inpara 3 (C dan H), Pokkali (D dan I), IR29 (E dan J).

Tabel 2. Pengaruh varietas, BA, dan zeatin terhadap jumlah spot hijau pada kalus lima varietas padi *indica*.

BA (mg/l)	Zeatin (mg/l)	Varietas				
		Ciherang	Inpari 13	Inpara 3	Pokkali	IR29
0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0
1	0,1	2,2	2,6	0,9	1,1	1,1
1	0,3	3,2	2,5	2,5	2,5	3,0
3	0	1,3	1,6	0,0	0,0	0,0
3	0,1	3,8	3,1	3,1	3,8	4,5
3	0,3	4,4	5,5	2,9	2,4	2,8
5	0	1,7	1,3	1,0	0,0	1,1
5	0,1	4,6	4,6	3,4	3,4	1,7
5	0,3	4,0	3,5	4,3	2,4	1,3

sebanyak 5,1 tunas/eksplan. Pada kalus varietas Inpara 3 yang dikulturkan pada media MS yang diperkaya BA 5 mg/l yang dikombinasikan dengan zeatin 0,1 mg/l merupakan yang terbaik karena mampu membentuk tunas paling banyak, yaitu 3,0 tunas/eksplan. Pada varietas Pokkali, media terbaik untuk induksi tunas adalah BA 3 mg/l dan zeatin 0,1 mg/l dengan jumlah tunas sebanyak 2,1 tunas/eksplan. Pada varietas IR29, kombinasi ZPT yang mampu menginduksi tunas paling tinggi, yaitu BA 3 mg/l dan zeatin 0,1 mg/l dengan jumlah tunas 2,9 tunas/eksplan.

Multiplikasi Tunas

Hasil analisis ANOVA menunjukkan interaksi antara varietas dan TDZ memberikan pengaruh tidak nyata terhadap jumlah tunas yang terbentuk akan tetapi faktor tunggal TDZ memberikan pengaruh yang nyata pada taraf 5%.

Tabel 4 menunjukkan bahwa pada umumnya peningkatan konsentrasi TDZ menyebabkan peningkatan multiplikasi tunas. TDZ merupakan zat pengatur tumbuh yang mempunyai pengaruh fisiologisnya menyerupai sitokinin dan banyak digunakan untuk menginduksi pembentukan tunas adventif serta meningkatkan proliferasi tunas aksilar. Zat pengatur tumbuh tersebut dapat meningkatkan kemampuan multiplikasi tunas (Sivanesan dan Park 2014) dan kemampuan multiplikasinya akan lebih signifikan bila aplikasi senyawa ini dikombinasikan dengan BA atau kinetin (Ganeshan et al. 2003). TDZ mempunyai efektivitas yang lebih kuat daripada BA. Untuk tanaman berkayu kombinasi BA dan TDZ banyak digunakan dan memberikan hasil yang baik dalam memproduksi tunas in vitro. Grabkowska et al. (2014) melaporkan bahwa TDZ dapat menginduksi pembentukan tunas adventif, proliferasi tunas adventif pada tanaman *Harpagophytum procumbens*.

Induksi Perakaran

Hasil analisis ANOVA menunjukkan interaksi antara perlakuan varietas dan konsentrasi IBA memberikan pengaruh tidak nyata baik terhadap panjang maupun jumlah akar. Namun faktor tunggal konsentrasi IBA memberikan pengaruh yang nyata pada taraf uji 5%. Pada umumnya tunas yang berasal dari kalus organogenik telah membentuk meristomoid bakal akar, akan tetapi akar yang belum memanjang. Oleh karena itu, perlu dilakukan subkultur ke media induksi perakaran. Tunas adventif semua varietas padi yang belum berakar disubkultur pada media yang mengandung IBA. Auksin memiliki peranan yang penting dalam inisiasi akar pada kultur *in vitro*, seperti yang dilaporkan oleh Ljung (2013) bahwa auksin yang ditranslokasikan dari tunas melalui floem akan menstimulasi terbentuknya primordia akar lateral yang akan berkembang membentuk akar sekunder.

Tabel 3. Pengaruh varietas, BA, dan zeatin terhadap jumlah tunas pada kalus lima varietas *indica*.

BA (mg/l)	Zeatin (mg/l)	Varietas				
		Ciherang	Inpari 13	Inpara 3	Pokkali	IR29
0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0,1	0,1	0,5	0,0	0,0	0,0
1	0,3	2,3	1,9	1,6	1,0	1,2
3	0	0,4	0,6	0,0	0,0	0,0
3	0,1	2,9	2,5	2,5	2,1	2,9
3	0,3	3,0	5,1	1,3	1,1	1,3
5	0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,1
5	0,1	3,3	3,9	1,6	1,3	0,6
5	0,3	1,4	1,2	3,0	1,1	0,0

Tabel 4. Jumlah tunas lima varietas padi *indica*, umur 2 minggu setelah kultur, yang terbentuk pada media yang mengandung TDZ.

TDZ (mg/l)	Varietas					Rerata
	Ciherang	Inpari 13	Inpara 3	Pokkali	IR29	
0	3,5	3,7	2,8	3,5	3,4	3,38 a
0,1	4,4	4,2	3,4	4,5	3,8	4,06 b
0,3	4,8	4,4	3,9	4,9	4,4	4,48 c

Angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji jarak berganda Duncan.

Tabel 5. Jumlah akar yang terbentuk dari tunas lima varietas padi *indica*, umur 2 minggu setelah subkultur.

IBA (mg/l)	Ciherang	Inpari 13	Inpara 3	Pokkali	IR29	Rata-rata
0	5,3	5,6	5,3	5,4	5,1	5,34 a
1	5,5	5,7	5,9	6,1	6,1	5,86 a
2	6,6	6,6	6,6	6,5	6,9	6,64 b
3	7,2	7,0	7,1	6,6	7,2	7,02 b

Angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji jarak berganda Duncan.

Tabel 6. Panjang akar (cm) yang terbentuk dari tunas lima varietas padi *indica* yang ditanam pada media yang mengandung IBA.

IBA (mg/l)	Ciherang	Inpari 13	Inpara 3	Pokkali	IR29	Rata-rata
0	2,59	2,59	2,56	2,56	2,56	2,57 a
1	2,67	2,64	2,65	2,68	2,68	2,66 ab
2	2,82	2,75	2,74	2,85	2,85	2,80 b
3	2,91	2,35	2,07	2,95	2,95	2,65 ab

Angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji jarak berganda Duncan.

Pada varietas Inpara 3 dan dan IR29 (Tabel 5), peningkatan konsentrasi IBA hingga 3 mg/l meningkatkan pembentukan jumlah akar. Inisiasi pembentukan akar dapat dirangsang dengan pemberian auksin seperti IBA, IAA, dan NAA. Di antara ZPT tersebut, IBA merupakan jenis auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi akar dibanding dengan jenis auksin lainnya karena translokasinya lebih lambat sehingga dapat memacu perakaran pada bagian pangkal tunas. IBA lebih stabil dengan tingkat toksisitas yang lebih rendah bila dibanding dengan NAA (George et al. 2008).

Pada Tabel 6 terlihat bahwa perlakuan IBA 2 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk kelima varietas, walaupun pengaruh ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan IBA 1 mg/l dan 3 mg/l. Perlakuan IBA 3 mg/l dapat menurunkan kemampuan pemanjangan akar pada tunas *in vitro* padi varietas Inpara 3 dan IR29. Tanpa adanya auksin IBA pada media, tunas dapat membentuk akar. Hasil ini menunjukkan bahwa semua varietas yang diuji telah mengandung auksin alami IAA memadai yang diperlukan untuk pembentukan dan pemanjangan akar.

KESIMPULAN

Kalus varietas padi yang berbeda umumnya memberikan respons pertumbuhan yang berbeda terhadap suatu formulasi media. Formulasi media yang optimum untuk induksi kalus organogenik untuk padi varietas Ciherang, Inpari 13 dan Pokkali adalah MS + 2,4-D 3 mg/l + kasein hidrolisat 3 g/l, sedangkan untuk varietas Inpara 3 dan IR29 adalah MS + 2,4-D 5 mg/l + kasein hidrolisat 3 g/l. Formulasi media yang optimum untuk regenerasi kalus membentuk tunas untuk padi varietas Ciherang adalah BA 5 mg/l + zeatin 0,1 mg/l + prolin 100 mg/l, untuk Inpari 13 adalah media MS + BA 3 mg/l + zeatin 0,3 mg/l + prolin 100 mg/l, untuk varietas Inpara 3 adalah BA 5 mg/l + zeatin 0,3 mg/l + prolin 100 mg/l serta untuk Pokkali dan IR29 adalah MS + BA 3 mg/l + zeatin 0,1 g/l. Media yang optimum untuk multiplikasi tunas pada semua varietas adalah MS + TDZ 0,3 mg/l. Media yang optimum untuk perakaran pada semua varietas adalah MS + IBA 2 mg/l. Setiap tahapan kegiatan pembentukan planlet membutuhkan formulasi media yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

Apriana, A., Hadiarto, T. & Dadang, A. (2013) Optimasi sistem regenerasi dan transformasi padi varietas elit Indonesia. *Jurnal AgroBiogen*, 9 (1), 1–10.

Bhojwani, S.S. & Datu, P.K. (2013) *Plant tissue culture: An introductory text*. New Delhi, India, Springer. 309 p.

Din, A.R.J.M., Ahmad, F.I., Wagiran, A., Samad, A.A. Rahmad, Z. & Sarmidi, M.R. (2015) Improvement of efficient *in vitro* regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. Panderas). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, S69–S77.

Cheng, Z.J., Wang, L., Sun, W., Zhang, Y., Zhou, C., Su, Y.H., Li, W., Sun, T.T., Zhao, X.Y., Li, X.G. et al. (2013) Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin response factor 3. *Plant Physiology*, 161 (1), 240–251.

Ganeshan, S., Monica, B., Brian, L.H., Graham, J.S. & Ravindra, N.C. (2003) Production of multiple shoots

from thidiazuron-treated mature embryos and leaf-base/apical meristems of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 73, 57–64.

George, E.F, Hall, M.A. & de Kerk, G.J. (2008) *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition Vol 1*. The Netherland, The Back Ground Springer. 504 p.

Grabkowska, R., Sitarek, P. & Wysokinska, H. (2014) Influence of thidiazuron (TDZ) pretreatment of shoot tips on shoot multiplication and *ex vitro* acclimatization of *Harpagophytum procumbens*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 1661–1672.

Hoque, K.M.A., Azdi, Z.A. & Prodhan, S.H. (2013) Development of callus initiation and regeneration system of different indigenous indica rice varieties. *Journal of Biology*, 1 (2), 46–51.

Islam, M.M., Wahed, S.A. & Khan, S.A.K.U. (2004) Studies on callus induction and regeneration from dehusked rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Plant Tissue Culture*, 14 (2), 155–160.

Kalyani, B.G. & Rao, S. (2014) Zeatin induced direct plant regeneration from cotyledon explants of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (7), 1034–1040.

Ko, D., Kanga, J., Kibab, T., Parka, J., Kojimab, M., Doc, J., Kima, K.Y., Kwonc, M., Endlerd, A., Songa, W.Y. et al. (2014) Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. In: Eisenberg, R., Fersht, A., Piperno, R.D., Shubin, H.N., Snyder, H.S., Turner, B.L. et al. (eds.) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (19), 7150–7155.

Lestari, E.G & Mariska, I. (2003) Pengaruh berbagai formulasi media terhadap regenerasi kalus padi indica. Dalam: Machmud, M., Harnoto, Silitonga, T.S., Mulya, K., Dewi, I.S., Yunus, M., dan Orbani, I.N. (editor) *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. Bogor 23–24 September 2003. Bogor, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian. hlm. 257–263.

Ljung, K. (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140 (5), 943–950.

Pawar, B.D., Jadhav, A.S. Kale, A.A., Chimote, V.P. & Pawar, S.V. (2012) Zeatin induced direct *in vitro* shoot regeneration in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *The Bioscan*, 7 (2), 247–250.

Poraha, R., Poeaim, A., Pongjaroenkit, S. & Pongthongkam, P. (2016) Callus induction and plant regeneration on optimization of the culture conditions in Jow Haw rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural Technology*, 12 (2), 241–248.

Roy, A., Aich, S.S. & Mukherjee, S. (2012) Differential reponses to indirect organogenesis in rice cultivars. I*nternational Journal of Scientific and Research Publications*, 2 (9), 1–5.

Sah, S.K., Kaur, A. & Sandhu, J.S. (2014) High frequency embryogenic callus induction and whole plant regeneration in japonica rice Cv. Kitaake. *Journal Rice Research*, 2 (2), 1–5.

Saharan, V., Yadav, R.V., Yadav, N.R. & Chapagain, B.P. (2004) High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology*, 3 (5), 256–259.

Sivanesan, I. & Park, S.W. (2014) Effect of thidiazuron on axillary shoot multiplication and subsequent rooting of *Sphagneticola trilobata* (L) pruski. *Propagation of Ornamental Plants*, 14 (4), 147–151.

Vennapusa, A., Vemanna, R.S., Reddy, R., Babitha, K.C., Kiranmai, K., Nareshkumar, A. & Sudhakar, C. (2015) An efficient callus induction and regeneration protocol for a drought tolerant rice indica genotype AC39020. *Journal of Plant Sciences*, 3 (5), 248–54.

Wani, S,H., da Silva, J.A.T., Sanghera, G.S., Haribhushan, A., Singh, N.B. & Satbir, S.G. (2011) Regeneration protocol for whole plants from embryogenic callus of commercial rice (*Oryza sativa* L.) variety PR 116. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 5 (1), 63–66.