

INISIASI KALUS EMBRIOGENIK PADA KULTUR JANTUNG PISANG 'CURUP' DENGAN PEMBERIAN SUKROSA, BAP DAN 2,4-D

Initiation of embryogenic callus formation of Banana 'Curup' male bud culture supplemented with sucrose, BAP, and 2,4-D

Marlin, Yulian, dan Hermansyah

E-mail: marlin_iin@yahoo.com

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Bengkulu

Jl. WR. Supratman Kandang Limun Bengkulu, Telp 0736-28765

ABSTRAK

Usaha konservasi dan pengembangan pisang 'Curup' sangat penting dilakukan karena populasinya yang semakin berkurang akibat adanya serangan penyakit busuk batang. Keberhasilan menginisiasi pembentukan kalus embriogenik merupakan langkah awal untuk menghasilkan planlet dengan multiplikasi yang tinggi. Penelitian bertujuan untuk menstimulasi pembentukan kalus embriogenik dari pisang 'Curup' melalui kultur jantung pisang. Untuk mendapatkan kultur jantung pisang 'Curup' aseptik dilakukan dengan memodifikasi proses sterilisasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan pemberian konsentrasi sukrosa ($60-90 \text{ g.L}^{-1}$) mengakibatkan semakin lama eksplan membentuk kalus. Pembentukan kalus tercepat (3 mst) diperoleh pada media dengan sukrosa 30 g.L^{-1} dengan media tanpa sitokinin (BAP) dan auksin (2,4-D) maupun pada semua komposisi pemberian sitokinin (BAP) dan auksin (2,4-D). Pertumbuhan kalus terbesar (diameter = 2.5 cm) terbentuk dari eksplan yang dikulturkan pada media dengan 30 g.L^{-1} sukrosa dan 2 ppm BAP : 2-4 ppm 2,4-D. Kalus yang terbentuk berwarna kuning kehijauan dengan struktur yang remah.

Kata Kunci : jantung pisang, kalus embriogenik, 2,4-D, BAP, sukrosa

ABSTRACT

The effort to produce diseases-free seedlings of banana 'Curup' through an *in vitro* work is mainly purpose to conserve and to develop its cultivation. Inducing embryogenic callus formation is an important trigger for plantlet multiplication. The experiment was purpose to stimulated embryogenic callus formation of banana 'Curup' derived from male bud *in vitro* propagation. The experiment was conducted to attain aseptically male bud culture by modifying sterilization technique. The results showed that day of callus formation was longer when the explant was cultured in medium with higher concentration of sucrose ($60-90 \text{ g.L}^{-1}$). Callus formation grew fastest (3 days of culturing) in the medium with or without auxin and cytokinin, and supplemented with 30 g L^{-1} sucrose. Callus diameter formed bigger (2.5 cm) in medium with 2 ppm of BAP : 2-4 ppm of 2,4-D with 30 g.L^{-1} sucrose. Callus clump was green yellowish in color with friable stucture.

Keywords : male bud, embryogenic callus, 2,4-D, BAP, sucrose

PENDAHULUAN

Pisang (*Musa sp.*) Curup merupakan jenis pisang lokal yang banyak

dikembangkan di Propinsi Bengkulu. Jenis pisang ini memiliki bentuk yang mirip dengan pisang ambon umumnya,

namun pisang ini memiliki rasa yang manis dan kandungan air yang lebih rendah. Saat ini pengembangan pisang Curup sangat sulit dilakukan, karena keterbatasan penyediaan bibit sehat. Umumnya pisang Curup terinfeksi oleh cendawan *Fusarium oxysporum* yang mengakibatkan tanaman mati sebelum berbuah.

Tanaman pisang diperbanyak dengan cara vegetatif dengan menggunakan anakan (*sucker*), atau bonggol (*corm*). Setiap indukan pisang dapat menghasilkan 5-10 anakan sehat dalam tiap tahun (Levoire, 2000). Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi kendala dalam penyediaan bibit pisang sehat dapat dilakukan dengan teknik kultur jaringan (*in vitro*). Hasil penelitian Marlin et al. (2004) menunjukkan peningkatan produksi benih jahe bebas *Pseudomonas solanacearum*. Pada penelitian tersebut diketahui 98% hasil uji mikroskopis terhadap cairan rimpang jahe hasil kultur bebas dari *P. solanacearum*. Selain itu, penyediaan bibit dengan teknik kultur jaringan dapat menghasilkan tanaman yang seragam, baik dari bentuk maupun umur tanaman, juga dapat dihasilkan bibit yang bebas patogen (George dan Sherrington, 1984).

Berbagai bagian dari tanaman dapat digunakan sebagai bahan tanam (eksplan). Pemilihan jenis eksplan sangat menentukan pertumbuhan planlet menjadi haploid atau diploid (Akin-Idowu et al., 2009). Umumnya jaringan meristematis merupakan bagian yang penting dijadikan sebagai bahan tanam. Pada perbanyakan mikro tanaman pisang, bahan tanam dapat berasal dari meristem/mata tunas (Al-Amin, et al., 2009; Marlin, 2010; Bhosale, et al., 2011).

Selain itu, bagian yang potensial dikembangkan sebagai bahan tanam adalah jantung pisang (*male bud*). Jantung pisang merupakan bagian generatif yang di dalamnya terdapat bunga pisang yang tidak berkembang menjadi buah. Dengan struktur yang terlindungi, dapat mengurangi tingkat kontaminasi.

Melalui kultur *in vitro*, jantung pisang dapat diinisiasi menjadi kalus. Kalus adalah sekelompok massa sel yang berkembang dengan sangat cepat, tetapi belum terorganisir atau belum terdiferensiasi (George dan Sherrington, 1984). Pembentukan kalus sangat menguntungkan karena dapat dikultur secara terus menerus. Kalus dapat diinisiasi dari semua bagian tumbuhan, walaupun kecepatan pembelahan sel dari masing-masing bagian tumbuhan tersebut berbeda.

Penelitian ini bertujuan untuk menstimulasi pembentukan kalus embriogenik dari kultur jantung pisang 'Curup' dengan memodifikasi konsentrasi sukrosa, BAP dan 2,4-D secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan dengan menggunakan bahan tanam dari jantung pisang Curup. Eksplan berasal dari jantung pisang segar dan masih terbungkus dalam pelepahnya. Jantung pisang segera dicuci dengan menggunakan detergen dan dibilas dengan menggunakan air yang mengalir. Selanjutnya, di dalam *Laminar airflow cabinet*, pelepah dibuang hingga 5 lembar, kemudian disemprotkan dengan alkohol 96% dan dibakar pada *bunsen burner*. Segera setelah api padam, selanjutnya pelepah dibuka kembali, eksplan diambil secara hati-hati dengan melepaskan pelepah-

Inisiasi kalus embriogenik pada kultur jantung pisang dengan sukrosa, BAP dan 2,4-D

nya satu demi satu. Bakal buah pisang bagian basal dipotong setinggi 0.8 cm dan ditanamkan pada botol kultur secara aseptik.

Media yang digunakan adalah media dasar Murashige dan Skoog (1962) yang terdiri dari komponen hara makro, hara mikro, *myoinositol* dan asam amino. Masing-masing komponen media di larutkan dan diencerkan sesuai dengan kepekatan hara yang dibutuhkan. Media ditambahkan sukrosa dan auksin 2,4-D sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Selanjutnya media ditetapkan pada pH 5.7 sebelum proses sterilisasi dengan autoclave. Media dipadatkan dengan penambahan agar powder 7 g.L⁻¹. Media dipanaskan pada hotplate and magnetic stirrer, samapi mendidih. Selanjutnya media dituangkan pada botol kultur, masing-masing 20 ml setiap botol dan ditutup langsung dengan menggunakan plastik. Sterilisasi media dilakukan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 20 menit.

Perlakuan yang diberikan merupakan kombinasi antara dua faktor perlakuan yang disusun dengan rancangan acak lengkap (RAL). Faktor

pertama adalah pemberian sukrosa yang terdiri dari 3 taraf, yaitu 3 g.L⁻¹ sukrosa (S₁), 6 g.L⁻¹ sukrosa (S₂), dan 9 g.L⁻¹ sukrosa (S₃). Faktor kedua adalah komposisi pemberian sitokinin (BAP) dan auksin (2,4-D) yang terdiri dari 4 taraf perlakuan, yaitu tanpa pemberian sitokinin dan auksin (M₀), 2 ppm BAP : 2 ppm 2,4-D (M₁), 4 ppm BAP : 2 ppm 2,4-D (M₂) dan 2 ppm BAP : 4 ppm 2,4-D (M₃). Setiap perlakuan dilakukan dengan 3 ulangan dengan 9 tanaman dalam setiap ulangan. Tanaman selanjutnya dipelihara dalam ruang kultur dengan suhu 20°C dan 16 jam penyinaran.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan menunjukkan persentase hidup jaringan eksplan yang tinggi. Beberapa teknik sterilisasi dilakukan untuk mendapatkan inokulasi yang steril untuk dikulturkan kembali sesuai dengan perlakuan. Penggunaan fungisida dan bakterisida yang sistemik ditujukan untuk menghilangkan kontaminasi dalam jaringan eksplan.

Tabel 1. Formulasi sterilisasi eksplan jantung pisang Curup (2 minggu kultur)

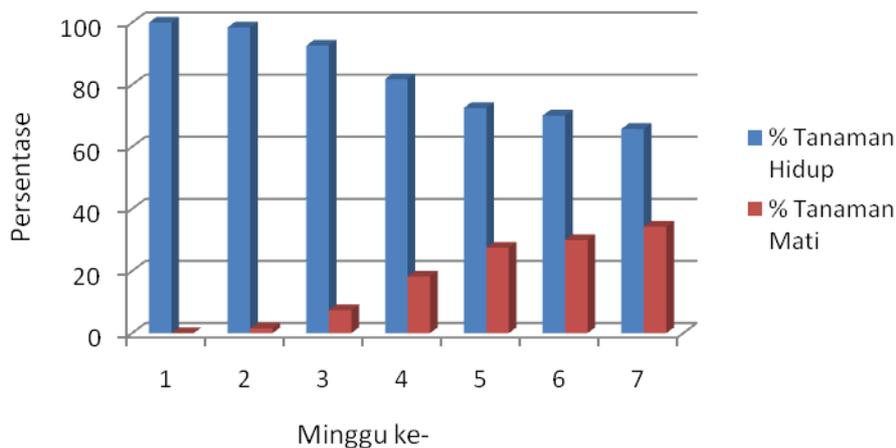
Jenis Sterilan	Konsentrasi	Persentase Hidup	Persentase Kontaminasi
Fungisida	2 g.L ⁻¹	87.5	12.5
Bakterisida	2 g.L ⁻¹		
<i>Sodium hipochlorit</i>	200 ml.L ⁻¹	98.0	2.0
Fungisida	2 g.L ⁻¹		
Bakterisida	2 g.L ⁻¹		
<i>Sodium hipochlorit</i>	200 ml.L ⁻¹	100	0
Alkohol	70 %		
<i>Sodium hipochlorit</i>	200 ml.L ⁻¹	95.0	5.0
Alkohol	70 %		
Antiseptic	5 ml.L ⁻¹		

Selain itu penggunaan antibiotik *Streptomycin* juga dilakukan dalam pelaksanaan sterilisasi internal tersebut. Hasil pengamatan terhadap persentase hidup eksplan disajikan pada Tabel 1 berikut. Bakal buah merupakan bagian yang sangat terlindungi di dalam jantung pisang. Hal ini memungkinkan kontak dengan udara luar sangat kecil, sehingga dapat mengeliminir adanya kontaminasi. Hal ini sangat berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya yang menggunakan bahan tanam yang berasal dari bagian meristem mata tunas pisang Curup. Persen hidup eksplan yang terjadi selama periode inisiasi bervariasi antara 1,8 sampai dengan 82,7 persen, selama 23 kali proses penanaman (Marlin et al., 2007).

Namun demikian, walaupun persentase hidup eksplan sangat tinggi (100%) ternyata tidak diikuti dengan pertumbuhan eksplan yang maksimal. Pertumbuhan eksplan selama periode kultur memerlukan waktu yang relative lebih lama dalam membentuk kalus. Pada beberapa bagian eksplan menunjukkan gejala pencoklatan (*browning*). Gejala pencoklatan pada kultur

meristem pisang terjadi pada tahap awal kultur (Al-Amin et al., 2009). Pencoklatan ini terjadi karena adanya sintesis senyawa fenolik. Vickery and Vickery (1980) menyatakan bahwa sintesis senyawa fenolik dipacu oleh cekaman atau gangguan pada sel tanaman. Inisiasi pembentukan kalus tanaman dapat dilakukan dari semua bagian tanaman. Tetapi setiap bagian tersebut memiliki kecepatan pertumbuhan dan respon yang berbeda. Selain itu, penggunaan ZPT dalam konsentrasi yang tepat juga sangat menentukan proses pembentukan dan perkembangan kalus *in vitro*.

George dan Sherrington (1984) menjelaskan bahwa untuk pembentukan kalus diperlukan auksin dan sitokinin dalam jumlah yang relatif tinggi. Pemberian auksin dalam bentuk 2,4-D dan NAA sangat diperlukan untuk membentuk kalus pada tanaman cabe (Aniel Kumar et al., 2010). Persentase pertumbuhan eksplan selama periode kultur disajikan dalam Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Persentase pertumbuhan eksplan jantung pisang Curup.

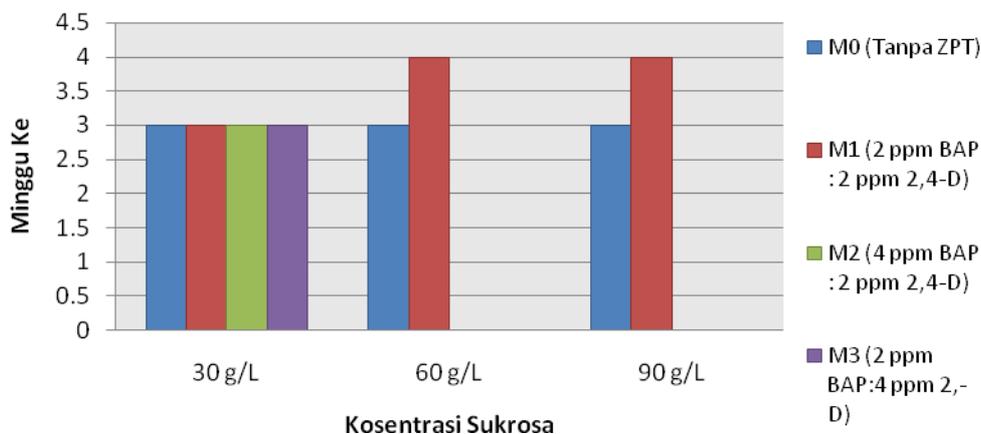
Inisiasi kalus embriogenik pada kultur jantung pisang dengan sukrosa, BAP dan 2,4-D

ZPT yang sering digunakan untuk menstimulasi pembentukan kalus dari golongan auksin adalah 2,4-D. Umumnya auksin meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel, dan pembentukan akar adventif, dalam medium kultur auksin dibutuhkan untuk meningkatkan embryogenesis somatic pada kultur suspense sel. Konsentrasi auksin yang tinggi akan merangsang pembentukan kalus dan menekan morfogenesis (George dan Sherrington, 1984).

Kalus merupakan sumber bahan tanam yang sangat penting dalam meregenerasi tanaman yang baru. Penggunaan kalus akan sangat menguntungkan karena pembentukan kalus dapat diinisiasi dari jaringan manapun dari tanaman. Pembengkakan eksplan yang terjadi adalah sebagai respon dari tanaman yang mengakibatkan sebagian besar karbohidrat dan protein yang ada akan terakumulasi pada jaringan yang luka tersebut. Adanya pelukaan pada

suatu jaringan tanaman dapat menginduksi perubahan proses metabolisme terutama terhadap adanya patogen yang berhubungan dengan sintesa protein (Thanh dan Thrinh, 1990).

Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan eksplan pada beberapa media perlakuan menunjukkan saat terbentuknya kalus yang berbeda-beda. Pertumbuhan kalus tercepat (3 mst) terjadi pada media dengan pemberian sukrosa 30 g.L⁻¹ dengan media tanpa sitokinin (BAP) dan auksin (2,4-D) maupun pada semua komposisi pemberian sitokinin (BAP) dan auksin (2,4-D). Disamping itu, pertumbuhan kalus tercepat juga terjadi pada media dengan pemberian 60 g.L⁻¹ dan 90 g.L⁻¹ sukrosa dengan media tanpa pemberian sitokinin (BAP) dan auksin (2,4-D). Sedangkan pada media dengan penambahan 2 ppm BAP dan 2 ppm 2,4-D pembentukan kalus terjadi setelah 4 minggu kultur (Gambar 2).



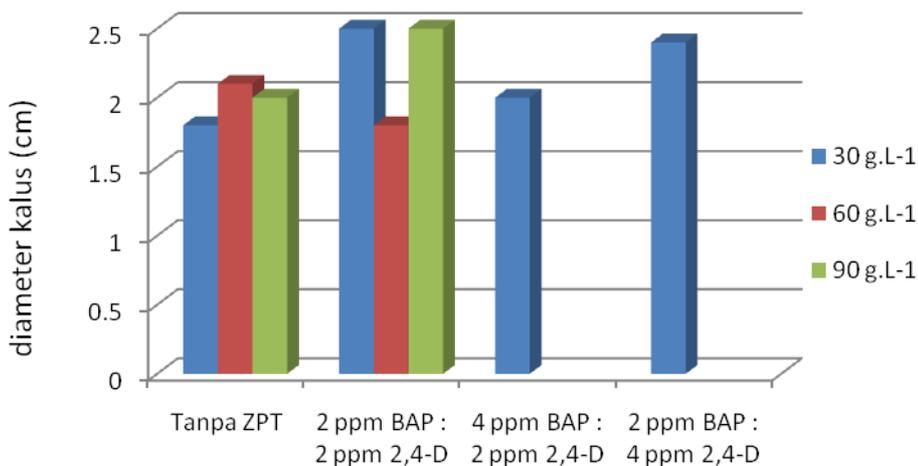
Gambar 2. Pengaruh pemberian sukrosa dan komposisi pemberian sitokinin (BAP) dan auksin (2,4-D) terhadap saat terbentuk kalus.

Kecepatan pertumbuhan jaringan eksplan pisang dalam membentuk kalus dipengaruhi oleh adanya suplai sukrosa dalam media tanam. Pada saat inisiasi awal pembentukan kalus, auksin dan sitokinin yang diberikan ke dalam media tidak memberikan pengaruh terhadap kecepatan pembentukan kalus. Hal ini terjadi karena suplai auksin dan sitokinin endogen yang ada di dalam jaringan eksplan masih cukup untuk menstimulasi pembentukan kalus. Namun demikian, hasil penelitian Marlin et al. (2007) pada kultur meristem pisang curup menunjukkan saat terbentuk kalus tercepat diperoleh pada media dengan pemberian 1 ppm 2,4-D dan 0,1 ppm kinetin, yaitu 9 hari setelah kultur. Hal ini menunjukkan pula bahwa sumber eksplan yang berbeda memberikan respon yang tidak sama terhadap pemberian ZPT secara eksogen. Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan kalus menunjukkan pula bahwa pertumbuhan kalus yang terbentuk dari masing-masing eksplan memiliki diameter yang berbeda ter-

gantung dengan perlakuan yang diberikan. Diameter kalus terbesar (2.5 cm) terbentuk dari eksplan yang dikulturkan pada media dengan penambahan 30 g L⁻¹ sukrosa dan 2 ppm BAP : 2-4 ppm 2,4-D (Gambar 3). Hasil penelitian Aniel Kumar et al. (2010) menunjukkan bahwa media dengan pemberian 1 mg. L⁻¹ 2,4-D dan 2 mg L⁻¹ BAP merupakan media terbaik dalam pembentukan kalus cabe.

Pemberian sukrosa yang dikombinasi dengan pemberian BAP dan 2,4-D dalam konsentrasi yang relatif tinggi dapat menghambat pertumbuhan kalus dari kultur jantung pisang Curup. Pada media tersebut, tekanan osmotik media menjadi sangat tinggi akibat tingginya kepekatan media akibat penambahan sukrosa dan ZPT.

Dengan adanya tekanan osmotik media yang lebih tinggi dibandingkan dengan tekanan osmotik yang ada dalam jaringan eksplan menyebabkan penyerapan hara oleh tanaman menjadi terhambat.



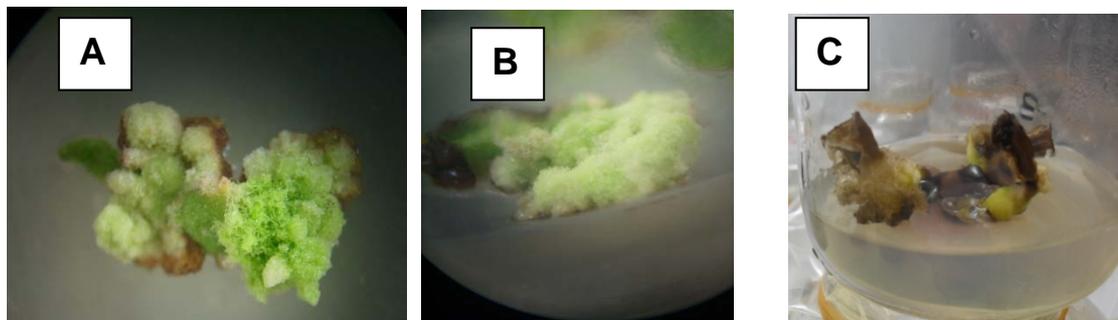
Gambar 3. Pengaruh pemberian sukrosa dan komposisi pemberian BAP dan 2,4-D terhadap diameter kalus (4 mst).

Inisiasi kalus embriogenik pada kultur jantung pisang dengan sukrosa, BAP dan 2,4-D

Hasil yang sama didapatkan oleh Aniel Kumar et al. (2010), bahwa pembentukan kalus menjadi menurun pada media dengan pemberian 2,4-D dan NAA dalam konsentrasi yang lebih tinggi dari 1 mg.L⁻¹. Namun adanya penambahan 2,4-D ke dalam media kultur sangat diperlukan untuk menghasilkan kalus embriogenik (George dan Sherrington, 1984).

Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan kalus dalam 8 minggu kultur, menunjukkan warna kalus kuning kehijauan. Terbentuknya kalus disebabkan adanya rangsang luka (Fowler, 1983). Rangsang tersebut menyebabkan keseimbangan pada dinding sel berubah arah, sebagian protoplas mengalir ke luar sehingga mulai terbentuk kalus. Pada beberapa perlakuan dominasi warna kecoklatan menutupi permukaan kalus. Hal ini dapat terjadi sebagai

akibat dari tingginya kandungan senyawa fenolik yang terbentuk serta menutupi permukaan kalus. Nisa dan Rodinah (2005) juga mendapatkan beberapa eksplan yang mati akibat pencoklatan (*browning*). Pencoklatan salah satunya disebabkan oleh sintesis metabolit sekunder (senyawa fenolik). Adanya sintesis senyawa fenolik yang menutupi permukaan kalus ini dapat menghambat pertumbuhan kalus. Bahkan, pada kultur yang lebih lanjut dapat menyebabkan kematian eksplan. Selain itu, pada permukaan kalus juga cenderung keras dan terdapat jaringan yang menebal. Di samping itu, pertumbuhan kalus yang terjadi memang belum mencapai tingkat yang maksimal. Hal disebabkan karena pada saat pengamatan akhir, eksplan baru berumur 8 minggu kultur.



Gambar 4. Pembentukan kalus pisang ambon curup dengan pemberian sukrosa, 2,4-D dan BAP secara *in vitro* (8 minggu kultur)

A) Kalus kehijauan, B) kalus kuning kehijauan, C) Kalus didominasi *browning* akibat senyawa fenolik

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan persentase hidup eksplan jantung pisang Curup mencapai 100 % (tanpa kontaminasi). Peningkatan pemberian konsentrasi sukrosa (60-90 g L⁻¹) mengakibatkan semakin lama eksplan membentuk kalus.

Pembentukan kalus tercepat (3 mst) diperoleh pada media dengan sukrosa 30 g.L⁻¹ dengan media tanpa sitokinin (BAP) dan auksin (2,4-D) maupun pada semua komposisi pemberian sitokinin (BAP) dan auksin (2,4-D). Pertumbuhan kalus terbesar (diameter = 2.5 cm) terbentuk dari eksplan yang dikulturkan pada media dengan penambahan 30 g.L⁻¹ sukrosa dan 2 ppm BAP : 2-4 ppm 2,4-D, dengan struktur kalus yang remah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Ir. Yulian, M.Sc, dan Ir. Hermansyah, M.P. atas kerjasama dalam Tim Penelitian dengan sumber dana dari Proyek Penelitian Fundamental DP2M DIKTI Tahun 2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Akin-Idowu, P.E., D.O. Ibitoye, and O.T. Ademoyegun. 2009. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African J. of Biotech.* 8(16) : 3782-3788.
- Al-Amin, M.D., M.R. Karim, M.R. Amin, S. Rahman, and A.N.M. Mamun. 2009. *In vitro* micropropagation of banana (*Musa spp.*). *Bangladesh J. Agril. R.* 34(4): 645-659.
- Aniel Kumar, O., S. Subba Tata, and T. Rupavati. 2010. *In vitro* induction of callusogenesis in chilli peppers (*Capsicum annum* L.). *International J. of Current Res.* 3: 42-45.
- Bhosale, U.P., S.V. Dubhashi, N.S. Mali, and H.P. Rathod. 2011. *In vitro* shoot multiplication in different species of banana. *Asian J. of Plant Science and Research.* 1(3): 23-27.
- Fowler, M.W., 1983. Commercial application and economic aspects of mass plant cell culture, dari Mantell, S.H., Smith, H. (ed.). *Plant Biotechnology.* Cambridge University Press, London, 3-38.
- George, E.F. and P.D. Sherrington, 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories.* Exegetic Ltd. England.
- Levoire, P. 2000. Banana *in vitro* regeneration: Virus eradication. *Laboratory of Pathology, University of Gembloux, Belgium.* P: 22.
- Marlin. 1998. High Multiplication of Plant Regeneration of Garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro.* *Akta Agrosia* II(2): 57-60.
- Marlin, 2010. Regenerasi *In Vitro* Planlet Pisang Ambon Curup Bebas Penyakit Layu *Fusarium* Prosiding pada Seminar Nasional dan Rapat Tahunan Dekan Bidang Pertanian BKS-Barat
- Marlin, H. Bustamam, dan M. Taufik. 2004. Peningkatan Produksi Bibit jahe Bebas Penyakit Layu Bakteri dengan Pembentukan Rimpang Mikro. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XI. Lembaga Penelitian Universitas Bengkulu.
- Marlin, Mukhtasar, dan Hartal. 2007. Upaya penyediaan bibit pisang Ambon 'Curup' Unggulan Pro-

Inisiasi kalus embriogenik pada kultur jantung pisang dengan sukrosa, BAP dan 2,4-D

- vinsi Bengkulu dengan pembentukan planlet *in vitro*. Laporan Penelitian pada Lembaga Penelitian Universitas Bengkulu.
- Nisa, C., dan Rodinah. 2005. Kultur jaringan beberapa kultivar buah pisang (*Musa paradisiaca* L.) dengan pemberian campuran NAA dan Kinetin. *Bioscientiae* 2(2) 23-36.
- Thanh T. V. K and T. H. Trinh. 1990. Organic Differentiation. In S.S. Bhojwani (ed.). *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Elsevier Science Publ. Netherlands.
- Vickery, M.L., B. Vickery. 1981. Secondary plant metabolism, The Macmillan Press, London, 255-288.
- Warreing, P.F. and I.D.J. Phillips. 1981. *Growth and differentiation in Plants*. Pergamon Press 3rd Ed.