

## Pengaruh TDZ terhadap induksi embrio somatik sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) pada tiga metode kultur berbeda

*Effect of TDZ on the somatic embryo induction of sago palm (Metroxylon sagu Rottb.) in three different culture methods*

Imron RIYADI<sup>1,2\*</sup>, Darda EFENDI<sup>2</sup>, Bambang S. PURWOKO<sup>2</sup> & Djoko SANTOSO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16128, Indonesia  
<sup>2</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima tgl 5 Juni 2017 / disetujui tgl 24 November 2017

### Abstract

*A right combination of cytokinin is able to support the process of callus differentiation to somatic embryo formation in plant somatic embryogenesis. Liquid culture application could increase the efficiency of in vitro culture process on plants. This research aimed to determine the best concentration of TDZ combined with kinetin for callus differentiation to somatic embryo of sago palm on three culture methods. Plant material used was embryogenic callus derived from tips meristem culture from sucker of Alitir sago palm. Callus was cultured on modified MS media added with: 0.0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg/L TDZ combined with 0.5 mg/L kinetin for 12 weeks with subcultures every 6 weeks. Three culture methods used were suspension, temporary immersion system (TIS), and solid media. There were 12 treatments with 4 replicates. The results showed that the highest number of somatic embryos was achieved on TIS culture with 1.0 mg/L TDZ and 0.5 mg/L kinetin in 6 weeks (167.3 embryos/flask) and 12 weeks (389.2 embryos/flask) with its fresh weight of 18.4 g and 29.1 g, respectively. The highest survival rate in final culture (12 weeks) was achieved on TIS culture with 1.0 mg/L TDZ and 0.5 mg/L kinetin (100%). The shortest time for somatic embryos expression was achieved on TIS culture with 1.0 mg/L TDZ and 0.5 mg/L kinetin in two weeks after culture. Histological analysis of early-stage somatic embryos showed the presence of dense and compact cellular arrangements which formed growth spot axis for shoot or SAM (shoot apical meristem) and root or RAM (root apical meristem) that connected each other.*

[Key words: culture method, embryogenic callus, *Metroxylon sagu* Rottb., kinetin, sago palm, TDZ]

### Abstrak

Aplikasi kombinasi sitokinin yang tepat dapat mendorong proses diferensiasi kalus membentuk

embrio somatik pada proses embriogenesis somatik tanaman. Penggunaan metode kultur cair dapat meningkatkan efisiensi proses kultur *in vitro* tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi TDZ terbaik dikombinasikan dengan kinetin dalam proses diferensiasi kalus membentuk embrio somatik tanaman sagu pada tiga metode kultur. Bahan tanam penelitian berupa kalus embriogenik tanaman sagu asal kultur meristem pucuk dari anakan sagu jenis Alitir. Kalus dikulturkan pada media modifikasi dengan penambahan TDZ dengan konsentrasi 0,1; 0,5; dan 1,0 mg/L dikombinasikan dengan kinetin 0,5 mg/L selama 12 minggu yang disubkultur pada umur 6 minggu. Metode kultur yang digunakan terdiri atas tiga macam yaitu: kultur suspensi, sistem perendaman sesaat (SPS) dan media padat. Perlakuan terdiri atas 12 kombinasi perlakuan dengan empat ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata jumlah embrio somatik tertinggi dicapai pada perlakuan metode kultur SPS dengan TDZ 1,0 mg/L baik pada umur kultur 6 minggu (167,3 buah) maupun umur 12 minggu (389,2 buah). Rerata bobot segar tertinggi juga diperoleh pada perlakuan metode kultur SPS dengan TDZ 1,0 mg/L pada umur kultur 6 minggu (18,4 g) dan 12 minggu (29,1 g). Rerata daya hidup kultur akhir (12 minggu) tertinggi sebesar 100% diperoleh pada perlakuan SPS. Induksi embrio somatik tercepat yakni setelah dua minggu diperoleh pada metode kultur SPS dengan TDZ 1,0 mg/L dikombinasikan dengan kinetin 0,5 mg/L. Analisis histologi embrio somatik stadium awal menunjukkan adanya susunan sel yang rapat dan kompak yang menyusun semacam poros atau berkas titik tumbuh tunas atau SAM (*shoot apical meristem*) maupun akar atau RAM (*root apical meristem*) yang saling terhubung.

[Kata kunci: kalus embriogenik, metode kultur, kinetin, TDZ, sagu, *Metroxylon sagu*]

## Pendahuluan

Tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) lebih sering diperbanyak secara vegetatif dengan tunas anakan karena produksi biji sangat jarang yang disebabkan tanaman sagu pada umumnya ditebang untuk diambil patinya menjelang berbunga (Flach, 1997; Bintoro *et al.*, 2013). Namun, untuk membangun perkebunan sagu skala luas, ketersediaan anakan yang seragam dalam jumlah besar merupakan hambatan utama (Rostiwati *et al.*, 2008).

Teknologi kultur embriogenesis somatik berpotensi besar untuk memproduksi bibit dalam jumlah massal yang bersifat homogen dalam waktu relatif singkat (Riyadi *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2015).

Untuk penyediaan benih sagu unggul secara massal, penting untuk dikembangkan teknik perbanyak *in vitro* menggunakan embriogenesis somatik. Penelitian embriogenesis somatik tanaman sagu telah berhasil dikembangkan oleh Tahardi *et al.* (2002) yang menggunakan sistem kultur media padat. Namun, untuk pengembangan secara massal, teknik media padat tersebut masih memiliki beberapa kendala terutama tingkat efisiensi produksi yang masih rendah. Untuk peningkatan efektifitas dan efisiensi dalam produksi embriogenesis somatik, maka penelitian embriogenesis somatik dengan teknik media cair penting untuk dikembangkan. Penerapan kultur cair ditujukan untuk otomatisasi dan *scale-up* serta meningkatkan pertumbuhan dan keseragaman kultur *Vigna mungo* L. (Muruganantham *et al.*, 2010), *Dioscorea alata* L. 'Pacala Duclos' (Jova *et al.*, 2011) dan *Stevia rebaudiana* (Gupta *et al.*, 2014). Metode kultur cair potensial yang dapat dikembangkan adalah sistem perendaman sesaat (SPS) atau *temporary immersion system* (TIS) dan kultur suspensi (*suspension culture*). Hasil penelitian pada kelapa sawit menggunakan metode kultur SPS menunjukkan bahwa produksi embrio somatik dari kalus noduler cukup tinggi dan embrio somatik yang dihasilkan lebih seragam (Tahardi, 1998) juga menghasilkan planlet yang jagur dan lebih seragam (Riyadi & Sumaryono, 2009a). Kultur TIS telah digunakan untuk pengembangan tanaman pisang (Ul-Haq & Dahot, 2007), *Rhodophiala* Species (Munoz *et al.*, 2009), tebu (Mordoco *et al.*, 2009), sagu (Kasi & Sumaryono, 2008; Riyadi & Sumaryono, 2009a), dan *Echinacea purpurea* L (Jones *et al.*, 2007).

Tingkat keberhasilan diferensiasi kalus membentuk embrio somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain tingkat meristematis sel eksplan yang digunakan, zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan khususnya jenis dan konsentrasi yang akurat, ketepatan media tumbuh yang digunakan serta faktor-faktor fisiologi sel maupun mikro iklim kultur yang bersangkutan

(Asemota *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2007; Verma & Bansa, 2014). Penggunaan ZPT khususnya golongan sitokinin dapat meningkatkan induksi dan regenerasi embrio somatik. Thidiazuron (TDZ) merupakan salah satu golongan sitokinin yang cukup efektif dalam proses induksi embriogenesis somatik tanaman (Jones *et al.*, 2007; Dam *et al.*, 2010; Verma & Bansa, 2014). Selain TDZ, kinetin juga sering digunakan untuk induksi dan regenerasi terutama tanaman Palma (Tahardi, 1998; Riyadi *et al.*, 2005; Riyadi & Sumaryono 2009b; Riyadi, 2010). Penggunaan jenis sitokinin dan konsentrasi yang akurat untuk induksi embriogenesis somatik yang disesuaikan tanaman yang dikulturkan penting untuk diteliti dan dikembangkan. Kombinasi TDZ dengan jenis sitokinin lain dapat meningkatkan induksi embriogenesis somatik pada tanaman *Limonium sinensis* yang dikombinasikan dengan BA 2,2  $\mu$ M (Dam *et al.*, 2010) dan pada tanaman *Hedychium coronarium* yang dikombinasikan dengan 1 mg/L BAP (Verma & Bansa, 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan menentukan konsentrasi optimal TDZ dikombinasikan dengan kinetin pada proses diferensiasi kalus membentuk embrio somatik tanaman sagu pada tiga metode kultur yaitu: media padat, SPS dan suspensi.

## Bahan dan Metode

### Bahan tanaman dan kondisi kultur

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biak Sel & Mikropropagasi Tanaman Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia. Bahan tanaman yang digunakan berupa kalus nodular atau embriogenik sagu Alitir (subkultur ke-26) yang telah dilakukan seleksi khusus kalus embriogenik.

Kalus remah dikulturkan pada medium padat MS (Murashige & Skoog, 1962) yang dimodifikasi (MMS) seperti dilaporkan oleh Tahardi *et al.* (2002) sampai terbentuk kalus noduler. Kalus nodular dijadikan eksplan untuk menginduksi embrio somatik sesuai perlakuan yang diuji. Tingkat keasaman medium diatur pada pH 5,7 selanjutnya ditambahkan Gelrite 3 g/L khusus pada media padat, sedangkan media untuk SPS ditambahkan antibiotik berupa Rifampicin dan Tetracyclin dengan konsentrasi masing-masing 15 mg/L. Selanjutnya media tersebut beserta zat antibiotik yang terkandung disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121  $^{\circ}$ C dengan tekanan 1 kg/cm<sup>2</sup> selama 20 menit.

Kalus sagu pada semua perlakuan dikulturkan di dalam ruang terang di bawah lampu TL dengan intensitas cahaya 30  $\mu$ mol foton/m<sup>2</sup>/detik. dan lama penyinaran 12 jam dengan suhu ruangan 26  $\pm$  1  $^{\circ}$ C selama 6 minggu (kultur 6 minggu). Setelah diamati, selanjutnya semua kultur disubkultur (kultur 12 minggu) pada media dan perlakuan

yang sama dengan sebelumnya. Durasi kultur kedua ini selama 6 minggu sehingga total kultur selama 12 minggu. Kultur suspensi ditempatkan pada shaker dengan kecepatan 100 rpm. Kultur SPS diatur dengan timer yang mengatur interval perendaman setiap 12 jam selama tiga menit per perendaman media.

#### *Induksi embriogenesis somatik*

Perlakuan yang digunakan terdiri atas dua faktor yaitu kombinasi ZPT dan metode kultur yang masing-masing terdiri atas beberapa level. Perlakuan faktor pertama yaitu konsentrasi TDZ yang terdiri atas 4 level: 0; 0,1; 0,5; dan 1,0 mg/L yang masing-masing dikombinasikan dengan kinetin 0,5 mg/L kecuali pada 0 mg/L (kontrol). Penggunaan kinetin 0,5 mg/L berdasarkan keberhasilan penelitian embriogenesis somatik sagu pada media padat yang dilakukan oleh Riyadi *et al.* (2005). Perlakuan kedua berupa metode kultur yang terdiri atas 3 level: kultur suspensi menggunakan tabung erlenmeyer 250 mL, sistem perendaman sesaat (SPS) merk Rita volume 1000 mL dan media padat menggunakan botol jar. Secara rinci, terdapat 12 kombinasi perlakuan yang diuji.

Penelitian ini terdiri atas dua kultur yang berkesinambungan masing-masing selama 6 minggu. Pada kultur awal atau kultur 6 minggu, sebanyak 0,5 g kalus nodular tanaman sagu dimasukkan dalam bejana/wadah yang berisi media sebanyak 170 mL (kecuali media padat sebanyak 40 mL/jar) yang disesuaikan dengan masing-masing perlakuan. Pada tahap kultur 12 minggu (subkultur), semua hasil kultur 6 minggu langsung disubkultur sebagai eksplan.

#### *Histologi embrio somatik*

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

#### *Analisis statistik*

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap metode faktorial dengan empat ulangan. Data-data hasil pengamatan pada setiap parameter 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 parameter menggunakan program SPSS versi 19.

Parameter yang diamati pada penelitian ini terdiri atas aspek pertumbuhan dan perkembangan, histologi embrio somatik serta daya hidup (*survival rate*) kultur *in vitro*. Secara rinci, terdapat empat parameter yang diamati yaitu: bobot segar, jumlah embrio somatik yang terbentuk, daya hidup total kultur dan kecepatan atau waktu induksi embrio somatik. Pengukuran parameter bobot segar dilakukan dengan cara menimbang eksplan dan hasil kultur setelah panen pada umur 6 minggu dan 12 minggu (subkultur). Penghitungan jumlah embrio somatik yang terbentuk dilakukan dengan cara menuangkan secara merata hasil kultur pada petri dish bergaris, kemudian dihitung embrio somatik yang terbentuk dengan menggunakan counter. Penghitungan daya hidup total kultur dengan cara jumlah kultur hidup dibagi total kultur awal per siklus dikalikan 100%. Penentuan penghitungan kecepatan induksi embrio somatik dengan cara menghitung total mulai terbentuknya embrio somatik (mulai awal kultur) pada setiap unit percobaan dan selanjutnya dihitung reratanya dikalikan 100%. Untuk mengetahui kecepatan induksi embrio somatik pada sisa kalus embriogenik kultur 6 minggu, maka pada kultur 12 minggu diamati lagi untuk kecepatan induksi embrio somatik. Pengamatan dan penghitungan parameter bobot segar dan jumlah embrio somatik dilakukan secara aseptik di dalam LAF.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### *Induksi embriogenesis somatik*

Pada kultur 6 minggu, jumlah embrio somatik hasil induksi masih sedikit. Setelah disubkultur atau kultur 12 minggu terjadi peningkatan jumlah embrio somatik yang sangat pesat terutama pada perlakuan sistem kultur SPS/TIS dengan penambahan TDZ 1,0 mg/L + kinetin 0,5 mg/L (Gambar 1). Embrio somatik yang terbentuk sebagian besar tahap perkembangan *globular* dan ada beberapa tahap lebih lanjut yaitu *elongated* dan *scutellar*. Namun data rincian tahap embrio somatik tidak ditampilkan karena jumlah embrio somatik dewasa masih sangat sedikit ( $\leq 15$  buah).

Berdasarkan analisis statistik, jumlah rata-rata embrio somatik tertinggi sebesar 167,2 buah (kultur 6 minggu) dan 389,2 buah (kultur 12 minggu) yang keduanya dicapai pada perlakuan kultur SPS dengan media yang ditambah TDZ

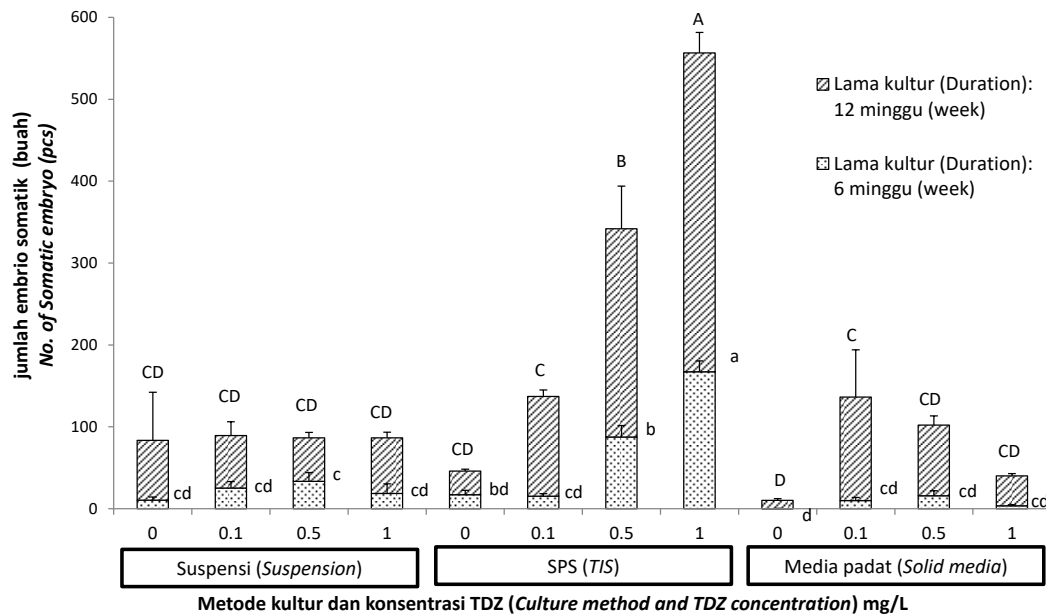
1 mg/L + kinetin 0,5 mg/L yang menunjukkan perbedaan secara signifikan. Jumlah rata-rata embrio somatik terendah sebesar 0,2 buah (kultur 6 minggu) dan 10,0 buah (kultur 12 minggu) diperoleh pada perlakuan kultur media padat dengan media kontrol atau tanpa penambahan ZPT (Gambar 1).

Inisiasi embrio somatik mulai terlihat pada kultur 6 minggu namun jumlahnya masih sedikit ( $\leq 167$  buah). Peningkatan jumlah embrio somatik terjadi setelah disubkultur (kultur 12 minggu) yang mencapai ( $\leq 350$  buah), hal ini karena pada kultur 6 minggu lebih dominan untuk proliferasi kalus dibandingkan dengan induksi embrio somatik (Gambar 1). Pada kultur 12 minggu, seiring dengan proses perkembangan umur kalus dengan dipacu dengan penambahan TDZ maka proses diferensiasi kalus membentuk embrio somatik semakin meningkat yang terjadi pada semua perlakuan. Konsentrasi TDZ 1 mg/L ( $4,54 \mu\text{M}$ ) dikombinasikan dengan kinetin 0,5 mg/L merupakan perlakuan terbaik karena dapat memberikan jumlah induksi embrio somatik tertinggi khususnya pada kultur SPS. Hal ini diduga karena konsentrasi TDZ 1 mg/L dapat mempengaruhi induksi embriogenesis somatik yang lebih efektif (optimal) dibandingkan dengan konsentrasi TDZ 0,1 maupun 0,5 mg/L

Penggunaan TDZ juga telah diteliti oleh Jones et al. (2007) untuk meningkatkan embriogenesis

somatik tanaman *Echinacea purpurea* pada metode kultur suspensi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengaruh TDZ dengan konsentrasi 15 – 20  $\mu\text{M}$  (3,3 – 4,4 mg/L) berhasil untuk meningkatkan embriogenesis somatik pada tanaman *Echinacea purpurea*. Pada kultur sagu ini, penggunaan TDZ meskipun 0,1 – 1,0 mg/L pada media kultur telah menghasilkan embrio somatik. Diduga selain peran TDZ tersebut, juga didorong peran kinetin 0,5 mg/L yang dikombinasikan dengan TDZ tersebut sehingga dapat menghasilkan embrio somatik lebih banyak dibandingkan dengan pengaruh TDZ ataupun kinetin secara tunggal (Gambar 1). Berdasarkan hasil penelitian Riyadi (2010), penggunaan kinetin pada embriogenesis somatik sagu media padat telah terbukti lebih efektif dibandingkan dengan sitokinin lainnya (BAP).

Metode kultur SPS mampu mendorong proses diferensiasi kalus membentuk embrio somatik paling tinggi. Hal ini disebabkan karakteristik kondisi kultur SPS yang dapat mendukung proses embriogenesis yang lebih optimal. Kondisi kultur SPS dibuat pengaturan interval dan lama waktu (durasi) perendaman kultur yang periodik yaitu setiap 12 jam selama 3 menit. Kondisi menyebabkan kondisi sel-sel dalam kalus noduler atau proembrio seperti dilaparkan (*starvation*) atau dibuat stress sesaat.



\*) Huruf kapital atau non kapital yang sama pada diagram yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha = 0,05$ .

\*) The same bar with different letters (capital and non capital) are significantly different according to Duncan's multiple range test at  $\alpha = 0.05$ .

Gambar 1. Jumlah embrio somatik (sebagian besar stadium *globular*, beberapa *elongated* dan sedikit *scutellar* dan *coleoptilar*) tanaman sagu mulai dari kultur 6 minggu sampai dengan kultur 12 minggu.

Figure 1. Number of somatic embryo (*globular* stage was dominantly, then several *elongated* shape and few *scutellar* and *coleoptilar* shape) of sago palm beginning culture of 6 weeks untill 12 weeks.

Keadaan ini menyebabkan nutrisi tidak menumpuk terlalu banyak dalam sel dan menjadi menipis, sehingga energi yang ada akan digunakan lebih efektif untuk bertahan hidup dan akan menurunkan proses pertumbuhan biomassa sel sehingga menurunkan proliferasi sel. Pada saat media masuk merendam semua permukaan kalus nodular atau proembrio, semua permukaan kalus nodular akan menyerap secara merata dan lebih optimal dalam proses penyerapan nutrisi dan TDZ yang terkandung dalam media. Selanjutnya, hasil penyerapan nutrisi dan TDZ ini akan digunakan lebih efektif untuk proses perkembangan embriogenesis yang dipacu TDZ yang akan mengaktifkan enzim-enzim yang berperan pada embriogenesis somatik. Selain itu, lingkungan TIS dapat menyuplai gas O<sub>2</sub> secara terus-menerus yang akan digunakan dalam proses metabolisme sel-sel untuk proses embriogenesis somatik.

**Bobot segar kultur**

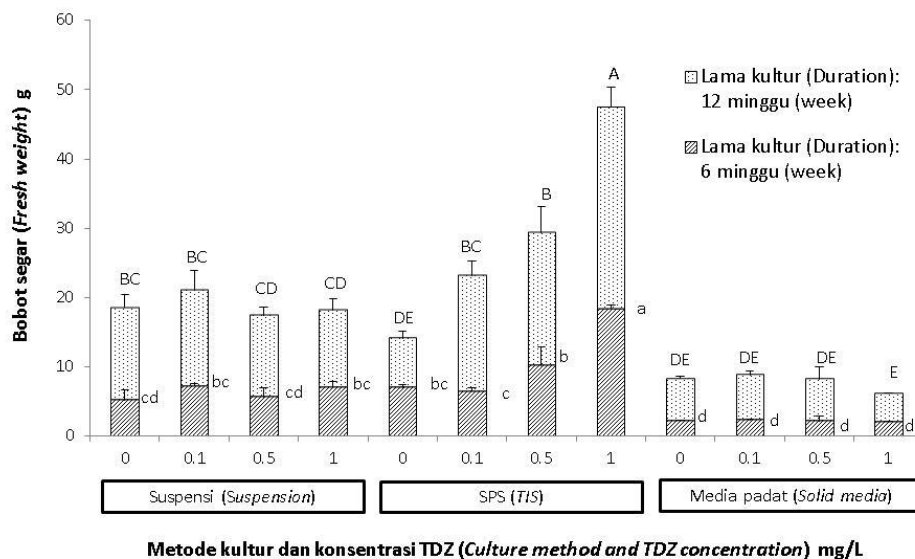
Pertumbuhan biomassa sago pada kultur 6 minggu cukup pesat yang meningkat sampai 36,8 kali dari biomassa awal kultur khususnya pada kultur SPS. Pada kultur 12 minggu biomassa masih meningkat lagi meskipun tidak sepesat pada kultur 6 minggu terutama pada kultur SPS dan suspensi (Gambar 2). Biomassa total hasil kultur ini terdiri atas embrio somatik dan kalus embriogenik sisa kultur yang belum membentuk embrio somatik.

Pada kultur 6 minggu, bobot segar kultur sago tertinggi juga dicapai pada perlakuan metode kultur SPS dengan media yang mengandung TDZ 1 mg/L + kinetin 0,5 mg/L dengan rata-rata bobot segar 18,4 g/bejana atau 36,8 kali lipat dari bobot

basah pada saat awal kultur (0,5 g/bejana) yang berbeda nyata dengan 11 perlakuan lainnya. Bobot segar terendah sebesar 1,9 g/bejana atau 3,9 kali lipat dari bobot basah awal yang diperoleh pada perlakuan kultur padat dengan media yang mengandung TDZ 1 mg/L + kinetin 0,5 mg/L (Gambar 2).

Pada kultur 12 minggu, kondisi pertumbuhan bobot segar pada masing-masing perlakuan juga mirip pada saat kultur 6 minggu. Peningkatan bobot segar kultur sago tertinggi juga dicapai pada perlakuan metode kultur SPS dengan media yang ditambah TDZ 1 mg/L + kinetin 0,5 mg/L dengan rata-rata bobot segar 29,1 g/bejana atau 58,3 kali lipat dari bobot basah awal kultur yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Bobot segar terendah sebesar 4,2 g/bejana atau 8,4 kali lipat dari bobot basah awal yang diperoleh pada perlakuan kultur padat dengan media yang ditambah TDZ 1 mg/L + kinetin 0,5 mg/L (Gambar 2).

Secara umum biomassa mengalami pertumbuhan pada semua perlakuan. Peningkatan laju pertumbuhan tertinggi dicapai oleh perlakuan kultur SPS baik pada kultur 6 minggu maupun 12 minggu. Pada kultur media padat, laju pertumbuhan pada kultu 12 minggu juga mengalami peningkatan meskipun tidak sebesar pada kultur SPS dan suspensi (Gambar 2). Pertumbuhan biomassa sago pada kultur SPS paling tinggi sehingga dapat menghasilkan jumlah embrio somatik tertinggi. Peningkatan biomassa kultur berpotensi besar untuk meningkatkan jumlah embrio somatik yang dihasilkan (Deo *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015).



\*) Huruf kapital atau non kapital yang sama pada diagram yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha = 0,05$ .

\*) The same bar with different letters (capital and lower case) are significantly different according to Duncan's multiple range test at  $\alpha = 0,05$ .

Gambar 2. Bobot segar hasil kultur sago pada kultur 6 minggu dan kultur 12 minggu (saat panen).

Figure 2. Fresh weight of sago palm cultures at 6 weeks and 12 weeks (harvest) of culture.

*Daya hidup kultur*

Terdapat perbedaan daya hidup hidup sagu pada kultur 6 dan 12 minggu. Pada kultur 12 minggu, daya hidup kultur sagu lebih tinggi dibandingkan pada kultur 6 minggu yang hampir mencapai 100% (hidup semua) kecuali pada perlakuan kultur suspensi dengan media tanpa ZPT (85,7%) dan kultur media padat dengan media yang ditambah TDZ 0,1 mg/L + kinetin 0,5 mg/L (88,9%). Pada metode kultur SPS daya hidup kultur 12 minggu sangat baik bahkan mencapai 100% pada semua perlakuan dibandingkan pada saat kultur 6 minggu (Gambar 3).

Secara umum, tingkat daya hidup kultur sagu tertinggi dicapai pada metode kultur suspensi (rerata total kultur 6 dan 12 minggu). Tabung erlenmeyer pada metode suspensi ini lebih menjamin bebas dari kontaminasi karena celah dan peluang kontaminasi paling sedikit dibandingkan dengan metode SPS dan media padat. Konstruksi perangkat SPS mempunyai susunan yang paling rumit dan banyak celah yang dapat berpeluang terkontaminasi. Metode media padat dalam botol jar mempunyai celah dan peluang rentan kontaminasi yaitu antara tutup dengan drat botol jar. Metode kultur suspensi tidak ada celah penyebab kontaminasi karena tutup bejana atau erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dengan diikat karet sehingga sangat rapat dan lebih kedap udara. Udara yang masih bisa masuk dalam bejana kultur merupakan penyebab utama kontaminasi. Adanya kontaminasi berpengaruh terhadap penurutan daya hidup total kultur.

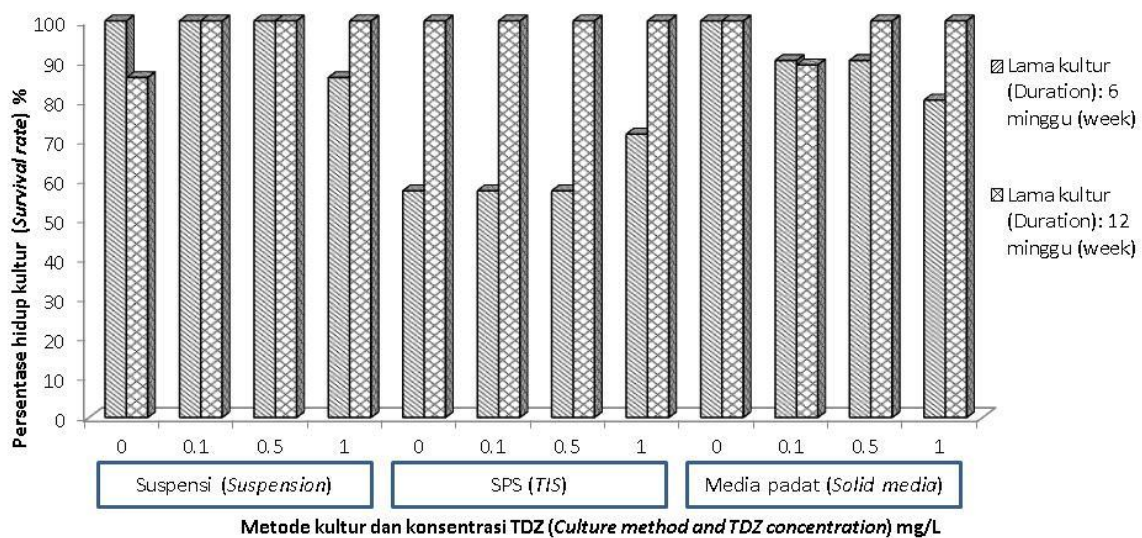
Fenomena yang menarik adalah adanya perbedaan daya hidup yang paling mencolok pada kultur SPS. Meskipun pada kultur 6 minggu tidak mencapai daya hidup 100%, namun setelah kultur 12 minggu dapat mencapai daya hidup 100% pada semua perlakuan (Gambar 3). Daya hidup yang

tinggi dapat mendorong peningkatan biomassa dan jumlah induksi embrio somatik sehingga pada saat panen dapat menghasilkan bobot basah maupun jumlah embrio somatik tertinggi (Gambar 1 & 2). Hal ini mirip pada hasil penelitian yang dilakukan oleh You et al. (2011) mengenai embriogenesis somatik pada tanaman *Cyclamen persicum* Mill. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa persentase hidup kultur yang tinggi mendorong peningkatan biomassa sehingga saat panen dihasilkan planlet yang lebih banyak.

*Kecepatan induksi atau waktu kalus berdiferensiasi membentuk embrio somatik*

Perlakuan kultur SPS dapat menghasilkan kecepatan induksi lebih tinggi atau lama waktu induksi embrio somatik lebih singkat dibanding sistem kultur suspensi maupun media padat. Pada kultur media padat, menunjukkan lama waktu embrio somatik paling lambat (lama) dibandingkan dengan perlakuan kedua metode kultur lainnya (Tabel 1 dan Gambar 4). Semakin cepat waktu induksi embrio somatik, maka berpotensi dapat menghasilkan embrio somatik lebih banyak. Hal ini sesuai dengan data perolehan embrio somatik (Gambar 1) dan perolehan bobot segar (Gambar 2), perlakuan kultur SPS/TIS menghasilkan hasil tertinggi.

Waktu induksi embrio somatik tercepat (2 minggu) dicapai oleh perlakuan metode kultur TIS dengan media yang ditambah TDZ 1 mg/L + kinetin 0,5 mg/L yang berbeda signifikan dengan perlakuan lainnya kecuali dengan sesama metode kultur TIS pada semua konsentrasi TDZ. Waktu induksi embrio somatik terlama (6 minggu) diperoleh pada perlakuan metode kultur media padat tanpa ZPT (kontrol) yang perbedaannya cukup besar (Tabel 1).



Gambar 3. Daya hidup kultur embrio somatik tanaman sagu pada kultur 6 minggu dan 12 minggu.

Figure 3. Survival rate of somatic embryo sago palm at 6 weeks and 12 weeks of culture.

Tabel 1. Lama waktu kalus membentuk embrio somatik tanaman sagu.

Table 1. Duration of callus to form somatic embryo of sago palm.

Sistem kultur/ Culture method	Perlakuan/ Treatments		Lama waktu induksi embrio somatik (minggu)/ Duration of somatic embryo induction (week)	
	ZPT		Kultur 6 minggu/ 6 week cultures	Kultur 12 minggu/ 12 week culture
	TDZ (mg/L)	Kinetin (mg/L)		
Suspensi/ Suspension	0	0	4,8 ef	4,0 ef
Suspensi/ Suspension	0,1	0,5	3,8 cde	3,5 cde
Suspensi/ Suspension	0,5	0,5	3,3 bcd	3,3 cde
Suspensi/ Suspension	1,0	0,5	4,0 de	3,0 bcd
SPS/TIS	0	0	4,0 de	4,5 fg
SPS/TIS	0,1	0,5	2,8 abc	2,4 ab
SPS/TIS	0,5	0,5	2,3 ab	2,0 a
SPS/TIS	1,0	0,5	2,0 a*	2,0 a*
Media padat/ Solid media	0	0	6,0 g	5,0 g
Media padat/ Solid media	0,1	0,5	5,3 fg	2,8 abc
Media padat/ Solid media	0,5	0,5	4,8 ef	2,0 a
Media padat/ Solid media	1,0	0,5	4,8 ef	3,8 def

\*) Angka dalam kolom sama diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha = 0,05$ .

\*) The same column with different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at  $\alpha = 0.05$ .

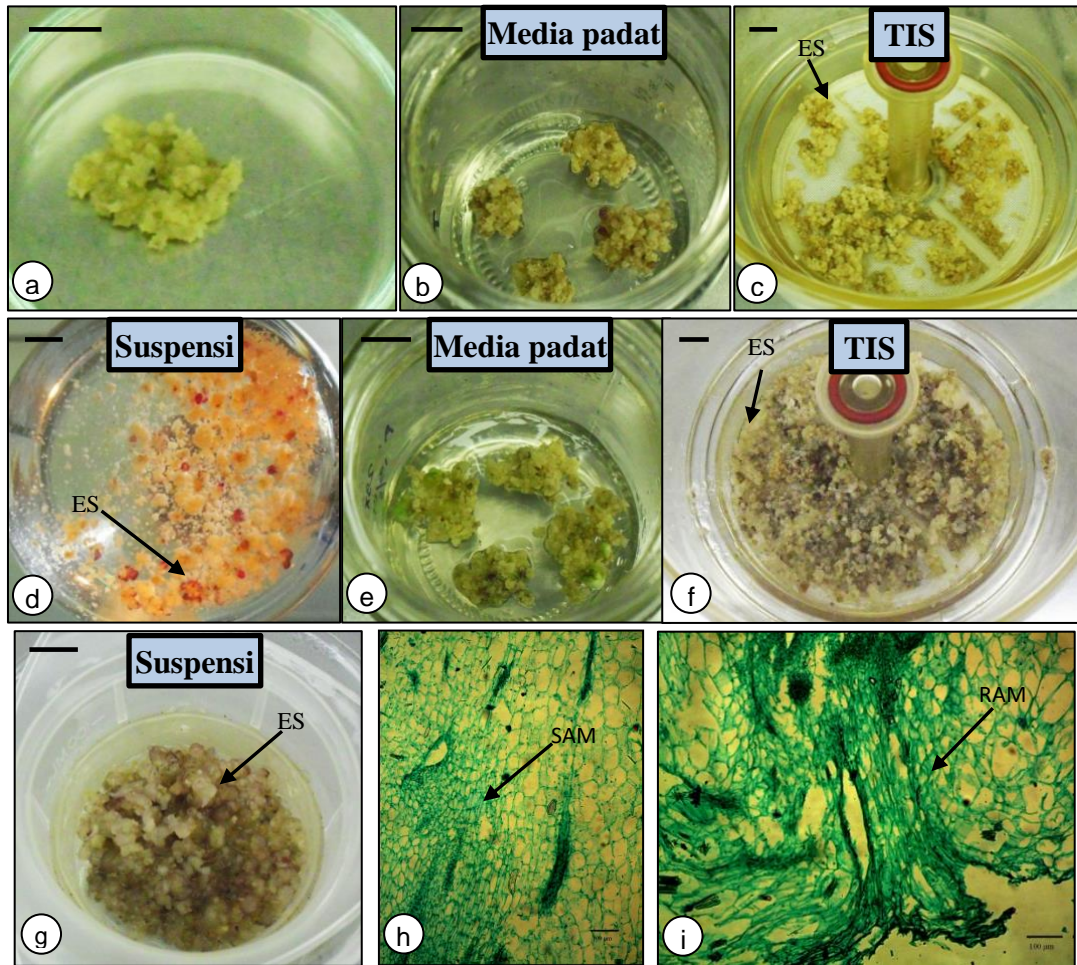
Kultur 12 minggu juga menunjukkan hasil yang sama yaitu lama waktu induksi embrio somatik sagu terbaik dicapai pada perlakuan kultur media TIS dengan media yang ditambah TDZ 1 mg/L + kinetin 0,5 mg/L yaitu 2 minggu. Lama waktu induksi embrio somatik terlambat diperoleh pada perlakuan kultur media padat dengan media tanpa ZPT (5 minggu) yang berbeda signifikan dengan perlakuan lainnya (Tabel 1). berdasarkan data Tabel 1 tersebut terlihat bahwa ketiga metode kultur memerlukan waktu yang berbeda dalam proses induksi embriogenesis somatik sagu, khususnya antara SPS dengan suspensi. Hal ini disebabkan bahan tanam yang dikulturkan berupa kalus embriogenik atau massa proembriogenik (*pro embryogenic mass*) yang apabila dikulturkan pada media dan kondisi yang sesuai akan segera tumbuh dan berkembang berdiferensiasi membentuk embrio somatik. Waktu induksi embrio somatik tanaman berpengaruh pada jumlah perolehan embrio somatik pada periode kultur *in vitro* tanaman (Deo *et al.*, 2010; Mohajer *et al.*, 2012). Hal ini karena semakin cepat terbentuk embrio somatik, maka semakin cepat embrio somatik mengalami proliferasi.

#### Histologi embrio somatik

Eksplan berupa kalus embriogenik (Gambar 4.a) yang dikulturkan mengalami pertumbuhan dan perkembangan selama kultur. Visualisasi embrio somatik pada kultur 6 minggu maupun kultur 12 minggu terlihat hampir sama. Terlihat perbedaan pada ukuran embrio somatik dan kepadatan/penampakan warna pada permukaan embrio somatik. Kultur 6 minggu menunjukkan ukuran sebagian besar embrio somatik lebih kecil dengan warna lebih muda (Gambar 4.b-d). Namun, embrio

somatik pada kultur 12 minggu terlihat berukuran lebih besar dengan warna permukaan embrio somatik lebih kental atau *opaque* (Gambar 4.e-g). Warna embrio somatik yang lebih jelas/kental berwarna putih-kekuningan pada kultur 12 minggu ini menunjukkan tingkat kematangan embrio somatik yang lebih lanjut dibandingkan pada kultur 6 minggu.

Hasil pengamatan histologi menunjukkan bahwa, embrio somatik sagu menghasilkan dua kutub perkembangan (*bipolar*) berupa SAM (*shoot apical meristem*) dan RAM (*root apical meristem*). Preparat embrio somatik yang telah diwarnai (staining) dengan FAA dan Fastgreen menunjukkan adanya SAM dan RAM dengan pengamatan mikroskop Nikon Eclipse model E100 dengan perbesaran 10 X 10 menggunakan software Optilab. Karena posisi SAM dan RAM tidak bisa terlihat dalam satu bidang pandang, maka gambar yang ditampilkan hanya bagian SAM saja (Gambar 4.h-i). Hal ini karena embrio somatik stadium *Scutellar* berukuran lebih besar dan panjang dibandingkan stadium *globular* maupun *elongated* sehingga sulit untuk mendapatkan gambar utuh bagian ujung dan pangkal embrio somatik tersebut dalam satu bidang pandang. Berdasarkan preparat embrio somatik stadium *Scutellar*, terlihat adanya tempat (*spot*) yang menunjukkan SAM maupun RAM dengan ciri-ciri warna yang lebih gelap dengan susunan sel yang lebih padat, rapat dengan ukuran sel yang lebih homogen dan relatif lebih kecil (Gaillochet & Lohmann, 2015). Hasil pengamatan histologi embrio somatik sagu tersebut menunjukkan kecenderungan susunan sel yang sama dengan tanaman kurma cv. Gundila (El Dawayati *et al.* 2012), dan tebu (Alcantara *et al.* 2014).



Gambar 4. Pertumbuhan dan perkembangan kalus sagu menjadi embrio somatik pada ketiga metode kultur: a). Eksplan kalus embriogenik, b). Kultur media padat umur 6 minggu, c). Kultur SPS umur 6 minggu, d). Kultur suspensi umur 6 minggu, e). Kultur media padat umur 12 minggu, f). Kultur SPS umur 12 minggu, g). Kultur suspensi umur 12 minggu setelah disaring, h). Penampang membujur (*longitudinal section*) bagian ujung dan i). Bagian pangkal embrio somatik stadium *scutellar* dengan perbesaran mikroskop 10 X 10. Bar = 1 cm. ES: embrio somatik, SAM : shoot apical meristem, RAM = root apical meristem.

Figure 4. Growth and development of sago palm callus to be somatic embryo at three culture methods: a). Embryogenic callus explant, b). Solid media culture at 6 weeks, c). TIS culture at 6 weeks, d). Suspension culture at 6 weeks, e). Solid media culture at 12 weeks, f). TIS culture at 12 weeks, g). Suspension culture at 12 weeks after filtration, h). Longitudinal section of tip's somatic embryo, i). Longitudinal section of basal's somatic embryo *scutellar* shape with microscop magnification 10 x 10. Bar = 1 cm, SE = somatic embryo, SAM : shoot apical meristem, RAM = root apical meristem.

### Kesimpulan

Kalus embriogenik tanaman sagu mampu berdiferensiasi membentuk embrio somatik pada ketiga metode kultur. Jumlah embrio somatik terbanyak dicapai pada perlakuan metode kultur SPS dibandingkan kedua kultur lainnya. Pemberian TDZ 1 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L dapat mendorong proses diferensiasi kalus membentuk embrio somatik lebih cepat dan lebih banyak. Sistem kultur SPS dengan media yang ditambahkan TDZ 1 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L merupakan kombinasi perlakuan terbaik karena

dapat menghasilkan embrio somatik tertinggi yaitu sebanyak 389,2 buah/bejana.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada PT RPN yang telah membantu pembiayaan penelitian ini melalui Proyek Revitalisasi Sagu. Terima kasih juga disampaikan kepada Laboratorium Mikroteknik, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA IPB serta Laboratorium Mikroteknik, Departemen Biologi, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI atas bantuan dan fasilitasnya untuk proses histologi embrio somatik.



### Daftar Pustaka

- Alcantara GBD, R Dibax, RAD Oliveira, JCB Filho & E Daros (2014). Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. *Acta Scientiarum* 36(1), 63-72.
- Asemota O, CR Eke & JO Odewale (2007). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. *African J. Biotechnol.* 6(20), 2353-2357.
- Bintoro HMD, SS Amarillis, RK Dewi & D Ahyuni (2013). *Sagu, Mutiara Hijau Khatulistiwa yang dilupakan*. Jakarta, Digreat Publishing. 113p.
- Dam A, S Paul & TK Bandyopadhyay (2010). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Limonium sinensis* (Girard) Kuntze. *Scientia Horticulturae* 126, 253-260.
- Deo PC, AP Tyagi, M Taylor, R Harding & D Becker (2010). Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific J. Nat. and App. Sci.* 28, 27-40.
- El Dawayati MM, Ola HAE Bar, ZE Zaid & AFMZ 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. 76p.
- Gaillochet C & JU Lohmann (2015). The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development* 142, 2237-2249.
- Gupta P, S Sharma & S Saxena (2014). Effect of salts (NaCl and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) on callus and on culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. *Appl. Biochem Biotechnol.* 172, 2894-2906.
- Johansen DA (1940). *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Jones MPA, Z Yi, SJ Murch & PK Saxena (2007). Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: micropropagation in solid and liquid culture systems. *Plant Cell Rep.* 26, 13-19.
- Jova MN, Rafael GK & Ernesto EC (2011). Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. 'Pacala Duclos'). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(4), 515-521.
- Kasi PD & Sumaryono (2008). Perkembangan kalus embriogenik sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) pada tiga sistem kultur *in vitro*. *Menara Perkebunan* 76(1), 1-10.
- Mohajer S, RM Taha, A Khorasani & JS Yaacob (2012). Induction of different types of callus and somatic embryogenesis in various explants of Sainfoin (*Onobrychis sativa*). *Australian J. Crop Sci.* 6(8), 1305-1313.
- Mordocco AM, JA Brumbley & P Lakshmanan (2009). Development of a temporary immersion system (RITA) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. Interspecific hybrids). *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 45, 450-457.
- Muñoz M, P Seemann, G Jara & R Riegel (2009). Influence of vessel type, physical state of medium and temporary immersion on the micropropagation of three *Rhodophiala* Species. *Chilean J. Agri. Res.* 69(4), 581-587.
- Murashige T & F Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-479.
- Muruganantham M, S Amutha & 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 TP, Feder N & McCully ME (1965). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59(2), 368-373.
- Riyadi I (2010). Pengaruh kinetin dan BAP terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.). *Jurnal AgroBiogen* 6(2), 101-106.
- Riyadi I & Sumaryono (2009a). Pengaruh interval dan lama perendaman terhadap pertumbuhan dan pematangan somatik tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.). *Menara Perkebunan* 77(2), 94-103.
- Riyadi I & Sumaryono (2009b). Effect of antioxidant on germination of oil palm somatic embryo in liquid culture with temporary immersion system. Pros. Seminar Nas. XVIII Jaringan Kerjasama Kimia Indonesia, p. 29-34.
- Riyadi I, JS Tahardi & Sumaryono (2005). The development of somatic embryos of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) on solid media. *Menara Perkebunan* 69(2), 46-57.

- Rostiwati T, Y Lisnawati, S Bustomi, B Leksono, D Wahyono, S Pradjadinata, R Bogidarmanti, D Djaenudin, E Sumadimangsa & N Haska (2008). *Sagu (Metroxylon spp.) sebagai Sumber Energi Bioetanol Potensial*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan dan Perkebunan. Jakarta. 85p.
- Sumaryono (2007). Tanaman sagu sebagai sumber energi alternatif. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 29(4), 3-4.
- Sumaryono, I Riyadi, PD Kasi & G Ginting (2008). Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in temporary immersion system. *Indonesian J Agri* 1(2), 109-114.
- Tahardi JS (1998). Improvement of oil palm somatic embryogenesis by periodic immersion in liquid medium. In A. Jatmika et al. (eds.) *Proc. Internat. Oil Palm Conf.*, Bali, Indonesia, p 595-601.
- Tahardi JS, NF Sianipar & I Riyadi (2002). Somatic embryogenesis in sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.). In K. Kaimuna et al. (eds.) *New Frontiers of Sago Palm Studies*, Tokyo, Universal Academic Press, Inc. p. 75-81.
- Tarigans DD (2001). Sagu memantapkan swasembada pangan. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 23(5), 1-3.
- Ul-Haq I & MU Dahot (2007). Effect of permanent and temporary immersion systems on banana micro-propagation. *Pak J Bot* 39(5), 1763-1772.
- Verma M & YK Bansa (2014). Effect of a potent cytokinin thidiazuron (TDZ) on *in vitro* regeneration of *Hedychium coronarium* J. Koenig – A Valuable Medicinal Plant. *Int J Rec Biotech* 2(1), 38-44.
- You CR, TJ Fan, XQ Gong, FH Bian, LK Liang & FN Qu (2011). A high-frequency cyclic secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tiss. Organ Cult* 107, 233-242.
- Zhao H, RZ Jia, YJ Zhu, AP Guo, HC Zeng & M Peng (2015). Efficient induction, proliferation and regeneration of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) via somatic embryogenesis. *The J. Animal & Plant Sci* 25(1), 134-140.