

Induksi Kalus dan Regenerasi Beberapa Genotipe Gandum (*Triticum aestivum* L.) secara *In Vitro*

Atmitri Sisharmini*, Aniversari Apriana, dan Sustiprijatno

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: mitri_ss@yahoo.com

Diajukan: 22 Maret 2010; Diterima: 19 Juli 2010

ABSTRACT

Callus Induction and *In Vitro* Plant Regeneration of Wheat Genotypes (*Triticum aestivum* L.). Atmitri Sisharmini, Aniversari Apriana, and Sustiprijatno. Development of a reliable *in vitro* plant regeneration procedure for wheat is a prerequisite for its improvement by genetic transformation. The purpose of this study was to obtain methods of callus induction and regeneration of wheat genotypes. This experiment was conducted at ICABIOGRAD. Immature embryos from four wheat genotypes, ie Perdix, Naxos Wew, Combi and Fasan were used to induce callus formation and regeneration rate of callus. For the preparation of callus induction medium, MS-L7 basal medium was supplemented with combination of growth regulators 2,4 dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram). While, plant regeneration medium was prepared using MS basal medium supplemented with combination of three growth regulators i.e. IAA, BAP and kinetin. The results showed that genotype, *in vitro* culture medium and growth regulators played a dominant role in callus induction and plantlet regeneration. All the 4 genotypes responded positively to callus induction, however, variability was observed not only among the genotypes but also within callus induction medium used. The best induction medium was the MS-L7 basal medium supplemented with combination of phytohormon 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-3) which showed 100% callus induction frequency. Whereas, the best regeneration medium was shown by MS basal medium with combination of phytohormon 1.5 mg/l BAP dan 0.5 mg/l kinetin (RG3). Regarding plant regeneration, Perdix was the most responsive genotype to be regenerated with regeneration frequency of 57.33%. The successfully acclimatized plantlets in greenhouse were obtained from Perdix and Naxos Wew genotypes. These results will potentially facilitate genetic transformation research of wheat in Indonesia.

Keywords: Wheat (*Triticum aestivum* L.), callus induction, plant regeneration, growth regulators.

ABSTRAK

Induksi kalus dan Regenerasi Beberapa Genotipe Gandum (*Triticum aestivum* L.) secara *In Vitro*. Atmitri Sisharmini, Aniversari Apriana, dan Sustiprijatno. Pengembangan metode regenerasi tanaman gandum secara *in vitro* yang dapat diandalkan merupakan salah satu

syarat mutlak yang harus dikuasai dalam penelitian transformasi genetik. Tujuan dari studi ini adalah untuk mendapatkan metode induksi kalus dan regenerasi dari beberapa genotipe gandum. Penelitian ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Embrio belum masak (*immature embryo*) dari empat genotipe gandum, yaitu Perdix, Naxos Wew, Combi, dan Fasan digunakan untuk penelitian induksi kalus dan regenerasinya. Media induksi kalus yang digunakan adalah media dasar MS-L7 dengan penambahan kombinasi hormon tumbuh 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) dan 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram). Sedangkan media regenerasi yang digunakan adalah media dasar MS dengan penambahan kombinasi dari tiga hormon tumbuh, yaitu IAA, BAP, dan kinetin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa genotipe, media kultur, dan hormon tumbuh merupakan faktor dominan yang sangat penting dalam proses induksi kalus dan regenerasi planlet. Eksplan dari semua genotipe mempunyai respon yang sangat baik untuk diinduksi menjadi kalus, namun didapatkan adanya variasi di dalam efisiensi pembentukan kalus baik antar genotipe dan media induksi kalus yang digunakan. Media induksi kalus terbaik adalah media dasar MS-L7 dengan penambahan kombinasi hormon tumbuh MS-L7 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-3) yang menunjukkan efisiensi pembentukan kalus sebesar 100%. Sedangkan media regenerasi terbaik adalah media dasar MS dengan kombinasi hormon tumbuh 1,5 mg/l BAP dan 0,5 mg/l kinetin (RG3). Perdix adalah genotipe yang paling responsif untuk diregenerasikan, dengan frekuensi regenerasi sebesar 57,33%. Planlet yang berhasil diaklimatisasi di rumah kaca adalah genotipe Perdix dan Naxos Wew. Hasil penelitian ini potensial digunakan untuk penelitian transformasi genetik gandum di Indonesia.

Kata kunci: Gandum (*Triticum aestivum* L.), induksi kalus, regenerasi tanaman, genotipe, hormon tumbuh.

PENDAHULUAN

Gandum yang lebih dikenal dengan nama terigu, merupakan tanaman serealia non beras yang kaya akan nutrisi yang diperlukan oleh tubuh. Tanaman ini mempunyai daya saing yang dapat diandalkan dalam bidang diversifikasi bahan pangan. Selain sebagai bahan pangan utama pengganti beras, gandum juga dapat dijadikan sebagai bahan baku berbagai makanan ringan seperti roti, mie, biskuit, es krim, pakan ternak, industri, dan aneka kerajinan. Permintaan pasar untuk

komoditi gandum pada beberapa tahun terakhir ini menunjukkan kenaikan, hal ini dapat dilihat dari naiknya angka impor komoditi tersebut. Naiknya impor gandum mengindikasikan bahwa permintaan pasar terhadap komoditi tersebut juga semakin meningkat, yang berarti peluang untuk pengembangannya di Indonesia semakin besar (Direktorat Jenderal Tanaman Pangan, 2008).

Salah satu upaya untuk perbaikan tanaman gandum, selain melalui pemuliaan klasik dengan persilangan konvensional, dapat juga ditempuh melalui rekayasa genetika. Dengan teknologi ini akan dapat dihasilkan tanaman transgenik dengan sifat yang diinginkan, seperti ketahanan terhadap cekaman biotik (hama dan penyakit), atau toleransi terhadap cekaman abiotik, seperti toleran kekeringan, panas atau suhu dingin.

Dalam rekayasa genetika, penguasaan sistem regenerasi merupakan salah satu kunci utama untuk mendukung keberhasilan proses transformasi. Untuk mendapatkan sistem transformasi genetik yang efisien, sistem kultur jaringan yang efisien dan stabil merupakan salah satu syarat mutlak yang harus dipenuhi, karena efisiensi transformasi sangat tergantung pada kemampuan regenerasi dari genotipe-genotipe yang digunakan (Carsono dan Yoshida, 2006). Dengan kata lain bahwa hal penting yang merupakan syarat mutlak untuk manipulasi genetik tanaman secara *in vitro* adalah kemampuan untuk menumbuhkan sel-sel somatik dalam kondisi steril pada media pertumbuhan dan meregenerasikannya menjadi tanaman utuh (Jimenez, 2001). Ada dua jalur regenerasi tanaman secara *in vitro* yang dapat ditempuh, yaitu melalui jalur embriogenesis dan organogenesis. Jalur embriogenesis mempunyai kelebihan dalam regenerasi tanaman hasil transformasi genetik dibandingkan jalur organogenesis, karena tanaman yang dihasilkan tidak bersifat khimera. Tanaman regenerasi yang dihasilkan melalui jalur embriogenesis berasal dari sel tunggal yang berkembang menjadi struktur embrio dan akhirnya menjadi tanaman lengkap.

Pembentukan kalus yang *regenerable* pada tanaman, pada umumnya sangat tergantung pada genotipe, tipe jaringan, media, dan hormon tumbuh yang digunakan (Bahieldin *et al.*, 2000; Rashid *et al.*, 2002). Selain itu kondisi fisiologis tanaman donor dan pemilihan eksplan yang lebih produktif, seperti embrio masak, embrio belum masak, biji, endosperm, daun, basal tunas, dan ujung akar, juga mempengaruhi regenerasi tanaman gandum secara *in vitro* (Sarker dan Biswas, 2002; Sener *et al.*, 2008). Media MS yang dikembangkan oleh Murashige dan Skoog (1962) merupakan media yang umum digunakan untuk kultur

jaringan gandum. Kombinasi konsentrasi hormon tumbuh yang digunakan dalam media kultur sangat penting untuk menginduksi pertumbuhan dan morfogenesis. Hormon tumbuh 2,4-diclorophenoxyacetic acid (2,4-D) adalah auksin sintetik, yang merupakan salah satu hormon tumbuh yang paling sering digunakan untuk induksi kalus gandum pada konsentrasi 1-2 mg/l (Bahieldin *et al.*, 2000). Selain itu 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) dan 4-amino-3,3,6-trichloropicolinic acid (picloram) juga berhasil dalam menginduksi kalus pada beberapa varietas gandum (Bahieldin *et al.*, 2000; Satyavathi *et al.*, 2004). Pada penelitian Mathias *et al.* (1986) dan Lazer *et al.* (1988), 2,4-D secara sendiri atau yang dikombinasikan dengan sitokinin telah digunakan untuk inisiasi kalus. Perbedaan genotipe juga mempunyai respon yang berbeda terhadap induksi kalus dengan menggunakan berbagai konsentrasi 2,4-D (Elwafa dan Ismail, 1999).

Beberapa keberhasilan penelitian tentang regenerasi gandum telah dilaporkan. Ul Hassan *et al.* (2009) telah berhasil meregenerasikan gandum dengan melakukan modifikasi pada media kultur dengan menggunakan sorbitol sehingga meningkatkan induksi kalus dan regenerasinya. Sedangkan penelitian Rashid *et al.* (2002) menyimpulkan bahwa media N6 yang ditambah dengan auksin dan tanpa sitokinin merupakan media yang paling baik untuk induksi kalus dan regenerasi dan dapat digunakan untuk penelitian transformasi. Sementara itu, Sarker dan Biswas (2002) melaporkan bahwa eksplan embrio belum masak merupakan eksplan yang paling responsif untuk induksi kalus dan regenerasi tunas dibandingkan dengan sumber eksplan lain.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode induksi kalus dan regenerasi dari beberapa genotipe gandum (*Triticum aestivum* L.), yaitu Perdix, Naxos Wew, Combi, dan Fasan, yang selanjutnya dapat digunakan untuk penelitian studi transformasi genetik gandum.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di laboratorium dan rumah kaca pada Kelompok Peneliti Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen) pada tahun 2009.

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah empat genotipe gandum koleksi BB-Biogen, yaitu Perdix, Nexos Wew, Combi, dan Fasan. Untuk kultur *in vitro* gandum digunakan eksplan embrio belum masak yang diisolasi dari biji gandum. Metode regenerasi mengacu pada kombinasi antara metode

Jones *et al.* (2005) dan Sarker dan Biswas (2002) dengan beberapa modifikasi.

Induksi Kalus Embriogenik

Biji gandum yang berumur kurang lebih 20 hari setelah *anthesis* disterilkan dengan merendamnya dalam 70% alkohol selama satu menit, dalam 20% larutan chlorox selama 20 menit dan dibilas enam kali dengan air steril. Biji steril digunakan sebagai eksplan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik. Embrio belum masak disolasi dari biji dengan cara memencet biji dengan menggunakan pinset sampai embrio keluar. Embrio belum masak yang digunakan sebagai eksplan adalah embrio yang berukuran lebih kurang 1 mm dan transparan. Selanjutnya embrio yang terpilih ditanam pada media induksi kalus dengan posisi skutelum menghadap atas. Induksi kalus dilakukan dalam media yang terdiri atas unsur makro MS (Murashige dan Skoog, 1962) dan unsur mikro L7 (Sarker dan Biswas, 2002), dengan penambahan 30 g/l sukrosa, 3 g/l fitagel, dan kombinasi hormon tumbuh 2,4-D dan picloram, dengan pH 5,8. Kombinasi hormon tumbuh dengan konsentrasi yang berbeda-beda merupakan perlakuan, di mana masing-masing kombinasi diindikasikan dengan kode media induksi kalus yang berbeda, yaitu GIK-1, GIK-2, dan GIK-3 (Tabel 1). Kalus yang terbentuk kemudian disubkultur pada media induksi kalus baru untuk menginduksi terbentuknya kalus yang embriogenik.

Regenerasi Kalus

Kalus-kalus embriogenik yang telah diperoleh dari induksi kalus kemudian dipindahkan ke tiga media regenerasi yang berbeda, yaitu RG-1, RG-2, dan RG-3. Komposisi dari media regenerasi terdiri dari media dasar MS dengan penambahan 30 g/l sukrosa, 3 g/l fitagel, 25 mg/l tirosin, dan kombinasi konsentrasi hormon tumbuh BAP, IAA, dan kinetin, dengan pH 5,8 (Tabel 1). Selanjutnya, kultur pada media regenerasi diinkubasikan pada ruang kultur dengan penyinaran 1.000 lux selama 16 jam sehari pada suhu 28°C. Kalus-kalus secara berkelanjutan dipindahkan ke media regenerasi yang baru setiap 2 minggu sekali hingga terbentuk tunas.

Tabel 1. Komposisi hormon tumbuh yang digunakan pada media induksi kalus dan regenerasi.

Media	Kode media	Konsentrasi hormon tumbuh
Induksi kalus	GIK-1	0,5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram
	GIK-2	2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l picloram
	GIK-3	4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram
Regenerasi	RG-1	0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA
	RG-2	0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin
	RG-3	1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin

Induksi Perakaran

Untuk menginduksi pembentukan planlet, tunas ditumbuhkan dalam media perakaran yang terdiri dari media dasar MS, dengan penambahan 30 g/l sukrosa, 3 g/l fitagel, dan 0,5 mg/l IBA dengan pH 5,8 selama dua minggu atau sampai terbentuk akar.

Aklimatisasi

Aklimatisasi dilakukan secara bertahap. Aklimatisasi tahap pertama dilakukan di laboratorium pada suhu 25°C, yaitu dengan menanam planlet selama satu minggu dalam tabung reaksi berdiameter 1,5 cm dan tinggi 15 cm yang berisi 5 ml air. Aklimatisasi tahap kedua dilakukan di rumah kaca pada suhu 28-30°C, yaitu dengan menanam planlet yang bertahan hidup pada aklimatisasi tahap pertama dalam bak plastik ukuran 44 cm x 34 cm x 15 cm yang berisi campuran tanah, pupuk kandang, dan sekam dengan perbandingan 1 : 1 : 1. Planlet yang berhasil bertahan hidup dalam periode aklimatisasi selanjutnya dipindahkan ke dalam pot plastik dengan volume 10 l yang berisi campuran tanah seperti pada bak plastik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

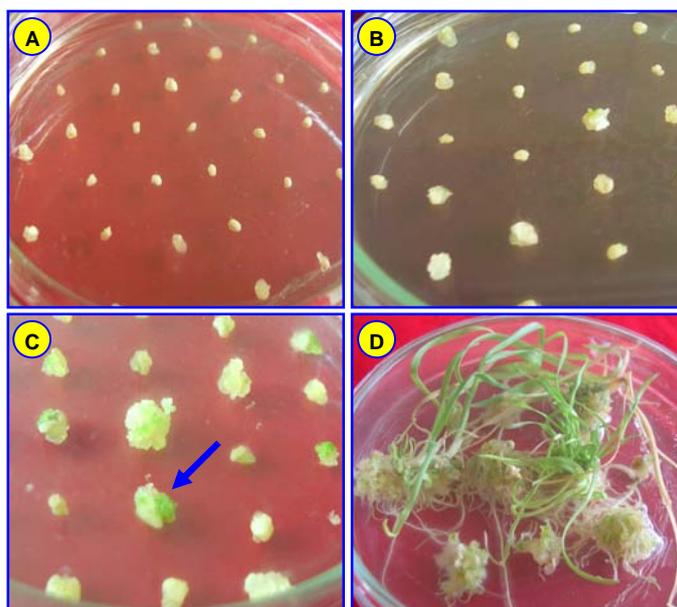
Metode regenerasi tanaman yang efisien dan dapat diandalkan merupakan langkah awal yang sangat penting dan krusial dalam penelitian transformasi genetik pada tanaman. Untuk memperoleh metode regenerasi yang optimal, pada beberapa tanaman sereal termasuk gandum, embrio belum masak telah menjadi eksplan pilihan untuk meregenerasikannya menjadi tanaman secara *in vitro*, yang selanjutnya dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian transformasi genetik. Dari beberapa penelitian, embrio belum masak merupakan eksplan yang paling ideal untuk pembentukan kalus (Lazar *et al.*, 1988; Sarker dan Biswas, 2002). Hal ini dikarenakan kalus-kalus yang didapatkan dari embrio belum masak sangat potensial digunakan untuk regenerasi tunas.

Dalam penelitian ini, eksplan embrio muda dari empat genotipe gandum yang ditanam pada tiga macam media induksi menunjukkan adanya perbedaan respon dalam pembentukan kalus. Perbedaan respon terjadi di antara genotipe gandum maupun pada media induksi kalus yang digunakan. Tahapan pembentukan kalus dan regenerasi tanaman pada gandum secara *in vitro* ditampilkan pada Gambar 1. Pembentukan kalus diawali dengan terjadinya pembengkakan eksplan pada 3-4 hari setelah dikulturkan pada media induksi kalus (Gambar 1A). Selanjutnya, kalus mulai terbentuk pada bagian skutelum pada 7 hari setelah

kultur. Kalus yang terbentuk berwarna putih kekuningan, transparan, dan agak berair (Gambar 1B).

Persentase eksplan yang dapat membentuk kalus (efisiensi pembentukan kalus) bervariasi tergantung pada genotipe dan media yang digunakan, yaitu berkisar antara 44,29-100% (Tabel 2). Perbedaan respon pembentukan kalus sangat diduga dipengaruhi oleh perbedaan genotipe dan komposisi hormon tumbuh yang digunakan. Hormon tumbuh golongan auksin mempunyai peran penting dalam embriogenesis somatik. Auksin yang umum digunakan adalah 2,4-D, di-

camba, dan picloram. Hormon tersebut mempunyai efikasi yang berbeda, tergantung pada spesies tanaman yang digunakan (Wernicke dan Milkowitz dalam Satyavathi *et al.*, 2004). Persentase pembentukan kalus paling tinggi ditunjukkan pada genotipe Combi dan Fasan dengan rata-rata 91,95 dan 95,02%. Pada media dengan komposisi hormon 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-3) persentase pembentukan kalus pada kedua genotipe tersebut menunjukkan 100%, demikian juga pada media dengan 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l picloram (GIK-2) untuk genotipe Fasan (Tabel 2). Se-



Gambar 1. Tahapan induksi kalus dan regenerasi tanaman gandum genotipe Perdix secara *in vitro*. A = embrio belum masak di media induksi kalus dengan kombinasi hormon 0,5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-1), yang mulai menunjukkan adanya pembengkakan eksplan, B = kalus yang terbentuk setelah satu bulan di media induksi kalus dengan kombinasi hormon 0,5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-1), C = bintik-bintik hijau yang mulai muncul di permukaan kalus (ditunjukkan dengan tanda panah) pada media regenerasi dengan kombinasi hormon 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin (RG-3), D = tunas gandum yang muncul dari kalus pada media regenerasi dengan kombinasi hormon 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin (RG-3).

Tabel 2. Induksi kalus dari beberapa genotipe gandum pada tiga media yang berbeda.

Varietas	Media induksi kalus	Jumlah eksplan yang ditanam	Jumlah kalus yang terbentuk	Efisiensi pembentukan kalus (%)
Naxos Wew	GIK-1	302	214	70,86
	GIK-2	254	216	85,04
	GIK-3	266	220	82,71
Perdix	GIK-1	438	194	44,29
	GIK-2	325	195	60,00
	GIK-3	144	81	56,25
Combi	GIK-1	195	156	80,00
	GIK-2	145	139	95,86
	GIK-3	65	65	100,00
Fasan	GIK-1	154	131	85,06
	GIK-2	93	93	100,00
	GIK-3	87	87	100,00

GIK-1 = 0,5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram, GIK-2 = 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l picloram, GIK-3 = 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram.

cara umum pembentukan kalus pada media dengan 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l picloram (GIK-2) dan 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-3) pada semua genotipe yang digunakan menunjukkan persentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan media 0,5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-1). Sedangkan persentase pembentukan kalus paling kecil adalah pada genotipe Perdix dengan media induksi kalus GIK-1. Hal ini diduga berhubungan dengan jenis dan konsentrasi auksin yang digunakan. Menurut beberapa penelitian tentang induksi kalus pada gandum secara *in vitro*, konsentrasi dan jenis hormon tumbuh yang digunakan sangat berpengaruh terhadap kemampuan eksplan atau jaringan untuk membentuk kalus (Baheldien *et al.*, 2000; Rashid *et al.*, 2002; Satyavathi *et al.*, 2004).

Secara visual, ukuran kalus pada media induksi tidak menunjukkan adanya perbedaan di antara genotipe dan media induksi kalus yang digunakan, namun kenampakan kalus menunjukkan adanya perbedaan di antara media yang digunakan. Secara umum, kalus yang terbentuk pada media dengan 0,5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-1) bersifat agak lembek dan sedikit berair, sedangkan pada media 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l picloram (GIK-2) dan 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-3) kalus yang terbentuk agak kompak dan tidak berair (gambar tidak ditunjukkan). Kenampakan dari kalus-kalus pada media 0,5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-1) yang kurang viabel diduga yang menyebabkan rendahnya efisiensi pembentukan kalus itu sendiri (Tabel 2) dibandingkan dengan dua media induksi yang lain. Setelah kurang lebih satu bulan kalus kemudian dipindah ke media regenerasi.

Pembentukan tunas dari kalus pada media regenerasi dimulai dengan terbentuknya bintik-bintik hijau pada kalus. Munculnya bintik-bintik hijau pada kalus dimulai setelah satu minggu ditanam pada media regenerasi (Gambar 1C). Adanya bintik hijau meng-

indikasikan bahwa kalus bersifat embriogenik dan kalus-kalus ini nantinya akan dapat diregenerasikan. Seperti halnya pada pembentukan kalus, persentase pembentukan bintik hijau juga bervariasi antar genotipe dan media regenerasi yang digunakan (Tabel 3). Persentase pembentukan bintik hijau pada kalus berkisar antara 36,5-79,4%. Persentase tertinggi pembentukan bintik hijau pada kalus genotipe Combi pada media regenerasi dengan komposisi hormon 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA (RG-1).

Bintik hijau yang terbentuk selanjutnya akan mulai terdiferensiasi dan berkembang menjadi calon tunas dan calon akar. Tunas kecil akan muncul dan berkembang kurang lebih satu minggu setelah bintik hijau muncul. Namun demikian, tidak semua kalus dengan bintik hijau dapat memunculkan tunas. Pada genotipe Naxos wew dan Perdix, bintik hijau pada kalus dapat membentuk tunas. Sedangkan pada genotipe Combi dan Fasan bintik hijau tersebut mempunyai kecenderungan untuk membentuk struktur akar rambut, dan hanya sedikit yang dapat membentuk tunas. Hal ini diduga berkaitan erat dengan interaksi antara genotipe dan macam hormon tumbuh yang ditambahkan pada media regenerasi tersebut.

Efisiensi regenerasi kalus dari beberapa genotipe gandum dapat dihitung dari persentase jumlah kalus awal yang digunakan dibagi dengan jumlah kalus yang dapat diregenerasikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa efisiensi regenerasi tertinggi diperoleh pada genotipe Perdix dengan kalus yang berasal dari media 0,5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-1) (Tabel 3). Sedangkan pada dua genotipe yang lain, Combi dan Fasan, kalus-kalus yang ditanam pada media regenerasi 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-3) ternyata tidak dapat diregenerasikan. Efisiensi regenerasi dan rata-rata jumlah tunas tertinggi diperoleh pada genotipe Perdix dengan efisiensi regenerasi sebesar 58%

Tabel 3. Regenerasi kalus pada beberapa media regenerasi dari beberapa varietas gandum.

Varietas	Media regenerasi	Jumlah kalus awal	Jumlah kalus dengan spot hijau	Jumlah kalus beregenerasi	Jumlah tunas
Naxos Wew	RG1	199	75 (37,7)	48 (24,1)	62
	RG2	186	81 (43,5)	38 (20,4)	54
	RG3	202	100 (49,5)	55 (27,2)	65
Perdix	RG1	115	65 (56,5)	43 (37,4)	76
	RG2	121	53 (43,8)	44 (36,4)	84
	RG3	115	42 (36,52)	25 (21,74)	70
Combi	RG1	141	112 (79,43)	12 (12,1)	17
	RG2	111	73 (65,8)	3 (2,7)	3
	RG3	105	73 (69,5)	0 (0)	0
Fasan	RG1	113	68 (60,2)	4 (3,5)	4
	RG2	100	59 (59)	0 (0)	0
	RG3	107	43 (40,2)	0 (0)	0

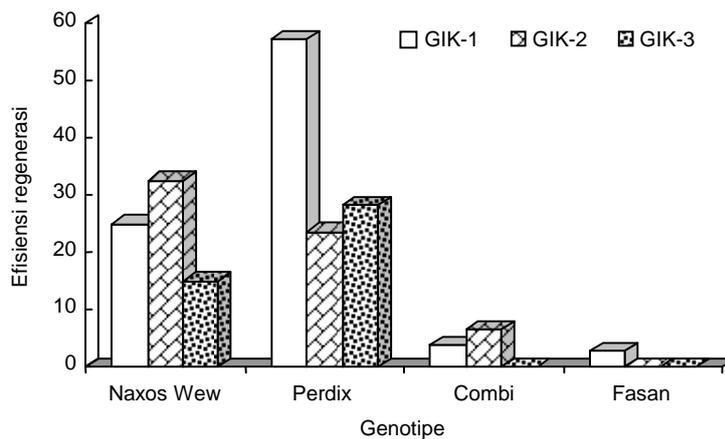
RG1 = 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA; RG2 = 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin; RG3 = 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin. Angka dalam kurung menunjukkan persentase.

dan rata-rata pembentukan tunas sebesar 2,8 dengan jumlah tunas tertinggi mencapai 9 tunas per eksplan (Tabel 3, Gambar 2, dan Gambar 3). Sementara itu, penelitian dari Bohorova *et al.* (2001) mendapatkan efisiensi regenerasi 0-100% dengan 5-20 planlet per embrio yang dikulturkan pada media MS dengan penambahan 0,5 mg/l IAA dan 1 mg/l BA. Hasil yang berbeda ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan genotipe, media, dan hormon tumbuh yang digunakan. Seperti dijelaskan sebelumnya bahwa kemampuan regenerasi suatu tanaman sangat bergantung pada beberapa faktor utamanya adalah genotipe, media, dan hormon yang digunakan (Bahieldin *et al.*, 2000; Rashid *et al.*, 2002).

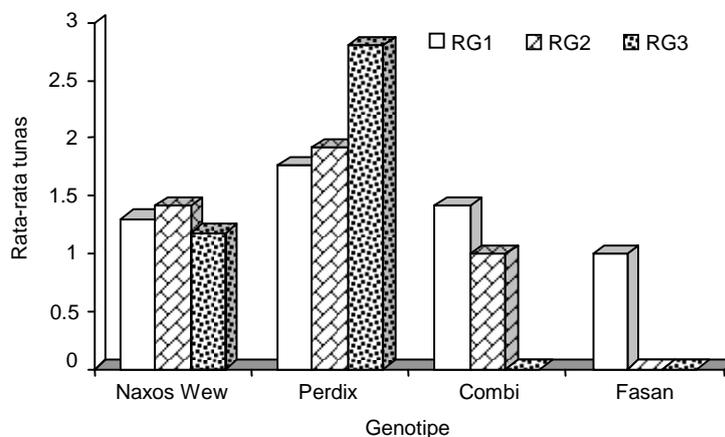
Kalus yang diinduksi pada media regenerasi dengan penambahan kombinasi hormon tumbuh 2,4-D dan picloram (media GIK-1 dan GIK-2) menunjukkan efisiensi regenerasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kalus yang diinduksi dengan 2,4-D saja (GIK-3) (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian He

dan Lazzeri (2001), yang mempelajari tentang pengaruh dua auksin, yaitu 2,4-D dan picloram pada kultur skutelum gandum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan auksin pada media tidak secara nyata mempengaruhi embriogenesis tetapi berpengaruh terhadap regenerasi, di mana kultur yang diinduksi pada media yang mengandung picloram menunjukkan frekuensi regenerasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kultur yang diinduksi dengan 2,4-D. Sedangkan menurut Hassan *et al.* dalam Satyavathi *et al.* (2004), menemukan bahwa picloram secara nyata menghalangi embriogenesis somatik dari embrio masak dan kultur hipokotil gandum, dengan proporsi tanaman yang dapat diregenerasi dari kultur kalus yang diinduksi pada picloram lebih sedikit daripada medium dengan dicamba.

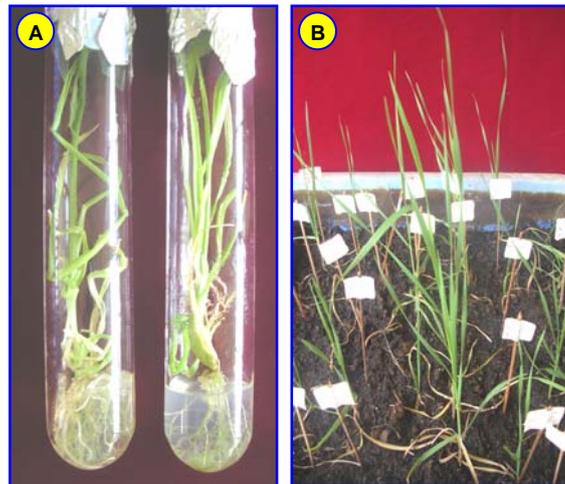
Satu bulan setelah di media regenerasi tunas akan berkembang dan mulai muncul calon-calon akar (Gambar 1D). Pada media regenerasi, sebenarnya akar sudah mulai terbentuk namun sedikit dan belum



Gambar 2. Efisiensi regenerasi dari beberapa media pada beberapa genotipe gandum.



Gambar 3. Rata-rata jumlah tunas dari beberapa media regenerasi pada genotipe gandum.



Gambar 4. Planlet gandum genotipe Perdix pada media perakaran (A) dan tanaman gandum genotipe Perdix berumur 1 bulan yang sudah berhasil diaklimatisasi dan ditanam pada media tanah (B).

kuat, sehingga perlu dilakukan induksi perakaran. Tunas yang muncul di media regenerasi selanjutnya disubkultur di media perakaran untuk membentuk akar yang lebih kuat. Setelah satu minggu di media perakaran MS+ IBA 0,5 mg/l, tunas mulai membentuk akar-akar baru. Dalam waktu kurang lebih dua minggu, tunas sudah cukup membentuk akar yang kuat dan siap untuk diaklimatisasi (Gambar 4A). Planlet yang tumbuh di media perakaran selanjutnya dapat diaklimatisasi. Aklimatisasi tahap pertama dilakukan pada media air, yang dimaksudkan agar planlet beradaptasi terlebih dahulu sebelum dipindahkan ke media tumbuh yang sebenarnya. Aklimatisasi tahap pertama dilakukan selama kurang lebih satu minggu, setelah terbentuk akar-akar baru dan tanaman menunjukkan pertumbuhan yang bagus, selanjutnya tanaman dipindahkan ke media tanam yang berisi campuran tanah, pupuk kandang, dan sekam dengan perbandingan 1 : 1 : 1 (Gambar 4B). Genotipe gandum yang berhasil diaklimatisasi adalah Perdix dan Naxos Wew. Tanaman dipelihara pada rumah kaca dengan suhu 28-30°C. Secara umum tanaman menunjukkan pertumbuhan yang normal, namun vigor tanaman menunjukkan lebih pendek daripada tanaman gandum yang ditanam di dataran tinggi dengan suhu yang lebih rendah seperti di Pacet. Kurang lebih satu setengah bulan setelah diaklimatisasi tanaman gandum mulai berbunga dengan ukuran malai yang lebih pendek. Malai kebanyakan bersifat hampa, dengan jumlah biji isi berkisar antara 1-5 biji /malai.

KESIMPULAN

Dari empat genotipe gandum yang digunakan, semuanya mempunyai respon positif untuk membentuk kalus, namun terdapat variasi respon baik di antara genotipe maupun media induksi kalus yang digunakan. Media induksi kalus yang paling baik adalah media MS dengan kombinasi hormon 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l picloram (GIK-3) yang menunjukkan frekuensi induksi kalus 100% pada genotipe Fasan dan Combi. Sedangkan media regenerasi yang paling baik adalah media MS-L7 dengan kombinasi hormon 1,5 mg/l BAP dan 0,5 mg/l kinetin (RG3). Genotipe yang paling responsif untuk diregenerasikan adalah Perdix dengan efisiensi regenerasi sebesar 57,33%. Genotipe yang berhasil diaklimatisasi di rumah kaca adalah Perdix dan Naxos Wew. Hasil penelitian ini akan sangat membantu untuk penelitian transformasi genetik gandum di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada sdr. Heri Hersusatio dan Nuryati atas bantuan teknis selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahieldin, A., W.E. Dyer, and R. Qu. 2000. Concentration effect of dicamba on shoot regeneration in wheat. *Plant Breed.* 119:437-439.
- Bohorova, N.E., W.H. Pfeiffer, M. Mergoum, J. Crossa, M. Pacheco, and P. Estanol. 2001. Regeneration potential of CYMMIT durum wheat and triticale varieties from immature embryo. *Plant Breed.* 120:291-295.

- Carsono, N. and T. Yoshida. 2006. Plant regeneration capacity of calluses derived seed of five rice genotypes. *Plant Prod. Sci.* 9(1):71-77.
- Direktorat Jenderal Tanaman Pangan. 2008. Rencana Teknis Pengembangan Gandum. Direktorat Budidaya Serealia. Direktorat Jenderal Tanaman Pangan. 42 hlm.
- Elwafa, A.A.A. and A.E.A. Ismail. 1999. Callus induction and plant regeneration from cultures of immature embryos of spring wheat. *Aust. J. Agric. Sci.* 30:13-23.
- He, G.Y. and P.A. Lazzeri. 2001. Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from durum wheat (*Triticum turgidum* var durum Desf.) scutelum and inflorescence cultures. *Euphytica* 119:369-376.
- Jimenez, V.M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13(2):196-223.
- Jones, H.D., A. Doherty, and H. Wu. 2005. Review of Methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods* 1:5.
- Lazer, M.D., T.H.H. Chen, L.V. Gusta, and K.K. Kartha. 1988. Somaclonal variation for freezing tolerance in a population derived from norstar winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 75:480-484.
- Mathias, R.J., K. Fukui, and C.N. Law. 1986. Cytoplasmic effect on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) callus. *Theor. Appl. Genet.* 72:70-75.
- Murashige, T. dan F.A. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:437-497.
- Rashid, H., R.A. Ghani, and Z. Chaudhry. 2002. Effect of media, growth regulator and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology* 1(1):49-54.
- Sarker, R.H. and A. Biswas. 2002. *In vitro* plantlet regeneration and *agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tiss. Cult.* 12(2):155-165.
- Satyavathi, V.V., P.P. Jauhar, and E.M. Elias. 2004. Effects of growth regulator on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. *Crop Sci.* 44:1839-1846.
- Sener, O., E. Can, M. Arslan, and N. Celiktas. 2008. Effect of genotype and picloram concentrations on callus induction and plant regeneration from immature inflorescence of Spring Barley Cultivars (*Hordeum vulgare* L.). *Biotechnol. & Biotechnol. EQ.* 22.
- Ul Hassan, M., Z. Ahmed, M. Munir, S.I. Malik, and K. Shahzad. 2009. Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African J. Biotechnology* 8(23):6529-6535.
-