

Kemampuan Regenerasi Kalus Segmen Akar pada Beberapa Klon Bawang Putih Lokal Secara In Vitro

Devy, N.F. dan Hardiyanto

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika Jl. Raya Tlekung No.1 Junrejo, Batu 65301
Naskah diterima tanggal 27 Desember 2007 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 23 Februari 2009

ABSTRAK. Regenerasi tanaman bawang putih dapat dilakukan menggunakan kalus sebagai bahan. Namun metode ini dapat juga digunakan untuk perbanyakan, terutama pada produksi tanaman bebas virus. Tujuan penelitian ialah memperoleh komposisi media yang sesuai untuk pertumbuhan kalus dan regenerasi beberapa klon bawang putih. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika mulai Maret 2005 sampai dengan Agustus 2006. Rancangan yang digunakan adalah acak lengkap faktorial dengan 2 perlakuan dan 6 ulangan. Induksi kalus dilakukan pada segmen apikal akar bawang putih yang ditanam secara in vitro. Persentase jumlah eksplan yang berkalus cukup tinggi, berkisar antara 70-100% pada media MS+0,2 g/l CH + 1 ppm 2,4 D maupun media MS + 1 ppm 2,4 D + 0,1 ppm IAA. Meskipun demikian, hanya 2 klon yang memberikan respons pertumbuhan dan regenerasi kalus yang lebih baik dibandingkan klon lainnya, yaitu Lumbu Kuning dan Tawangmangu. Pada fase regenerasi menggunakan media MS + 1 ppm kinetin dan MS + 1 ppm IAA + 10 ppm 2-ip, kalus embriolik dari 2 klon tersebut menghasilkan persentase akar yang paling tinggi, masing-masing sebesar 60 dan 70% dengan kisaran jumlah akar/eksplan mencapai 2-6 buah. Jumlah planlet berkisar antara 5-10 buah. Pada fase perkembangan selanjutnya umbi mikro terbentuk sempurna.

Katakunci: *Allium sativum*; Kultur in vitro; Kalus akar; Umbi mikro.

ABSTRACT. Devy, N.F. and Hardiyanto. 2009. **Regeneration Capacity of Callus-derived from Root Segments of Several Local Garlic Clones.** The regeneration of garlic using callus as explants is usually used for breeding program such as genetic transformation activities. However, this method can also be used as propagation method, especially for virus-free planting materials. The experiment was carried out at Tissue Culture Laboratory, Indonesian Citrus and Subtropical Fruit Research Institute from March 2005 to August 2006. The experiment was arranged in a factorial randomized complete design with 2 treatments and 6 replications. The callus induction was derived from garlic apical root segment via in vitro. The percentage of total explants that produce callus was very high (70-100%) on both medium MS+0.2 g/l CH + 1 ppm 2,4 D and MS + 1 ppm 2,4 D + 0.1 ppm IAA. Nevertheless, it was only 2 clones that gave better callus growth and regeneration responses than others, these were Lumbu Kuning and Tawangmangu. On the subculture medium (MS + 1 ppm kinetin and MS + 1 ppm IAA + 10 ppm 2-ip), the percentage of rooted embryogenic callus of both Lumbu Kuning and Tawangmangu were also high, i.e. 60 and 70% respectively with 2-6 roots/explant. Shoots grew as a mass, with total shoots number of 5-10 per a mass. Normal micro bulblets were produced in the next development phase.

Keywords: *Allium sativum*; In vitro culture; Root callus; Micro bulblets.

Teknik perbanyakan in vitro pada bawang dapat diaplikasikan untuk berbagai tujuan, antara lain untuk perbanyakan tanaman secara mikro, mendapatkan tanaman bebas virus, dan perbaikan klon melalui metode mutasi maupun transformasi genetik (Conci dan Nome 1991, Sawahel 2002, Vilma dan Nome 1991, Walkey *et al.* 1987). Pada industri perbanyakan mikro, teknik perbanyakan dengan hanya menggunakan 1 eksplan yang berasal dari 1 umbi dianggap tidak efisien baik dari segi dana maupun waktu. Sehingga dikembangkan teknik penggunaan pucuk akar in vitro sebagai bahan eksplan (Haque *et al.* 1997, Myers dan Simon 1999, Barandiaran *et al.* 1999a, Barandiaran *et al.* 1999b, Fereol *et al.* 2002). Eksplan dapat menumbuhkan tunas

secara langsung atau melalui fase kalus terlebih dahulu. Para peneliti umumnya menghindari fase kalus dengan alasan bahwa selama proses regenerasi kalus terjadi variasi somaklonal. Alasan tersebut ditolak oleh Myers dan Simon (1999) yang menyatakan bahwa dari 513 planlet yang dihasilkan dari eksplan kalus 5 klon bawang putih, tidak terjadi variasi morfologi maupun genetik yang dibuktikan melalui pengujian 5 macam isozim.

Regenerasi planlet yang berasal dari kalus bawang ternyata banyak dimanfaatkan sebagai sumber untuk mendapatkan variasi somaklonal, selain untuk membebaskan tanaman dari virus-virus endemik (Ayabe dan Sumi 2001). Teknologi tersebut juga digunakan pada tahapan kegiatan

dari transformasi genetik. Pertumbuhan kalus yang lambat serta persentase regenerasi pada fase morfogenesis yang kurang memuaskan menjadikan pengembangan teknik ini terbatas (Koch *et al.* 1995). Beberapa penelitian untuk memperbaiki teknik ini telah banyak dilakukan. Luciani *et al.* (2001) melakukan perbanyakan mikro pada 3 klon bawang putih menggunakan komposisi media dasar berbeda, yaitu media MS, BDS, dan BLM yang dikombinasikan dengan 2 konsentrasi hormon pertumbuhan NAA dan BAP. Kim *et al.* (2003) memodifikasi iklim mikro dengan cara mengganti media padat dengan media cair. Perlakuan kombinasi antara media cair dengan metode kultur secara *immersion* menyebabkan kemampuan proliferasi tunas lebih baik dibandingkan metode semi padat maupun metode *raft*. Pada fase pembentukan umbi mikro, inisiasi dan pertumbuhan umbi mikro lebih baik pada kondisi kultur gelap dibandingkan keadaan terang (16 jam pencahayaan/hari). Selain itu, penambahan sukrose sebanyak 11% pada media dasar MS mendorong berkembangnya umbi mikro yang optimal pada umur 9 minggu. Martin-Urdiroz *et al.* (2004) menyatakan bahwa kondisi terang yang diaplikasikan mulai awal kultur tidak berpengaruh terhadap kecepatan pembentukan kalus, tetapi secara nyata berpengaruh terhadap perbaikan kemampuan regenerasi eksplan. Menurut Kajimura *et al.* (2000) penanaman umbi mikro melalui transplanting menghasilkan umbi di lapangan dengan ukuran normal. Pada sistem ini, umbi mikro yang dihasilkan diinkubasikan terlebih dahulu pada ruangan dengan suhu 18-20°C sampai siap tanam pada musim tanam berikutnya.

Tujuan penelitian adalah mendapatkan media yang sesuai untuk pertumbuhan kalus dan regenerasi beberapa klon lokal bawang putih menggunakan eksplan segmen akar dari perbanyakan tanaman secara *in vitro*. Hipotesis ialah bahwa eksplan segmen akar setiap jenis klon bawang putih memberikan respons pertumbuhan yang berbeda pada media yang berbeda baik pada fase induksi kalus maupun pada fase regenerasinya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan

Buah Subtropika mulai Maret 2005 sampai dengan Agustus 2006.

Materi Tanaman

Tanaman bawang yang digunakan ialah 10 klon bawang putih lokal Indonesia, yaitu Lumbu Hijau, Krisik, dan Saigon asal Batu (Jawa Timur), NTT asal Kecamatan Fatuneno (Timor Tengah Utara), Tawangmangu, Sanggah, dan Lumbu Kuning asal Tawangmangu (Jawa Timur), Ciwidey asal Kabupaten Bandung, Sembalun dan Lumbu Kayu asal Sembalun (Nusa Tenggara Barat). Umbi tanaman yang dipakai ialah hasil perbanyakan di KP. Banaran-Batu, Jawa Timur (± 950 m dpl) yang telah melalui masa dormansi (3-4 bulan setelah panen).

Induksi Planlet Secara *In Vitro*

Umbi bawang dikupas dan dibuang daging umbinya dalam *laminar flow* sampai daun bawang tampak. Daun dan dasar umbi bawang disterilkan secara berurutan menggunakan kloroks 15 dan 10% masing-masing 10 dan 5 menit, kemudian dicuci dan dibilas dengan akuades steril sampai 3 kali. Sesudah membuang sisa umbi dan lembaran daun yang ada, dasar batang (ketebalan ± 1 mm) yang terdiri atas meristem dan 2 primordia daun dipakai sebagai bahan eksplan *in vitro*. Eksplan ditanam pada media inisiasi embrio, yang terdiri atas garam basal dan 2x vitamin MS (Murashige dan Skoog 1962) dan 2x FeEDTA ditambah 0,25% sukrose dan 0,7% bacto agar (Navarro dan Juarez 1977). Akar yang tumbuh pada planlet dipakai sebagai bahan eksplan untuk induksi kalus.

Induksi Kalus dari Segmen Akar Secara *In Vitro*

Akar yang tumbuh dari planlet, dipotong ± 1 cm pada bagian apikalnya, kemudian dikulturkan pada media induksi kalus yang terdiri atas 2 macam, yaitu (a) KAB1 : MS + 0,3% sukrose + 0,2 g/l CH + 1 ppm 2.4 D dan (b) KAB2 : MS + 0,3 % sukrose + 1 ppm 2.4D + 0,1 ppm IAA. Kombinasi media ini merupakan pengembangan hasil observasi penelitian yang dilakukan oleh Barandiaran *et al.* (1999 a).

Sebanyak 5 potong akar diletakkan pada media inisiasi kalus/botol. Botol ditutup dengan isolasi transparan dan diinkubasikan pada kondisi gelap selama 8 minggu, di mana setiap 4 minggu

sekali eksplan ditransfer pada medium baru. Pada minggu ke-12, jumlah eksplan yang berkalus diamati. Kalus yang tumbuh disubkulturkan pada media yang sama setiap 4 minggu sekali sampai minggu ke-24 setelah kultur.

Regenerasi Planlet Kalus In Vitro

Pada minggu ke-24, kalus yang tumbuh dipindahkan pada 2 macam media regenerasi (a) M1 : MS + 1 ppm KIN dan (b) M2 : MS + 1 ppm IAA + 10 ppm 2-ip. Setiap 4 minggu sekali dilakukan subkultur pada media yang sama. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah akar/eksplan kalus dan jumlah tunas/eksplan kalus.

Inisiasi Umbi pada Planlet

Kalus yang disubkulturkan pada media M1 dan M2 akan berkembang menjadi kalus embrionik yang ditandai dengan perubahan warna dari putih atau kuning menjadi kehijauan. Kalus embrionik tersebut akan tumbuh menjadi tunas dan berkembang menjadi planlet secara bergerombol (massa) pada suatu eksplan kalus (mempunyai tunas dan akar). Dari massa tunas atau planlet tersebut, akan tumbuh umbi mikro.

Percobaan pada fase induksi kalus dan fase regenerasi dirancang secara acak kelompok dalam pola faktorial 2 faktor. Faktor I adalah macam klon bawang putih (10 klon) dan faktor II adalah macam media (2 perlakuan). Masing-masing perlakuan diulang 6 kali (6 botol) dengan 5 eksplan/botol. Pengamatan dilakukan terhadap persentase eksplan yang tumbuh kalus pada minggu ke-12 setelah kultur. Pada fase inisiasi umbi, pengamatan hanya dapat dilakukan pada 2 klon saja, yaitu Lumbu Kuning dan Tawangmangu disebabkan klon-klon lain tidak mampu berdiferensiasi secara sempurna.

Data dianalisis menggunakan sidik ragam (ANOVA) dengan $\alpha = 5\%$, uji lanjut menggunakan BNT 5%. Sebelum dianalisis, terlebih dahulu data persentase ditransformasi dengan $\arcsin \sqrt{\%}$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus In Vitro

Meristem bawang putih tumbuh dengan baik pada kisaran waktu 3-4 hari setelah kultur. Setelah ± 3 minggu, planlet tumbuh dengan baik, dan akar



Gambar 1. Eksplan segmen akar yang berkalus (*Callus devired from root segment explants*)

yang dihasilkan dapat dipakai sebagai eksplan penelitian ini. Eksplan yang berupa potongan akar bagian apikal pada umur 12 minggu setelah kultur secara umum memberikan respons yang baik pada kedua media. Kalus tumbuh di semua bagian potongan akar, didahului pada daerah pangkal potongan (Gambar 1).

Menurut Martin-Urdiroz *et al.* (2004) induksi kalus umumnya lebih banyak terjadi pada kondisi gelap dibandingkan terang, sedangkan cahaya sangat dibutuhkan pada fase regenerasi tanaman. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Fereol *et al.* (2002), bahwa untuk merangsang pertumbuhan kalus dan mendorong kalus berkembang menjadi kalus embrionik, eksplan dikulturkan pada media inisiasi kalus dan media induksi embrio pada kondisi gelap masing-masing selama 1 dan 2 bulan.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak terjadi interaksi yang nyata antara media dengan klon. Jumlah eksplan akar yang berkalus tertinggi diperoleh pada klon Ciwidey, walaupun demikian secara statistik angka persentase pada klon tersebut tidak berbeda nyata dengan Lumbu Hijau, Lumbu Kayu, Krisik, Sanggah, dan NTT. Persentase jumlah eksplan berkalus tersebut tidak berbeda nyata dengan eksplan klon varietas lain yang hanya menghasilkan eksplan berkalus kurang dari 50%, seperti yang dihasilkan pada varietas Saigon, Tawangmangu, dan Sembalun. Perlakuan media tidak menyebabkan adanya perbedaan respons yang nyata dalam persentase eksplan berkalus (Tabel 1).

Hasil penelitian ini sejalan dengan laporan Barandiaran *et al.* (1999a) bahwa kemampuan

Tabel 1. Rerata persentase eksplan segmen akar yang berkalus pada 12 minggu setelah kultur (The percentage average of root segment producing callus on 12 weeks after culturing)

Klon (Clones)	Rerata persentase eksplan segmen akar yang berkalus (The percentage averages of root segment explant producing callus)
Saigon	47,5 b
Lumbu Kuning	55,55 b
Krisik	70,4 ab
Sanggah	68,9 ab
Lumbu Hijau	90,0 a
Tawangmangu	45,0 b
NTT	67,5 ab
Ciwidey	91,65 a
Lumbu Kayu	88,6 a
Semalun	49,95 b
BNT 5% ^{a)}	23,95
Media (Medium)	
MS + 0.3% sukrose + 0.2 g/l CH + 1 ppm 2.4 D	71,61
MS + 0.3 % sukrose + 1 ppm 2.4D + 0.1 ppm IAA	63,4
BNT 5% ^{a)}	tn ^{**)}

CV = 28,4%

^{a)} data ditransformasi pada Arc Sin $\sqrt{0}$ (transformed data on Arc Sin $\sqrt{0}$)

eksplan akar bawang putih membentuk kalus sangat bergantung pada karakter genetik masing-masing klon. Dari genotip 20 klon bawang yang ditelitinya, hanya kultur eksplan yang berasal dari pucuk akar aksesori Printanor yang memberikan

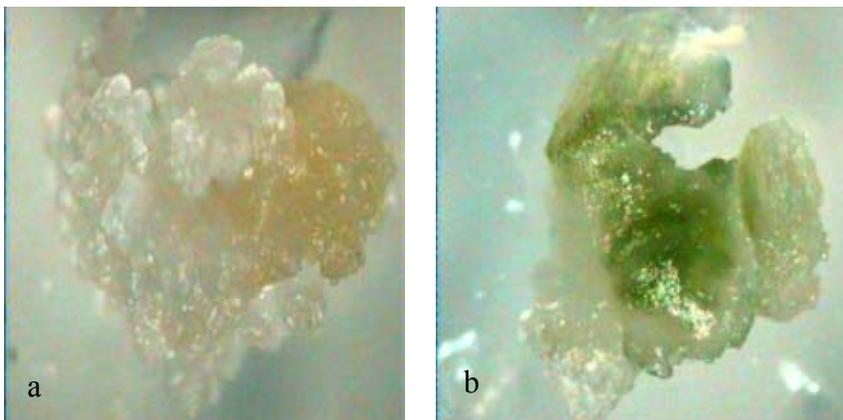
persentase eksplan berkalus tertinggi sebesar 83%.

Selanjutnya kalus berkembang menjadi massa kalus yang berwarna putih, kekuningan, atau kehijauan (Gambar 2a dan 2b).

Menurut hasil penelitian Fereol *et al.* (2002), fase kalus bawang putih yang dihasilkan dalam waktu 2 bulan setelah kultur bervariasi, hiperhidrik, transkulen, berbentuk nodular, dan kekuning-kuningan. Kalus tumbuh pada irisan eksplan akar. Setelah dipindahkan pada media embrio, pada umur 8 minggu hanya kalus nodular yang kekuning-kuningan tumbuh menjadi embrio somatik. Hal ini mengindikasikan bahwa tipe kalus yang demikian adalah kalus embrionik. Pada studi histologi, kalus yang berbentuk nodular dan berwarna kekuning-kuningan mempunyai massa sel yang globular bersifat perifer meristematik, sedangkan pada sel embriogenik mengandung protein cadangan. Daerah sentral dari massa sel tersebut tersusun atas sel-sel yang berdiferensiasi, yang merupakan fase awal diferensiasi dari embrio somatik, sedangkan menurut Haque *et al.* (1997) umumnya kalus yang berwarna kehijauan terbentuk pada media dengan penambahan auksin < 1 μ M, dan tidak ada tunas yang akan tumbuh dari tipe kalus tersebut.

Regenerasi Tanaman dari Kalus In Vitro

Regenerasi kalus menjadi tanaman pada beberapa klon bawang putih Indonesia dimulai dengan pembentukan akar dan diikuti oleh tumbuhnya tunas. Hal ini agak berbeda dengan hasil-hasil penelitian yang telah ada, umumnya



Gambar 2. Kalus yang telah berkembang berwarna putih-kekuningan (a) atau kehijauan (b) (White and yellowish developed callus (a) or greenish (b))

regenerasi akan terjadi pada kalus-kalus yang bersifat embrionik. Tunas (calon daun) akan tumbuh pada embrio-embrio yang telah berkembang diikuti oleh pembentukan akar. Menurut Fereol *et al.* (2002) media yang baik pada pembentukan embrio adalah kombinasi 2.4 D/KIN (0,1/0,3 atau 0,1/0,5 ppm). Embriogenesis dapat terjadi tanpa kombinasi kedua zat tersebut, tetapi kombinasi kedua senyawa tersebut merupakan kombinasi yang optimal untuk mempercepat terjadinya proses regenerasi, sedangkan persentase embrio yang berkembang menjadi tanaman bergantung pada konsentrasi BAP pada media. Tanpa adanya BAP, frekuensi konversi hanya mencapai 15%, sedangkan penambahan 0,3 ppm BAP akan meningkatkan konversi sampai 30%. Dalam kisaran BAP 0-0,5 ppm, tanaman akan berkembang secara normal, tetapi dengan konsentrasi BAP yang tinggi (2 ppm) akan terjadi abnormalitas tanaman, misalnya daun keriting dan berwarna hijau gelap, atau terjadinya tunas ganda.

Untuk merangsang perkembangan tunas, eksplan kalus yang tumbuh pada media inisiasi ditransfer pada media regenerasi. Pada minggu ke-12 setelah kultur pada media tersebut, diperoleh respons pertumbuhan yang ditunjukkan dengan tumbuhnya akar pada eksplan kalus yang dikulturkan. Pada tahapan selanjutnya, tumbuh tunas dari eksplan kalus yang telah berakar (Gambar 3a dan 3b).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa hanya 2 klon dari 10 klon bawang putih yang memberikan respons pertumbuhan yang baik pada media regenerasi, yaitu Lumbu Kuning dan Tawangmangu. Rerata persentase eksplan kalus berakar pada kedua klon tersebut tidak berbeda nyata, masing-masing adalah 66,6 dan 83,3% (Tabel 2).

Rendahnya tingkat regenerasi kalus tersebut diduga disebabkan lamanya eksplan akar dikulturkan pada media inisiasi kalus yang mengandung 2.4 D konsentrasi tinggi (1 ppm). Penggunaan 4,5 µM 2.4 D dilaporkan dapat menghambat regenerasi kalus bawang putih. Selain itu, semakin lama eksplan diekspose pada media tersebut akan meningkatkan instabilitas genetik planlet yang dihasilkan (Myers dan Simon 1999).

Pada klon bawang putih Lumbu Kuning dan Tawangmangu, 4 minggu setelah eksplan kalus

Tabel 2. Ekplan kalus yang berakar pada minggu ke-12 setelah kultur (Rooted callus explant in 12 weeks after culture)

Klon (Clones)	Eksplan kalus yang berakar (Rooted callus explant) %
Saigon	0 b
Lumbu Kuning	66,67 a
Krisik	0 b
Sanggah	0 b
Lumbu Hijau	0 b
Tawangmangu	83,33 a
NTT	0 b
Ciwidey	0 b
Lumbu Kayu	0 b
Sembanun	0 b
BNT 5% [*]	7,62
Media (Medium)	
MS + 1 ppm KIN	13,63
MS + 1 ppm IAA + 10 ppm 2ip	14,22
BNT 5% [*]	tn (ns)**

CV = 15%

berakar terbentuk sejumlah akar/kalus. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa jumlah akar/kalus tidak berbeda nyata pada kedua klon tersebut. Klon Lumbu Kuning dan Tawangmangu masing-masing menghasilkan 3,13 dan 2,74 akar/eksplan kalus. Pada penelitian ini, jumlah akar/kalus tidak berbeda nyata antarperlakuan media. Media M1 dan M2 masing-masing menghasilkan jumlah akar/eksplan sejumlah 2,66 dan 3,21 (Tabel 3).

Tunas yang tumbuh didahului dengan berubahnya warna kalus embrionik dari putih menjadi hijau, kemudian berkembang menjadi tunas dan menjadi planlet yang sempurna. Dalam perkembangannya selama 16 minggu setelah kultur, eksplan kalus tumbuh menjadi tunas secara bergerombol (Gambar 4).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara klon dan media tumbuh. Demikian pula pada perlakuan klon maupun media tidak memberikan jumlah tunas/kalus yang berbeda nyata. Rerata jumlah tunas per kalus yang dihasilkan oleh klon Lumbu Kuning dan

Tabel 3. Jumlah akar/eksplan kalus pada minggu ke-16 setelah kultur (Total roots/explant callus in 16 weeks after cultured)

Klon (Clones)	Jumlah akar/eksplan kalus (Total roots/explant callus)
Lumbu Kuning	3,13
Tawangmangu	2,74
BNT 5%	tn (ns)
Media (Medium)	
MS + 1 ppm KIN	2,66
MS + 1 ppm IAA + 10 ppm 2ip	3,21
BNT 5%	tn (ns)

CV = 36%

Tawangmangu masing-masing sebesar 7,66 dan 7 tunas/eksplan kalus, sedangkan rerata jumlah tunas/eksplan pada perlakuan media M1 dan M2 masing-masing adalah 7,16 dan 7,5 (Tabel 4).

Rendahnya jumlah eksplan/kalus yang tumbuh diduga karena ketidaksesuaian media kultur yang digunakan. Menurut Haque *et al.* (1997) tunas akan menjadi abnormal bila tidak ditransfer kedalam medium yang mengandung ZPT dengan konsentrasi rendah dalam kurun waktu 1 bulan, atau ditumbuhkan pada media yang sama selama 2 bulan, baik dengan maupun tanpa subkultur. Tunas akan berubah menjadi *coiled* dan secara bertahap akan menjadi massa

Tabel 4. Jumlah tunas/eksplan kalus pada minggu ke-16 setelah kultur pada media regenerasi (Total shoots/explant callus in 16 weeks after culture on regeneration medium)

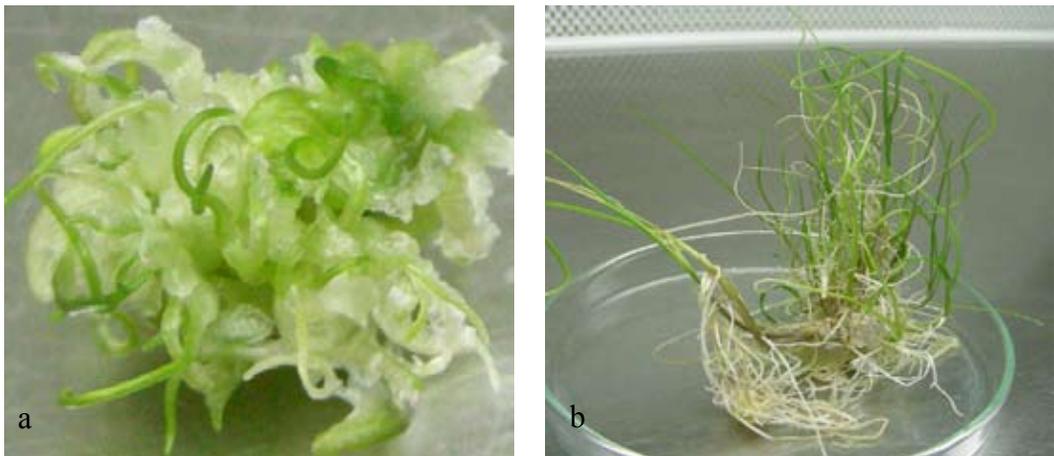
Klon (Clones)	Jumlah tunas/eksplan (Total shoots/explant)
Lumbu Kuning	7,66
Tawangmangu	7,00
BNT 5%	tn (ns)
Media (Medium)	
MS + 1 ppm KIN	7,16
MS + 1 ppm IAA + 10 ppm 2ip	7,50
BNT 5%	tn (ns)

CV = 14.1%

jaringan hijau hiperhidrik. Massa jaringan tersebut tidak dapat berkembang menjadi tunas yang normal. Sebaliknya bila subkultur dilakukan pada media + 0,5 μ M KIN tunas akan tumbuh normal. Selain KIN, penambahan NAA dan BA pada media dapat memperbaiki proses regenerasi kalus menjadi planlet. Kombinasi ZPT 1 μ M NAA dan 10 μ M BA dapat menginduksi 75% dari eksplan menghasilkan tunas. Penggunaan media dasar yang berbeda juga mempengaruhi jumlah regenerasi. Jumlah tunas/eksplan yang dihasilkan dari planlet yang ditumbuhkan pada media dasar MS lebih tinggi dibandingkan yang tumbuh pada media B5 (Media Gamborg *et al.*



Gambar 3. Akar tumbuh dari massa kalus (a), calon tunas tumbuh pada kalus yang telah berakar (b) (Roots grown from a mass of callus (a), shoot grown from rooted callus (b))

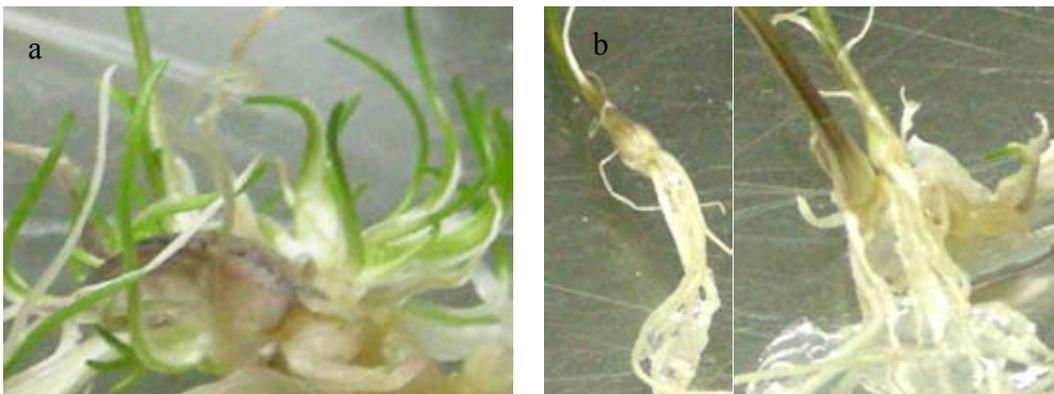


Gambar 4. Tunas yang tumbuh secara bergerombol pada eksplan kalus pada (a) 16 dan 28 minggu setelah kultur (b) (*A mass of shoots that grew on callus explant in 16 and 28 weeks after cultured*)

1968). Dilaporkan bahwa selain media MS padat, media MS cair dengan penambahan 2% sukrose dan 0,5 ppm 2-ip dapat meningkatkan kecepatan perbanyakan dan berat basah tunas pada 3 minggu setelah kultur dibandingkan dengan menggunakan media padat (Kim *et al.* 2003).

Hasil pengamatan visual pada media regenerasi, menunjukkan bahwa umbi mikro tumbuh dan berkembang apabila eksplan yang dikulturkan membentuk tunas dan akar yang sempurna. Umbi ini mulai tumbuh setelah 9-12

minggu eksplan berakar dan tumbuh tunasnya. Jika pada massa/kumpulan tunas yang tumbuh dalam suatu eksplan kalus dibiarkan tumbuh dan berkembang pada media yang sama tanpa dipisahkan satu per satu, maka umbi mikro akan tumbuh dan berkembang pula sejumlah tunas yang ada (Gambar 5a). Namun apabila tunas yang tumbuh pada eksplan kalus dipisahkan satu per satu, umbi mikro akan tumbuh dan berkembang pada tunas tersebut dengan kisaran waktu yang relatif sama (Gambar 5b).



Gambar 5. Umbi mikro yang mulai berkembang pada tunas yang bergerombol (a) dan pada tunas yang telah dipisahkan (b) (*Developed micro bulblets on a shoots mass (a) and on a single shoots (b)*)

KESIMPULAN

1. Interaksi antara media dengan klon tidak memberi pengaruh yang nyata baik pada fase induksi kalus, pada eksplan segmen akar, maupun pada fase regenerasi. Secara terpisah, perlakuan media pada 2 fase tersebut juga tidak berpengaruh nyata baik pada jumlah eksplan segmen akar berkalus, jumlah akar/eksplan kalus maupun jumlah tunas/eksplan kalus.
2. Pada fase induksi kalus, persentase tertinggi akar yang berkalus diperoleh pada klon Ciwidey, sedangkan pada fase regenerasi, hanya eksplan kalus Lumbu Kuning dan Tawangmangu yang memberikan respons pertumbuhan regenerasi yang baik, yaitu dengan jumlah akar serta jumlah tunas/eksplan massa kalus masing-masing parameter berkisar antara 3,0 - 3,13 dan 7,0 - 7,66. Umbi mikro berkembang dengan baik setelah 9 - 12 minggu dari eksplan bertunas dan berakar.

PUSTAKA

1. Ayabe, M., and S. Sumi. 2001. A Novel and Efficient Tissue Culture Method – stem-disc dome Culture for Producing Virus Free Garlic (*Allium sativum* L). *Plant Cell Rep.* 20:503-507.
2. Barandiaran, X., N. Martin, M.F. Rodriguez-Conde, A. Di Pietro and J. Martin. 1999a. Genetic Variability in Callus Formation and Regeneration of Garlic (*Allium sativum* L). *Plant Cell Reports.* 18:434-437.
3. _____ . 1999b. An Efficient Method for Callus Culture and Tunas Regeneration of Garlic (*Allium sativum* L.). *HortSci.* 34(2):348-349.
4. Conci, V.C. and S.F. Nome. 1991. Virus Free Garlic (*Allium sativum* L.) Plants Obtained by Thermotherapy and Meristem Tip Culture. *J. Plant Phytopathol.* 132: 186-192.
5. Fereol, L., V. Chovelon, S. Causse, N. Michaux-Ferriere, and R. Kahane. 2002. Evidence of a Somatic Embryogenesis Process for Plant Regeneration in Garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 21:197-203.
6. Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient Requirement of Suspensions Cultures of Soybean Root Cell. *Exp. Cell. Res.* 50:151.
7. Haque, M.S., T. Wada, and K. Hattori. 1997. High Frequency Shoot Regeneration And Plantlet Formation From Root Tip Of Garlic. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 50:83-89.
8. Kajimura, Y., T. Sugiura, K. Suenaga, Y. Itakura and T. Etoh. 2000. A New Garlic Growing System for Bulbis Through Transplanting. *J. Hort. Sci. and Biotech.* 75(2):176-180.
9. Kim, E.K., E.J. Hahn, H.N. Murthy, and K.Y. Paek. 2003. High Frequency of Shoot Multiplication and Bulblet Formation of Garlic in Liquid Cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 73:231-236.
10. Koch, M., Z. Tanami, and R. Salomon. 1995. Improved Regeneration of Shoots from Garlic Culture. *HortSci.* 30:378-380.
11. Luciani, G. F., P.a. Marinangeli, N.R. Curvetto. 2001. Increasing Nitrate/ammonium Ratio for Improvement of Garlic Micropropagation. *Scientia Horticulturae* 87:11-20.
12. Martin-Urdiroz, N., J. Garrido-Gala, J. Martin and X. Barandiaran. 2004. Effect of Light on the Organogenic Ability of Garlic Roots Using a One-step In Vitro System. *Plant Cell Reports.* 10:55-62.
13. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. Arvised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
14. Myers, J.M and P.W. Simon. 1999. Regeneration of Garlic Callus as Affected by Clonal Variation, Plant Growth Regulators and Culture Conditions Over Time. *Plant Cell Reports* 19:32-36.
15. Navarro, L and Juarez. 1977. Elimination of Citrus Pathogens in Propagative Budwood II. In Vitro Propagation. *Proc. Int. Soc. Citruculture.* 3:973-987.
16. Sawahel, W. A. 2002. Stable Genetic Transformation of Garlic Plants Using Particle Bombardment. *Cellular And Molecular Biology Letters.* 7:49-59.
17. Vilma C. C. and S.F. Nome. 1991. Virus Free Garlic (*Allium sativum* L.) Plants Obtained by Thermotherapy and Meristem Tip Culture. *J. Plant Phytopathol.* 132:186-192.
18. Walkey, D.G.A., M.J.W. Webb, C.J. Bolland, and A. Meller. 1987. Production of Virus Free Garlic (*Allium sativum* L) and Shallot (*A. ascalonicum* L) by Meristem-tip Culture. *J. Hort. Sci.* 62:211-220.