

INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) DENGAN RASIO AMONIUM DAN NITRAT YANG BERVARIASI

Singgih Tri Wardana
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRAK

Penelitian tentang pengaruh rasio amonium (NH_4) dan nitrat (NO_3) yang bervariasi terhadap induksi kalus embriogenik secara *in vitro* pada eksplan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan rasio $NH_4 : NO_3$ yang baik untuk induksi kalus embriogenik bawang putih. Rancangan acak lengkap (RAL) digunakan dalam penelitian ini, dengan perlakuan rasio $NH_4 : NO_3$ yang bervariasi, yaitu ; 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, dan 1 : 5. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rasio $NH_4 : NO_3$ yang bervariasi berpengaruh nyata pada persentase kalus embriogenik dan kalus yang friabel. Persentase tertinggi untuk kalus embriogenik dan kalus yang friabel adalah rasio $NH_4 : NO_3 = 1 : 3$. Kalus embriogenik cenderung berwarna kekuningan dan bertekstur friabel, serta perkembangan embrio somatik yang terbentuk pada stadium globuler.

Kata kunci : Kalus Embriogenik; NH_4 ; NO_3 ; *Allium Sativum* L, Kultur *in Vitro*

PENDAHULUAN

Allium sativum L. (bawang putih) merupakan salah satu komoditi sayuran yang banyak dikonsumsi masyarakat, serta mendapat prioritas untuk dikembangkan karena nilai gizinya dan kandungan senyawa alisin yang dapat dimanfaatkan untuk bahan baku obat-obatan, yaitu sebagai antibiotik dan antitumor.

Perbanyakan tanaman bawang putih tidak dapat dilaksanakan secara

generatif, karena sebagian besar dari tanaman tersebut bersifat steril (Ayabe dan Sumi., 1998). Selama ini perbanyakan tanaman bawang putih dilakukan secara vegetatif, yaitu dengan menggunakan umbi (*bulbus*). Di masa sekarang ini diperlukan efektivitas dalam menghasilkan produk, antara lain dalam usaha untuk mendapatkan bibit tanaman baru dengan jumlah besar dan dalam waktu singkat. Perbanyakan secara konvensional untuk sementara waktu ini masih mampu menanggulangi persoalan tersebut, tetapi sebagai akibatnya adalah

tanaman yang dihasilkan tidak seragam, jumlah produksi yang belum mencukupi kebutuhan, serta penyebaran virus yang tidak terkendali (Ayabe dan Sumi. 1998). Oleh karena itu diperlukan suatu teknologi perbanyak tanaman yang dapat mengatasi kelemahan-kelemahan dari perbanyak tanaman secara konvensional tersebut.

Usaha untuk mengatasi kendala yang dijumpai pada perbanyak secara konvensional tanaman bawang putih adalah dengan teknik kultur *in vitro* yaitu melalui embriogenesis somatik. Menurut Dunstan *et al.* (1995) embriogenesis somatik secara *in vitro* merupakan pilihan perbanyak vegetatif yang tepat, efisien dan lebih praktis untuk perbanyak klonal, karena dapat diperoleh tanaman yang seragam dalam jumlah besar. Hal ini disebabkan karena embrio somatik yang dihasilkan bersifat bipolar seperti embrio zigotik, yaitu calon tunas dan calon akar terbentuk secara bersamaan sehingga tahap perakaran tidak diperlukan.

Perbanyak tanaman melalui embriogenesis somatik secara *in vitro* melalui beberapa tahapan, meliputi tahap induksi kalus embriogenik, pemasakan

(diferensiasi) embrio somatik, dan perkecambahan (organogenesis) embrio somatik (George dan Sherrington, 1984). Faktor yang mempengaruhi embriogenesis somatik termasuk induksi kalus embriogenik salah satunya adalah jenis nitrogen dan konsentrasi nitrogen (Niedz, 1994 ; Higashi *et al.*, 1996).

Di dalam medium yang digunakan untuk kultur *in vitro*, sumber nitrogen terdapat dalam bentuk nitrogen anorganik berupa amonium (NH_4) dan nitrat (NO_3), dan nitrogen organik berupa asam amino (George dan Sherrington, 1984). Penambahan maupun pengurangan konsentrasi nitrogen berpengaruh pada embriogenesis somatik. Penambahan maupun pengurangan konsentrasi NH_4 dan NO_3 pada medium dasar mengakibatkan perubahan rasio antar kedua jenis nitrogen tersebut.

Pengaruh rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ antara lain pada *Medicago sativa* diperlukan 12 mM NH_4 dan 48 mM NO_3 atau rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3 = 1 : 4$ untuk induksi embrio somatik, sedang untuk diferensiasi embrio somatik diperlukan 20 mM NH_4 dan 40 mM NO_3 atau rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3 = 1 : 2$ (Meijer

dan Brown, 1987). Pada *Citrus sinensis* menunjukkan penambahan berat kalus embriogenik yang paling tinggi dengan perlakuan rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3 = 1 : 3$ (Niedz, 1994).

Sampai saat ini belum ada data yang menginformasikan tentang pengaruh rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ terhadap induksi kalus embriogenik bawang putih (*Allium sativum* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ yang bervariasi terhadap induksi kalus embriogenik *Allium sativum* L. secara *in vitro*.

Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah sebagai informasi dasar studi embriogenesis somatik, khususnya pada *Allium sativum* L., dan sebagai alternatif metode perbanyakan klonal *Allium sativum* L.

METODOLOGI PENELITIAN

1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juni sampai Nopember 2002, bertempat di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya Palembang.

2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bawang putih, medium MS, sukrosa, *bacto agar*, 2,4-D, Na hipoklorit, alkohol 95%, spirtus, *aluminium foil*, kertas pH, akuades, kertas payung. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, *hot plate magnetic stirrer*, *laminar air flow cabinet*, autoklaf, erlenmeyer, pinset, skalpel, botol kultur, cawan petri, mikroskop cahaya, mikroskop stereo.

3. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan. Masing-masing perlakuan dengan ulangan 20 kali. Perlakuan-perlakuan dalam penelitian ini disajikan pada tabel 1 sebagai berikut :

Tabel 1. Perlakuan konsentrasi (mM) atau rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ yang bervariasi dalam medium MS yang dimodifikasi untuk induksi kalus embriogenik *Allium sativum* L.

Perlakuan	Konsentrasi Sumber nitrogen (mM)	Konsentrasi (mM) $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$	Rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$	Nitrogen Total (mM)
K (kontrol)	20 mM NH_4NO_3 20 mM KNO_3	20 : 40	1 : 2	60
S1	15 mM NH_4NO_3 30 mM KNO_3	15 : 45	1 : 3	60
S2	12 mM NH_4NO_3 36 mM KNO_3	12 : 48	1 : 4	60
S3	10 mM NH_4NO_3 40 mM KNO_3	10 : 50	1 : 5	60

4. Cara Kerja

Sterilisasi alat : alat-alat yang terbuat dari gelas dan logam dicuci bersih, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas payung, sedang untuk botol kultur dan erlenmeyer ditutup dengan alumunium foil. Semua alat tersebut disterilisasi dalam autoklaf (temperatur 121°C , tekanan 1 atm) selama 20 menit.

Pembuatan medium kultur : Bahan-bahan dasar medium MS ditimbang

dan dilarutkan dalam akuades serta ditambahkan zat pengatur tumbuh sesuai perlakuan (Tabel 1.), kemudian dipanaskan. Medium yang sudah dipanaskan diatur pH nya berkisar 5,6-5,8, kemudian dituangkan kedalam botol-botol kultur. Botol-botol kultur tersebut ditutup dengan alumunium foil lalu disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit.

Sterilisasi eksplan : Sumber eksplan berupa umbi disterilisasi dengan

Na hipoklorit 9 % selama 10 menit kemudian dilanjutkan dengan perendaman dalam alkohol 70 % selama satu menit, dan dicuci dengan akuades steril 3 kali. Selanjutnya umbi tersebut dipotong berbentuk persegi empat dengan ukuran 1 cm secara aseptik, dan digunakan sebagai eksplan.

Penanaman eksplan dan subkultur : eksplan yang telah disterilisasi ditanam dalam botol kultur yang berisi medium induksi kalus embriogenik (Tabel 1.) dengan penambahan 1,5 mg/l 2,4-D. Tiap botol kultur berisi satu potongan eksplan, kemudian ditempatkan dalam ruang inkubasi dengan temperatur 25°C dan penerangan dengan lampu TL 40 w, dan diamati perkembangannya setiap hari secara visual selama 5 minggu.

5. Variabel Pengamatan

Pada penelitian ini digunakan parameter pengamatan secara kuantitatif yaitu kalus embriogenik (%) dan kalus friabel (%).

6. Analisis Data

Data yang bersifat kuantitatif dianalisis dengan Analisis Varian (ANOVA), jika ada perbedaan yang nyata

dilanjutkan dengan uji LSD (Least Significant Difference) pada taraf 5 %.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perbanyakkan tanaman melalui embriogenesis somatik secara *in vitro* melalui beberapa tahapan, meliputi tahap induksi kalus embriogenik, pemasakan (diferensiasi) embrio somatik, dan perkecambahan (organogenesis) embrio somatik. Faktor yang mempengaruhi embriogenesis somatik termasuk induksi kalus embriogenik salah satunya adalah jenis nitrogen dan konsentrasi nitrogen. Hal ini sangat dimungkinkan karena nitrogen berperan sebagai bahan dasar sintesis asam amino, poliamin, dan protein. Raghavan (1997) melaporkan bahwa pada kalus embriogenik terjadi sintesis protein yang lebih tinggi dibanding pada kalus non embriogenik.

Pada penelitian ini digunakan parameter kuantitatif berupa kalus embriogenik (%) dan kalus friabel (%). Hal ini dilakukan supaya syarat dan kebutuhan kalus embriogenik dapat terpenuhi jika akan dilanjutkan pada tahap pemasakan embrio somatik melalui suspensi sel. Selain

itu juga untuk mengetahui potensi awal embriogenesis somatik itu sendiri.

Hasil uji ANAVA menunjukkan bahwa rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ yang bervariasi memberikan pengaruh nyata pada pembentukan kalus embriogenik (%). Rerata kalus embriogenik tertinggi yang ditunjukkan pada Tabel 2. adalah 80 % terdapat pada perlakuan S1, kemudian diikuti berturut-turut pada perlakuan S2 (60%), kontrol (45%), dan S3 (15%).

Hasil uji LSD (Tabel 2) menunjukkan bahwa persentase kalus

embriogenik pada perlakuan S1 berbeda nyata dengan perlakuan kontrol dan S3, tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan S2. Selanjutnya perlakuan kontrol tidak berbeda nyata dengan perlakuan S2, tetapi berbeda nyata dengan perlakuan S3. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa untuk menginduksi kalus embriogenik pada eksplan umbi *Allium sativum* diperlukan keseimbangan nitrogen anorganik berupa rasio amonium dan nitrat ($\text{H}_4 : \text{NO}_3$) 1 : 3.

Tabel 2. Hasil uji LSD rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ yang bervariasi terhadap pembentukan kalus embriogenik dan kalus friabel, umur 5 minggu.

Perlakuan	Rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$	Kalus embriogenik (%)	Kalus Friabel (%)
Kontrol	1:2	45 ^a	90 ^a
S1	1:3	80 ^b	100 ^a
S2	1:4	60 ^{a,b}	85 ^a
S3	1:5	15 ^c	20 ^b

Keterangan : angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ mempengaruhi pembentukan embrio somatik pada kalus, sehingga kalus bersifat embriogenik. Hal

tersebut dapat dijelaskan dengan pendapat Singh *et al* (1999) yang mengatakan bahwa senyawa nitrogen diduga berfungsi sebagai karier, katalis, transporter, atau molekul

pengatur lain dalam proses aktivasi sistem sinyal transduksi yang dapat merubah struktur kromatin, transkripsi atau jalur lain, sehingga gen yang mengkode pembentukan embrio somatik mampu diekspresikan.

Kegunaan nitrogen anorganik berupa NH_4 dan NO_3 pada embriogenesis somatik telah dilaporkan oleh Thorpe (1993) yang menggunakan teknik ^{15}N tracer pada *Daucus carota*. Hasil penelitian Thorpe (1993) menunjukkan bahwa setelah masuk ke dalam sel, maka NH_4 dan NO_3 dapat mengadakan inkorporasi membentuk glutamin, asam glutamat, dan alanin. Selanjutnya pada perkembangan embrio dapat dideteksi terbentuk arginin dan poliamin sebagai hasil inkorporasi asam glutamat, glutamin, dan alanin. Santanen dan Simola (1994) menambahkan bahwa pada kalus embriogenik konsentrasi S-adenosil metionin (SAM) dekarboksilase lebih tinggi dibanding pada kalus non embriogenik. SAM berfungsi antara lain untuk biosintesis poliamin yang diperlukan dalam pengaturan dan perkembangan embrio somatik. Hasil penelitian-penelitian tersebut sangat mendukung mengenai peran

NH_4 dan NO_3 pada pembentukan kalus embriogenik.

Karakteristik kalus embriogenik hasil penelitian ini antara lain mempunyai tekstur friabel (remah), berwarna kekuningan, dan muncul di daerah perifer kalus. Stadium perkembangan embrio somatik yang dapat teramati pada kalus embriogenik ini adalah stadium globuler. Karakteristik kalus non embriogenik dalam penelitian ini antara lain tekstur kalus kompak dan padat, berwarna putih, bentuk tidak teratur, serta pertumbuhannya lambat. Kalus non embriogenik ini terutama dijumpai pada perlakuan S3.

Tekstur kalus yang terbentuk pada penelitian ini dapat dibedakan menjadi dua kriteria, yaitu friabel dan kompak. Hal ini sejalan dengan pendapat George dan Sherrington (1984) yang membagi tekstur kalus menjadi dua kriteria, yaitu kalus yang friabel serta kalus yang kompak dan padat.

Hasil uji ANAVA menunjukkan bahwa rasio NH_4 : NO_3 yang bervariasi memberikan pengaruh nyata pada pembentukan kalus yang friabel (%). Hasil uji LSD (Tabel 2.) menunjukkan bahwa

persentase kalus yang friabel pada perlakuan kontrol, S1, dan S2 tidak berbeda nyata, tetapi masing-masing ketiga perlakuan tersebut berbeda nyata dengan perlakuan S3. Rerata kalus friabel yang tertinggi adalah pada perlakuan S1 yaitu 100%, kemudian diikuti berturut-turut pada perlakuan kontrol (90%), perlakuan S2 (85%), dan perlakuan S3 (20%).

Menurut George dan Sherrington (1984) tekstur kalus yang friabel terdiri atas sel-sel yang tersusun longgar, sedang kalus yang kompak terdiri atas kelompokan-kelompokan sel yang sulit dipisahkan. Hal ini kemungkinan adanya perbedaan jenis maupun komposisi senyawa-senyawa penyusun penebalan dinding sel.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ memberikan pengaruh yang positif pada pembentukan kalus friabel. Hal ini diduga senyawa nitrogen NH_4 dan NO_3 pada rasio tertentu akan memacu sintesis enzim tertentu yang dapat merusak senyawa penyusun penebalan dinding sel. Hal ini antara lain didasari atas hasil penelitian Raghavan (1997) yaitu pada kalus embriogenik yang bertekstur friabel terjadi sintesis protein

yang lebih tinggi dibanding pada kalus non embriogenik yang bertekstur kompak dan padat.

KESIMPULAN

Berdasar hasil penelitian mengenai pengaruh rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ yang bervariasi terhadap induksi kalus embriogenik *Allium sativum* L. secara *in vitro* ini, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ yang bervariasi memberikan pengaruh yang berbeda terhadap persentase kalus embriogenik dan kalus yang friabel.
2. Rasio $\text{NH}_4 : \text{NO}_3 = 1 : 3$ menghasilkan kalus embriogenik dan kalus friabel paling tinggi dibanding perlakuan lain.
3. Kalus embriogenik cenderung berwarna kekuningan dan bertekstur friabel, serta perkembangan embrio somatik yang terbentuk pada stadium globuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayabe, M. dan S. Sumi, 1998.
Establishment of novel tissue

- culture method stem-disc culture and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 17: 773-779.
- Dunstan, D.I., T.E. Tautoris, dan I.A. Thorpe, 1995. Somatic Embryogenesis in woody plant. In: T.A. Thorpe (eds.) *In vitro embryogenesis in plant*. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht. P: 471-540.
- George, E.F. dan P.D. Sherrington, 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetic Limited, England. P: 125-181, 225.
- Higashi, K.H., H. Kamada, H. Harada, 1996. The effect of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involted in the development of somatic embryogenesis in zonal geranium. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45: 109-114.
- Meijer, E.G.M. dan D.C.W. Brown, 1987. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Plant Cell Tiss. Org.Cult.* 10: 11-19.
- Niedz, R.P., 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrat to ammonium nitrogen. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39 : 1-5.
- Raghavan,V., 1997. *Molecular embryology of flowering plants*. Cambridge University Press, New York. P: 467-499
- Santanen, A. dan L.K. Simola, 1994. Catabolism of putrescine and spermidine in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Picea abies*. *Physiologia Plantarum*, 90: 125-129.
- Singh, R.P., S.J. Murch, and P.K. Saxena, Role of nitrogen in morphogenesis in vitro. Science Publisher Inc. USA. P. 205-223.
- Thorpe, T.A., 1993, In vitro organogenesis and somatic embryogenesis : Physiological and Biochemical Aspect. Science Publisher Inc. USA. P 210-211.