

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Morfologi, Habitat, dan Sistematika Padi Ciherang

Beras adalah buah padi (*Oryza sativa* L.) yang berasal dari tumbuhan golongan rumput-rumputan (*Gramineae*). Padi terdiri dari 3 golongan *ecogeographic* yaitu Indica, Japonica, dan Javanica (Ambarwati, 1992). Daerah penyebaran padi Indica adalah Asia tropis, padi Japonica lebih terbatas di daerah subtropis dan Javanica ditanam di Indonesia. Kenampakan ketiga golongan tersebut dapat dicirikan dari morfologi tanaman, daun, batang, gabah, kerontokan dan sebagainya (Ambarwati, 1992). Padi Japonica umumnya berumur panjang, postur tinggi namun mudah rebah, lemmanya memiliki ekor atau bulu, bijinya cenderung membulat, dan nasinya lengket. Padi Indica berumur lebih pendek, postur lebih kecil, lemmanya tidak berbulu atau hanya pendek saja, dan bulir cenderung oval sampai lonjong (Sutaryo dkk., 2008).

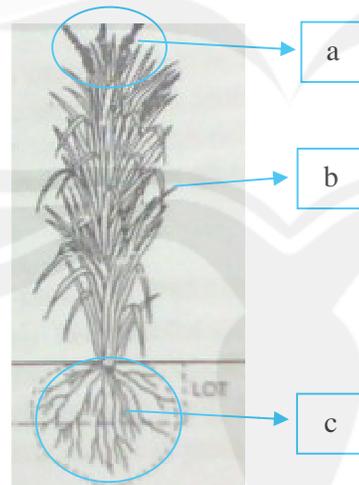
Padi Ciherang termasuk dalam padi Indica. Padi ini merupakan kelompok padi sawah yang sangat cocok ditanam di lahan sawah irigasi dataran rendah. Padi ini dapat ditanam pada musim hujan dan kemarau dengan ketinggian di bawah 500 m dari permukaan laut (BB Padi, 2010). Padi Ciherang merupakan hasil persilangan antara varietas padi IR64 dengan varietas/galur lain. Sebagian sifat IR64 juga dimiliki oleh Ciherang termasuk hasil dan mutu berasnya yang tinggi. Deskripsi perbandingan sifat padi Ciherang dengan padi IR64 dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan Sifat Padi Varietas IR64 dengan Ciherang

Deskripsi	IR64	Ciherang
Bentuk beras	Panjang, ramping	Panjang, ramping
Bentuk tanaman	Tegak	Tegak
Tekstur nasi	Pulen	Pulen
Kadar amilosa (%)	23	23
Rata-rata hasil (t/ha)	5	6
Potensi hasil (t/ha)	6	8,5
Umur tanaman (hari)	110-120	116-125
Tinggi tanaman (cm)	115-126	107-125
Jumlah anakan produktif (batang)	20-35	14-17
Ketahanan terhadap hama	Tahan wereng coklat biotipe 1 dan 2	Tahan wereng coklat biotipe 2 dan 3
Tahun dilepas	1986	2000

( Sumber : BB Padi, 2010 )

Tanaman padi dikelompokkan menjadi 2 bagian yaitu : bagian vegetatif dan generatif. Bagian vegetatif terdiri dari akar, batang dan daun sedangkan bagian generatif terdiri dari malai dan bunga, buah serta bentuk gabah (Aak, 1995). Gambar tanaman padi secara umum dapat dilihat pada Gambar 1.

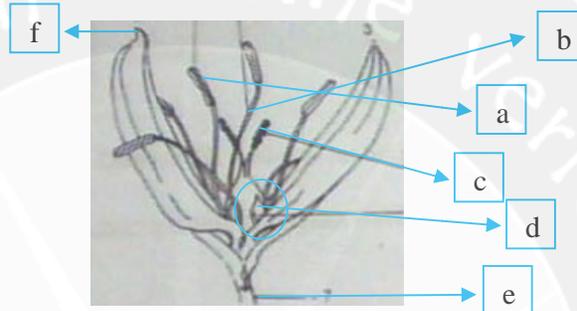


Gambar 1. Tanaman padi (*Oryza sativa* L.)

(Sumber : Aak, 1995)

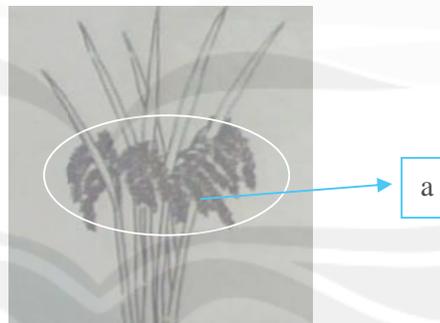
Keterangan : a = bunga padi; b = daun padi; c = akar serabut

Bunga padi merupakan bunga telanjang yang mempunyai 1 bakal buah, 6 benang sari dan 2 tangkai putik. Kumpulan bunga padi yang keluar dari buku paling atas disebut malai. Gambar bunga padi (*Oryza sativa* L.) dapat dilihat pada Gambar 2 dan malai padi (*Oryza sativa* L.) dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 2. Bunga padi (*Oryza sativa* L.)  
(Sumber : Aak, 1995)

Keterangan : a = kepala sari; b = tangkai sari; c = kepala putik; d = lodicula; e = tangkai bunga; f = lemma

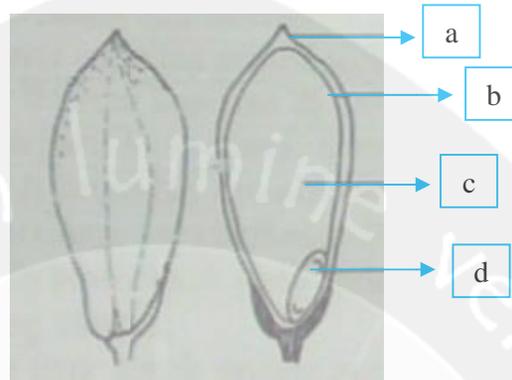


Gambar 3. Malai padi (*Oryza sativa* L.)  
(Sumber : Aak, 1995)

Keterangan : a = malai padi

Buah padi adalah *ovary* yang telah masak, bersatu dengan *lemma* dan *palea*. Biji padi adalah buah padi yang diselubungi oleh sekam/kulit gabah. Di dalam biji terdapat embrio dan endosperm. Pada embrio terdapat daun lembaga dan akar lembaga. Endosperm merupakan bagian dari biji padi yang paling besar. Endosperm mengandung zat gula, lemak, bahan organik atau zat

anorganik serta protein (Aak, 1995). Struktur biji padi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur biji padi (*Oryza sativa* L.)  
(Sumber : Aak, 1995)

Keterangan : a = sekam; b = bekatul; c = endosperm; d = embrio

Ciri morfologi tanaman padi Ciherang, yaitu : padi ini memiliki warna kaki, batang, dan daun berwarna hijau. Permukaan daun agak kasar pada bagian dalam. Posisi daun dan daun bendera tegak. Kulit gabah yang menyelubungi biji padi berwarna kuning bersih. Bentuk gabah panjang ramping. Kerontokan dan kerebahan gabah sedang (BB Padi, 2010).



Gambar 5. Malai padi (*Oryza sativa* L.) cv. Ciherang  
(Sumber : BB Padi, 2010)

Keterangan : a = malai padi

Menurut Tjitrosoepomo (1993), tanaman padi merupakan tanaman semusim dengan kedudukan taksonomi padi yaitu :

Divisi : Spermatophyta  
Kelas : Monocotyledonae  
Bangsa : Poales  
Suku : Poaceae  
Marga : *Oryza*  
Jenis : *Oryza sativa* L.

#### **B. Kultur *In Vitro* dan Manfaatnya**

Kultur *in vitro* merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti sel, sekelompok sel, jaringan, organ, protoplas serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali (Soecipto, 1994). Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), kegiatan kultur *in vitro* memberikan banyak keuntungan. Beberapa keuntungan yang diperoleh dari kultur *in vitro* yaitu :

1. Mendapatkan tanaman baru dalam jumlah yang banyak dengan waktu yang singkat.
2. Mendapatkan tanaman yang unggul (varietas baru) dalam waktu yang singkat.
3. Memperoleh tanaman dengan sifat yang baru misal tahan terhadap konsentrasi garam dan Al yang tinggi.
4. Melestarikan tanaman yang terancam punah.
5. Mendapatkan metabolit sekunder untuk bidang farmasi dan kedokteran.

Menurut Soecipto (1994), langkah kegiatan mikropropagasi secara umum yaitu :

- a) Tahap I : melakukan sterilisasi dan penanaman awal (inisiasi/induksi) dari bahan tanaman pada medium aseptik.
- b) Tahap II : regenerasi tunas agar tumbuh cepat dan jumlahnya berlipat ganda (multiplikasi).
- c) Tahap III : merangsang pengembangan bagian dasar dari eksplan dan memacu pembentukan akar (perakaran). Akar yang kokoh berwarna putih, segar dan tidak layu sudah siap memasuki tahap aklimatisasi.
- d) *Transplanting*/pemindahan dari medium atau lingkungan kultur ke pot merupakan proses adaptasi untuk pengembangan akar agar lebih sempurna pada *green house* sebelum penanaman di lapangan (aklimatisasi).

### C. Sifat Totipotensi Tanaman dan Jaringan Meristem

Prinsip dasar kultur *in vitro* adalah adanya sifat totipotensi yang dimiliki oleh tanaman. Totipotensi merupakan kemampuan setiap sel dari bagian manapun sel tersebut apabila diambil dan diletakan dalam lingkungan yang sesuai akan tumbuh menjadi tanaman yang sempurna (Sunarjono, 2002). Tujuannya untuk membiakkan bagian tanaman dengan ukuran yang kecil menjadi beratus-ratus tanaman kecil (*plantlet*) dan menghasilkan kalus (Wijayani dan Sriyanti, 2006).

Meristem merupakan kelompok sel yang sedang aktif membelah (Zulkarnain, 2009). Beberapa kumpulan dari sel-sel biasa juga bisa terangsang menjadi meristematis yang disebut *meristematoid* yaitu kemampuan menjadi embrionik kembali (Soeryowinoto, 1996). Bentuk sel meristem yaitu kecil, tipis, bentuknya menunjukkan bentuk teratur, inti sel

relatif besar, penuh plasma, ruang sel masih penuh dengan protoplas dan vakuola yang kecil-kecil dan banyak sehingga kelihatan seperti busa. Dinding tipis biasanya terdiri dari dinding primitif yang tersusun atas zat pektin atau protopektin ditambah dengan penebalan dinding primer dari selulose yang masih tipis. Jaringan meristem memiliki sel-sel yang aktif membelah atau diferensiasi membentuk tunas, akar, dan daun (Salisbury dan Ross, 1992).

Berdasarkan letaknya, jaringan meristematik dibedakan menjadi 3 yaitu : (1) meristem apikal (pucuk) terdapat pada bagian ujung batang dan akar tanaman berpembuluh, (2) meristem interkalar terdapat pada berbagai tempat pada tanaman terletak di antara jaringan dewasa berdekatan dengan nodus dan seludang daun, dan (3) meristem lateral terbentuk pada sisi lateral akar atau batang (Santoso dan Nursandi, 2002).

#### **D. Medium Kultur *In Vitro***

Medium merupakan faktor penting dalam kultur *in vitro*. Medium yang digunakan baik bentuk maupun komposisinya dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan yang ditanam. Medium tumbuh yang digunakan dalam kultur *in vitro* dapat berupa medium cair, padat dan semi padat (Wattimena, 1991).

Menurut Gamborg dan Shyluk (1981), medium dasar yang banyak digunakan adalah MS karena komposisi garamnya sesuai untuk morfogenesis, kultur meristem dan regenerasi tanaman. Medium MS memiliki kandungan nitrat dan kalium ( $KNO_3$ ) sebesar 1900 mg/L serta amonium ( $NH_4NO_3$ ) yang

tinggi sebesar 1650 mg/L. Komposisi medium MS dapat dilihat pada Lampiran 1.

Garam-garam anorganik yang digunakan pada medium MS terdiri dari unsur makro dan mikro (Zulkarnain, 2009). Unsur makro adalah unsur yang dibutuhkan tanaman yang cukup besar. Unsur makro yang terdapat pada medium MS yaitu unsur N, P, Ca, Mg, K. Unsur mikro adalah unsur yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah yang kecil. Meskipun unsur mikro dibutuhkan dalam jumlah kecil tetapi tanpa unsur ini tanaman tidak dapat tumbuh normal. Unsur besi yang diberikan dalam bentuk  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . Unsur ini penting untuk menyangga pH medium selama pertumbuhan eksplan (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Penambahan vitamin pada medium dapat mempercepat pertumbuhan dan diferensiasi kalus. Vitamin yang biasa digunakan yaitu tiamin (vitamin B1), asam nikotinat (vitamin B3), dan piridoksin (vitamin B6) (Tomes dkk., 1982). Mioinositol juga biasanya ditambahkan pada medium untuk membantu diferensiasi dan pertumbuhan sejumlah jaringan. Menurut Prawiranata dkk. (1981), mioinositol dapat mendorong pertumbuhan jaringan kalus jika ada auksin, kinetin, dan vitamin. Mioinositol ikut serta dalam beberapa reaksi metabolik penting yang berhubungan dengan pertumbuhan sel. Menurut Anonim (2008), gula berfungsi sebagai sumber karbon dan energi untuk perkembangan eksplan sebab eksplan belum mampu melakukan fotosintesis. Bubuk agar yang ditambahkan pada medium berfungsi sebagai zat yang membuat medium menjadi padat.

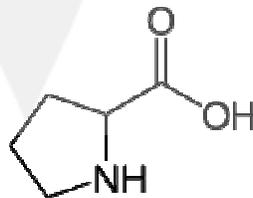
Hasil penelitian Ambarwati (1992) menunjukkan bahwa medium MS ditambah 2,4-D merupakan medium terbaik untuk induksi kalus pada beberapa varietas padi. Pada induksi kalus padi IR64, Towuti, Fatmawati, dan Gajahmungkur menggunakan medium dasar MS + 2,4-D 3 mg/L + CH 3 g/L menghasilkan kalus yang bersifat embriogenik. Penambahan prolin 100 mg/L pada medium induksi kalus padi Fatmawati yang sudah mengandung 2,4-D 3 mg/L menghasilkan kalus dengan diameter lebih besar, warna lebih kuning, dan remah (Lestari dan Yunita, 2008). Induksi kalus beberapa padi cv. Ciherang, Cisadane, IR64 (Indica) dan Taipei 309 (Japonica) menggunakan medium MS + 2,4-D 2 mg/L + CH 3 g/L juga menghasilkan kalus yang remah, globular (terbentuk nodul-nodul), dan berwarna bening (Purnamaningsih, 2006). Induksi kalus padi Chiniguri pada medium MS + 2,4-D 2 mg/L juga menghasilkan kalus yang remah dan berwarna putih (Sikder dkk., 2006).

Medium regenerasi bervariasi untuk tiap varietas padi. Keseimbangan nutrisi dalam medium tumbuh sangat mempengaruhi pertumbuhan kalus maupun diferensiasinya membentuk tunas. Pemilihan ZPT merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan diferensiasi jaringan tanaman yang dikulturkan. Penggunaan kombinasi BA, IAA, dan zeatin pada padi Fatmawati memberikan respon yang baik tetapi pada padi cv. Ciherang, Cisadane, dan IR64 memberikan respon yang kurang baik. Medium MS + IAA 2 mg/L + kinetin 4 mg/L merupakan medium terbaik untuk regenerasi kalus padi Chiniguri dengan hasil kalus bertunas 40% (Sikder dkk., 2006).

Menurut Soepto (1994), asam amino dan N organik seperti L-sistein, L-asparagin, glisin serta asam amino kompleks seperti kasein hidrolisat merupakan sumber N organik yang lebih cepat diambil daripada N anorganik dalam medium yang sama. Beberapa asam amino dan N organik yang umum digunakan untuk kultur *in vitro* tanaman padi adalah prolin, L-glutamin, dan kasein hidrolisat.

#### 1. Prolin

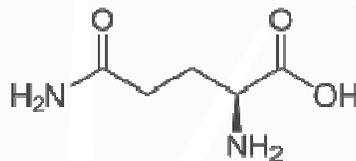
Prolin merupakan salah satu asam amino yang dapat digunakan sebagai sumber N dalam medium kultur *in vitro*. Prolin merupakan asam amino yang banyak digunakan untuk meningkatkan embriogenesis. Kehadiran prolin pada medium kultur dapat menurunkan potensial air, meningkatkan akumulasi unsur-unsur nutrisi pada sel dan meningkatkan embriogenesis (Moghaddam dkk., 2000). Hasil penelitian Lestari dan Mariska (2003) juga menunjukkan bahwa prolin mampu meningkatkan regenerasi tunas pada kalus yang telah diberi perlakuan radiasi sinar gamma. Menurut Thadavong dkk. (2002), medium MS + 2,4-D 2 mg/L + 500 mg/L prolin merupakan medium yang menghasilkan eksplan berkalus  $\pm 96,91\%$  dan rata-rata diameter kalus 6,02 mm pada padi TDK 1 (Indica). Struktur kimia dari prolin dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur kimia prolin  
(Sumber : Hart dkk., 2003)

## 2. L-Glutamin

L-glutamin merupakan salah satu asam amino. Pemberian asam amino glutamin pada medium yang sudah mengandung auksin dapat meningkatkan keberhasilan kalus embriogenik karena di dalam kloroplas, asam amino berperan sebagai prekursor untuk pembentukan asam nukleat dan proses selular lainnya (Gunawan, 1990). Struktur kimia dari L-glutamin dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur kimia L-glutamin  
(Sumber : Hart dkk., 2003)

## 3. Kasein hidrolisat (CH)

CH merupakan sumber N di dalam medium kultur. Penambahan CH ke dalam medium yang mengandung 2,4-D dapat memacu pembentukan kalus embriogenik (Gunawan, 1990). Menurut Vasil dan Vasil (1984), penambahan CH dengan kadar 100-500 mg/L dapat membantu proses induksi kalus suku Graminae. Hasil penelitian Islam dkk. (2005) menunjukkan penambahan CH 4 gr/L pada medium MS yang mengandung NAA 1 mg/L + kinetin 3 mg/L dapat meningkatkan panjang tunas dan perkembangan akar. Sripichitt dan Cheewasestatham (1994) juga melaporkan bahwa medium MS + 2,4-D 2 mg/L + CH 300 mg/L merupakan medium terbaik untuk induksi kalus dari biji padi cv. Khao

Dawk Mali 105 (Indica) dengan hasil 96,3% dan diameter rata-rata kalus 9,4 mm.

#### **E. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)**

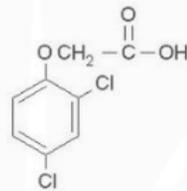
Zat pengatur tumbuh (ZPT) pada tanaman merupakan senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan mengubah proses fisiologis tanaman. Golongan ZPT yang sering digunakan yaitu golongan auksin dan sitokinin. Golongan auksin yang sering digunakan dalam medium yaitu : IAA, 2,4-D, NAA, dan IBA. Golongan sitokinin yang sering digunakan dalam medium yaitu: kinetin, zeatin, benzilaminopurin (BAP) (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Menurut Peter (1995), apabila dalam perbandingan sitokinin lebih besar dari auksin maka hal ini akan memperlihatkan stimulasi pertumbuhan tunas dan daun. Sebaliknya, apabila sitokinin lebih rendah dari auksin maka akan mengakibatkan stimulasi pertumbuhan akar. Apabila perbandingan sitokinin dan auksin berimbang maka pertumbuhan tunas, daun, dan akar akan berimbang pula. Apabila konsentrasi sitokinin sedang dan konsentrasi auksin rendah maka akan terbentuk kalus. ZPT yang umum digunakan adalah :

##### **1. 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D)**

ZPT 2,4-D merupakan golongan auksin yang sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik pada serelia dan berperan dalam memacu hipermethylasi pada DNA agar pembelahan sel selalu dalam fase mitosis sehingga pembentukan kalus menjadi optimal (Meneses dkk., 2005). Hormon 2,4-D mempunyai sifat lebih stabil karena

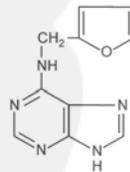
tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel atau saat pemanasan pada proses sterilisasi, lebih tersedia, lebih murah dan paling efektif dalam memacu pembentukan kalus (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Konsentrasi hormon 2,4-D yang paling baik untuk pembentukan kalus yaitu 2 mg/L pada medium MS (Sikder dkk., 2006). Struktur kimia dari 2,4-D dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Struktur kimia 2,4-D  
(Sumber : Hendaryono dan Wijayani, 1994)

## 2. Kinetin

Kinetin merupakan salah satu ZPT golongan sitokinin yang berperan dalam pembelahan sel. Kinetin biasa digunakan dalam kultur *in vitro* untuk induksi kalus dan regenerasi tunas dari kalus yang dilakukan dengan kombinasi auksin yang memiliki konsentrasi rendah (Amasino, 2005). Struktur kimia dari kinetin dapat dilihat pada Gambar 9.

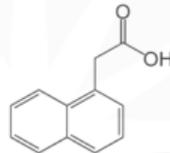


Gambar 9. Struktur kimia kinetin  
(Sumber : Hendaryono dan Wijayani, 1994)

## 3. Naftalen Asam Asetat (NAA)

NAA merupakan salah satu ZPT golongan auksin. Pengaruh auksin terhadap perkembangan sel menunjukkan bahwa auksin dapat

meningkatkan sintesa protein. Adanya kenaikan sintesa protein maka dapat digunakan sebagai sumber tenaga dalam pertumbuhan (Nisa dan Rodinah, 2005). Medium MS + kinetin + NAA merupakan medium regenerasi yang efektif untuk pertumbuhan tunas. Medium MS + kinetin + NAA dapat meningkatkan proliferasi dan pemanjangan tunas pada bawang (*Allium sativa* L.) (Suh dan Park, 1986). Penelitian Saharan dkk. (2004) menunjukkan bahwa medium regenerasi MS + Kinetin 2 mg/L + NAA 0,5 mg/L + prolin 500 mg/L + CH 500 mg/L pada padi Indica cv. HKR-46 menghasilkan kalus bertunas 63,7%. Struktur kimia dari NAA dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Struktur kimia NAA  
(Sumber : Hendaryono dan Wijayani, 1994)

#### F. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kultur *In Vitro*

Keberhasilan pembiakan vegetatif dengan kultur *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain :

##### 1. Eksplan yang digunakan

Pemilihan eksplan tergantung dari tujuan kultur, spesies tanaman yang digunakan serta tipe kultur yang akan diinisiasi. Eksplan yang bisa digunakan pada kultur *in vitro* yaitu pucuk, daun, batang, akar, biji, embrio, bunga, serbuk sari, dan lain-lain (Soecipto, 1994).

## 2. Sterilisasi

Sterilisasi bertujuan memusnahkan semua jenis kontaminan. Sterilisasi dilakukan pada peralatan dan medium yang digunakan untuk menjaga keaseptisan lingkungan kerja sehingga tidak terjadi kontaminasi (Soecipto, 1994).

## 3. Komposisi medium kultur

Medium yang digunakan dan komposisi harus sesuai untuk pertumbuhan eksplan. Medium dapat ditambahkan hormon eksogen yang memacu pertumbuhan eksplan (Wattimena, 1991).

## 4. Kondisi lingkungan

Kondisi lingkungan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan yaitu derajat keasaman (pH), kelembaban, intensitas cahaya, dan suhu. Derajat keasaman yang sesuai untuk pertumbuhan antara 5,6-5,8. Intensitas cahaya yang rendah dapat mempertinggi embriogenesis dan organogenesis. Suhu yang optimal untuk pertumbuhan eksplan berkisar antara 20-30°C (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

## G. Bahan Tanaman (Eksplan)

Menurut Santoso dan Nursandi (2002), bagian tanaman yang umum digunakan dalam kegiatan kultur *in vitro* yaitu :

1. Sel biasanya ditanam dalam bentuk suspensi dengan kepadatan yang telah ditentukan.

2. Protoplas juga biasa ditanam dalam bentuk suspensi dengan kepadatan yang telah ditentukan. Mesofil daun dan kalus adalah bagian tanaman yang umum dipakai sebagai sumber protoplas.
3. Jaringan meristem merupakan jaringan tanaman yang terdapat pada daerah pertumbuhan. Ciri-cirinya yaitu jaringan ini tersusun oleh sekelompok sel yang terus-menerus membelah sehingga belum ada spesialisasi bentuk dan fungsi.
4. Kalus merupakan massa sel yang aktivitas pembelahannya tidak terkendali dan belum terdiferensiasi.
5. Organ merupakan bahan yang paling umum digunakan. Organ yang dapat digunakan meliputi : daun, batang, akar, biji, tunas, kepala sari, dan lain-lain.

Pada umumnya, regenerasi tanaman pada padi menggunakan eksplan berupa biji karena biji memiliki daya regenerasi dan totipotensi yang tinggi (Maggioni dkk., 1989). Biji padi (*Oryza sativa* L.) cv. Ciherang yang akan digunakan sebagai sumber eksplan dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Biji padi dan beras (*Oryza sativa* L.) cv. Ciherang (Sumber : BB Padi, 2010)

Keterangan : a = beras cv. Ciherang; b = biji padi cv. Ciherang yang sudah dipanen

## H. Induksi Kalus

Kalus adalah suatu kelompok sel yang belum terdiferensiasi (Zulkarnain, 2009). Massa sel ini terbentuk pada seluruh permukaan irisan eksplan sehingga makin luas permukaan irisan eksplan maka semakin cepat dan semakin banyak kalus yang terbentuk (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Kalus dapat diinisiasi dari hampir semua bagian tanaman tetapi organ yang berbeda menunjukkan kecepatan pembelahan sel yang berbeda pula. Jaringan-jaringan yang sedang aktif membelah pada awal masa pertumbuhan biasanya merupakan eksplan yang baik. Bagian tanaman seperti embrio muda, hipokotil, kotiledon, dan batang muda merupakan bagian yang mudah untuk diferensiasi dan menghasilkan kalus (Hartman dkk., 1990).

Sel-sel penyusun kalus berupa sel parenkim yang mempunyai ikatan yang renggang dengan sel-sel lain. Dalam kultur *in vitro*, kalus dapat dihasilkan dari potongan organ yang telah steril di dalam medium yang mengandung auksin dan kadang-kadang juga sitokinin. Kalus mempunyai pertumbuhan yang abnormal dan berpotensi untuk berkembang menjadi akar, tunas dan embrioid yang nantinya akan membentuk *plantlet* (Yuwono, 2008).

Induksi kalus dari eksplan pada permukaan medium agar dapat terbentuk dengan baik apabila eksplan diletakan secara horizontal. Akan tetapi, pada suatu sistem yang lain akan menghasilkan kalus yang banyak apabila ditempatkan secara vertikal (Dixon dan Gonzalez, 1993). Untuk mempermudah pertumbuhan sel perlu dilakukan subkultur yaitu penggantian medium lama dengan medium baru dengan interval waktu selama 1 atau 2

minggu. Apabila subkultur terlambat maka dapat terjadi embriogenesis atau kalus berwarna coklat (*browning*) dan pertumbuhan berhenti (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Biasanya struktur kalus menggambarkan daya regenerasi membentuk tunas dan akar. Kalus yang berbentuk globular (nodul-nodul) dan berwarna bening memiliki kemampuan lebih tinggi membentuk tunas (Purnamaningsih, 2006). Beberapa kalus ada yang mempunyai struktur yang keras dan kompak. Namun ada kalus yang tumbuh terpisah-pisah menjadi bagian-bagian yang kecil, kalus ini dikenal dengan kalus remah (George dan Sherrington, 1984). Kalus yang baik untuk regenerasi tanaman yaitu kalus yang bersifat embriogenik. Kalus embriogenik memiliki ciri yaitu berwarna putih kekuningan, mengkilat dan remah (mudah dipisahkan membentuk fragmen). Kalus non-embriogenik memiliki ciri yaitu berwarna kuning kecoklatan, agak pucat dan lembek berair sehingga sulit dipisahkan. Kemampuan kalus untuk membentuk tunas selain dipengaruhi adanya ZPT maka ukuran kalus yang dipindahkan ke medium regenerasi juga menjadi faktor penentu. Kalus dengan ukuran 3-4 mm merupakan eksplan terbaik untuk diregenerasikan (Lestari dan Yunita, 2008).

Pada tanaman jenis monokotil, ZPT golongan auksin dengan konsentrasi 1-10 mg/L berperan dalam menghambat proses diferensiasi sel sehingga pembentukan organ dapat dihambat dan hanya menghasilkan kalus. ZPT 2,4-D merupakan golongan auksin yang sering digunakan untuk

menginduksi pembentukan kalus embriogenik pada serelia (Meneses dkk., 2005).

### **I. Regenerasi Tanaman**

Regenerasi tanaman melalui kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Jalur organogenesis melalui pembentukan langsung eksplan sedangkan embriogenesis somatik melalui pembentukan embrio somatik. Jika dibandingkan dengan embriogenesis, organogenesis mempunyai keuntungan yaitu peluang terjadinya mutasi lebih kecil, metode lebih mudah, dan tidak memerlukan subkultur berulang sehingga tidak menurunkan daya regenerasi dari kalus (Purnamaningsih, 2006).

Jalur organogenesis ada 2 macam yaitu organogenesis langsung dan tidak langsung. Pada organogenesis langsung, tunas dapat terbentuk dari potongan organ seperti daun atau batang sedangkan pada organogenesis tidak langsung, tunas terbentuk melalui tahapan pembentukan kalus. Proses yang terjadi dalam organogenesis meliputi respon sel somatik terhadap zat pengatur tumbuh diikuti dengan inisiasi dan perkembangan tunas baru dari sel yang respon (Zhang dan Lemaux, 2004).

Pada organogenesis tidak langsung, jika kalus sudah berhasil tumbuh maka kalus harus dipindah ke dalam medium tertentu yaitu medium diferensiasi. Medium diferensiasi digunakan untuk mendiferensiasikan kalus agar tumbuh menjadi tunas dan akar (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Tanda bahwa kalus yang diregenerasikan dapat membentuk tunas antara lain

terjadinya perubahan warna dari kecoklatan atau dari kuning menjadi putih kekuningan selanjutnya kehijauan (Lestari dan Yunita, 2008).

#### **J. Tunas**

Tunas adalah pembentukan massa sel yang sudah berdiferensiasi, berwarna hijau dan bersifat *viable* (hidup) (Winata, 1992). Tunas merupakan bagian tumbuhan yang baru tumbuh dan berada di atas permukaan tanah yang terdiri dari batang, daun, dan bunga. Biasanya pada ujung tunas terdapat kuncup terminal yang merupakan titik pertumbuhan utama tunas (Campbell dkk., 2003).

Pertumbuhan suatu tanaman meliputi tumbuh dan berkembang (diferensiasi) sel-sel atau jaringan, biasanya proses tumbuh dan diferensiasi berjalan bersama selama pertumbuhan. Pada kultur *in vitro* dapat diamati proses pertumbuhan berupa pembentukan massa sel yang sudah berdiferensiasi yang disebut tunas (Winata, 1992). Morfologi tunas yang baik memiliki ciri yaitu pertumbuhan batang normal, warna hijau, terbentuk tunas relatif banyak (Hughes, 1981) dan sifat kelunakkan tunas agak lunak.

#### **K. Akar**

Akar adalah bagian tanaman yang berfungsi menyerap air dan zat makanan dari dalam tanah yang kemudian diangkut ke bagian atas tanaman. Pada benih yang sedang berkecambah akan timbul calon akar maupun calon batang. Calon akar mengalami pertumbuhan ke arah bawah sedangkan calon batang akan tumbuh ke atas sehingga terbentuk batang dan daun. Semakin bertambahnya umur semua organ tanaman termasuk akar akan mengalami

pertumbuhan dan perkembangan. Pertumbuhan akar dimulai dari proses perkecambahan benih. Mula-mula akar dari benih yang berkecambah hanya berupa akar pokok kemudian setelah 5-6 hari berkecambah akan tumbuh akar serabut. Bagian akar yang masih muda biasanya berwarna putih sedangkan bagian akar yang telah dewasa akan tampak berwarna coklat. Bagian ujung akar biasanya berbentuk runcing untuk memudahkan akar menembus tanah (Aak, 1995).

#### **L. Hipotesis**

1. Suplemen organik yang optimal untuk induksi kalus dan regenerasi tunas dari kalus biji padi (*Oryza sativa* L.) cv. Ciherang yaitu CH 300 mg/L dan prolin 500 mg/L.
2. Suplemen organik mempengaruhi morfologi kalus biji padi (*Oryza sativa* L.) cv. Ciherang, yaitu berupa kalus berwarna kuning dan remah.
3. Suplemen organik mempengaruhi morfologi hasil regenerasi tunas dari kalus biji padi (*Oryza sativa* L.) cv. Ciherang, yaitu berupa *spot* berwarna hijau, terbentuk tunas, daun dan akar.