

Pengaruh Penambahan Inhibitor Etilen dan Senyawa Antioksidan terhadap Regenerasi Kalus Padi Mentik Wangi Susu

Wahyu Indra Duwi Fanata^{1,2*}, Dedi Edo Setiawan¹,
dan A'idah Mar'atus Sholikhah¹

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember
Jl. Kalimantan 37 Jember, Kampus Tegalboto, Sumbersari, Jember 68121

²Center for Development of Advanced Science and Technology (CDAST) Universitas Jember
Jl. Kalimantan 37, Kampus Tegalboto, Sumbersari, Jember 68121

*Email: wahyuindra.faperta@unej.ac.id

INFO ARTIKEL	ABSTRACT/ABSTRAK
Diterima: 28-01-2022 Direvisi: 10-08-2022 Dipublikasi: 12-08-2022	The Effect of Additional Inhibitor Ethylene and Antioxidant Compounds on Regeneration of Mentik Wangi Susu Rice Callus
Keywords: Antioxidant, Callus, Ethylene inhibitor, Shoot regeneration	Mentik Wangi Susu rice callus has the low shoot regeneration rate due to its high callus browning rate in regeneration media. Callus browning is triggered by the high accumulation of ethylene and phenol during in vitro culture. Our study was aimed to compare the efficacy between ethylene inhibitors and antioxidants for reducing callus browning and increasing shoot regeneration of Mentik Wangi Susu rice callus. The treatments were conducted by supplementing all tissue culture media with ethylene inhibitors (putrecine or silver nitrat) or antioxidants (polyvinylpyrrolidone or ascorbic acid) in several concentrations. The collected data were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) and Honestly Significance Diffirence (HSD) if there were significant differences between the treatments. Our results showed that the browning level of Mentik Wangi Susu callus could only be significantly suppressed by adding polyvinylpyrrolidone to the regeneration media. Moreover, 0.3 g/l polyvinylpyrrolidone and 10 mM putrescine treatments resulted 47% and 41% of shoot regeneration, respectively, which were highest among other treatments. Therefore, polyvinylpyrrolidone and putrescine are the best antioxidant and ethylene inhibitor, respectively, to increase shoot regeneration of Mentik Wangi callus.
Kata Kunci: Antioksidan, Kalus, Inhibitor etilen, Regenerasi tunas	Kalus padi Mentik Wangi Susu memiliki tingkat regenerasi tunas yang rendah karena tingkat pencokelatan kalus yang tinggi dalam media regenerasi. Pencokelatan kalus dipicu oleh tingginya akumulasi etilen dan fenol selama kultur in vitro. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efikasi antara inhibitor etilen dan antioksidan dalam mengurangi pencokelatan kalus serta meningkatkan regenerasi tunas pada kalus Mentik Wangi Susu. Perlakuan dilakukan dengan melakukan penambahan inhibitor etilen (putrecine atau perak nitrat) atau antioksidan (polyvinylpyrrolidone atau asam askorbat) dengan konsentrasi yang berbeda ke semua media kultur jaringan. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan <i>Analysis of Variance</i> (ANOVA) dan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dilakukan apabila antar perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata. Hasil penelitian menunjukkan tingkat pencokelatan kalus Mentik Wangi Susu hanya dapat dihambat secara nyata melalui penambahan polyvinylpyrrolidone ke dalam media regenerasi. Selain itu, perlakuan polyvinylpyrrolidone 0,3 g/l dan putresin 10 mM menghasilkan

regenerasi tunas masing-masing sebesar 47% dan 41%, yang tertinggi di antara perlakuan lainnya. Oleh karena itu, polyvinylpyrrolidone dan putresin masing-masing merupakan antioksidan dan inhibitor etilen terbaik untuk meningkatkan regenerasi tunas kalus Mentik Wangi Susu.

PENDAHULUAN

Kultur jaringan tanaman merupakan salah satu perangkat utama bioteknologi untuk menunjang proses transformasi genetik pada tanaman. Teknik kultur jaringan didasarkan pada pemanfaatan sifat totipotensi sel tanaman. Efisiensi kultur jaringan sangat menentukan keberhasilan transformasi genetik untuk menghasilkan tanaman transgenik (Sisharmini dkk., 2018). Keberhasilan kultur jaringan ditandai dengan berhasilnya proses pembentukan dan tumbuh baiknya tunas dari eksplan yang ditanam pada media *in vitro* (Damayanti dkk., 2007). Pada tanaman padi keberhasilan transformasi genetik sangat dipengaruhi oleh jenis padi yang digunakan. Padi subspecies *japonica* dan *javanica* memiliki tingkat efisiensi transformasi genetik lebih tinggi daripada padi subspecies *indica* karena kalus padi subspecies *japonica* dan *javanica* mempunyai daya regenerasi lebih tinggi (Sahoo *et al.*, 2011).

Jenis padi yang berpotensi untuk dijadikan objek transformasi genetik yaitu subspecies *javanica* seperti padi varietas Mentik Wangi Susu karena memiliki tingkat induksi kalus serta pembentukan spot hijau yang tinggi. Padi varietas Mentik Wangi Susu memiliki persentase induksi kalus dan pembentukan spot hijau sebesar 97% dan 100%, namun memiliki tingkat regenerasi sebesar 8,74% pada media 2,4 D karena pada masa regenerasi kalus mengalami pencokelatan (*browning*) (Maulidia & Fanata, 2019).

Pencokelatan pada kalus merupakan salah satu penyebab dari rendahnya tingkat regenerasi sehingga kalus tidak mampu menjadi planlet dan mengalami kematian (Lisdyananti *et al.*, 2019). *Browning* pada kalus disebabkan karena adanya aktifitas etilen. Akumulasi etilen pada sel kalus akibat tingginya kandungan auksin endogen menyebabkan munculnya pencokelatan pada kalus (Humaira & Amien, 2020). Selain karena aktifitas biosintesis etilen, pencokelatan pada kalus disebabkan karena tingginya akumulasi senyawa fenolik (Dubravina *et al.*, 2005). Meningkatnya senyawa fenolat pada pencokelatan dalam kultur jaringan diikuti oksidasi oleh aktivitas enzim

Polyphenol oxidase (PPO) serta enzim *Phenylalanine ammonia-lyase* (PAL) akibat luka pada pemotongan jaringan yang memacu stress (Tabiyeh *et al.*, 2006). Proses pencokelatan tersebut dapat dicegah dengan menambah senyawa inhibitor etilen seperti senyawa poliamin putrescine dan perak nitrat serta penambahan senyawa antioksidan seperti polyvinylpyrrolidone (PVP) dan asam askorbat (Dewi *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2009; Guntur *et al.*, 2019).

Pemberian putrescine dengan konsentrasi 10^{-3} M juga dapat meningkatkan regenerasi kalus sebesar 35% pada anthera hasil persilangan padi Taipei dan Asemendi (Dewi & Purwoko, 2008). Senyawa perak nitrat (AgNO_3) dalam kultur jaringan berfungsi untuk menghambat aktifitas etilen yang menyebabkan pencokelatan pada eksplan atau kalus (Kumar *et al.*, 2007). Penambahan polyvinylpyrrolidone pada media kultur jaringan telah dilaporkan dapat mengontrol oksidasi senyawa fenolik dan mengurangi pencokelatan pada kultur jaringan tebu dan kiwi (Shimelis *et al.*, 2015; Chai *et al.*, 2018). Penambahan asam askorbat pada media kultur jaringan dapat mengurangi pencokelatan pada kultur jaringan pisang dan kale (Ngomuo *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2019).

Penjelasan di atas menunjukkan bahwa pemberian senyawa inhibitor etilen putrescine dan perak nitrat (AgNO_3) dan penambahan senyawa antioksidan (polyvinylpyrrolidone dan asam askorbat) memiliki efek untuk menghambat aktifitas etilen dan fenol yang dapat menyebabkan pencokelatan pada kultur jaringan. Pengendalian pencokelatan yang efektif merupakan kunci keberhasilan kultur jaringan. Belum adanya data mengenai peningkatan regenerasi kalus pada kultur jaringan melalui penghambatan aktifitas etilen dan fenol pada padi varietas Mentik Wangi Susu. Penelitian ini ditujukan untuk menginvestigasi pengaruh penambahan senyawa inhibitor etilen (putrescine dan perak nitrat) dan antioksidan (polyvinylpyrrolidone dan asam askorbat) dengan beberapa konsentrasi yang berbeda terhadap tingkat regenerasi padi Mentik Wangi Susu.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Center for Development of Advance Sciences and Technology (CDAST) Universitas Jember pada bulan Agustus 2021 sampai bulan November 2021. Alat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan peralatan standar dalam laboratorium kultur jaringan dan molekuler antara lain *Laminar Air Flow* (LAF), magnetic stirrer, timbangan analitik, pH meter, autoklaf, pinset, gunting, micropipet, bunsen, inkubator, mesin sentrifuge, *hand sprayer*, korek api, alat pengupas biji, *glass ware* (gelas ukur, beaker glass, erlenmeyer dan petridish) kamera dan alat tulis. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu benih padi Subspesies Javanika (varietas Mentik Wangi Susu), putrescine, perak nitrat (AgNO_3), glutamin, kasein, proline, gellan, aquadest, kertas saring, sigma N6 salt, zat pengatur tumbuh 2,4 D, kinetin, NAA, BAP, kertas label, plastik wrap, aluminium foil serta alkohol 70% dan 97% sebagai desinfektan.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktor tanpa kombinasi. Faktor pertama yaitu konsentrasi inhibitor etilen (putrescine dan perak nitrat), sedangkan faktor kedua yaitu konsentrasi antioksidan (polyvinylpyrrolidone dan asam askorbat). Konsentrasi putrescine yang digunakan sebesar 0,5 mM; 1 mM; dan 1,5 mM serta konsentrasi perak nitrat yaitu 5 mg/l; 10 mg/l; dan 15 mg/l. Untuk perlakuan antioksidan, digunakan polyvinylpyrrolidone dengan konsentrasi 0,3 g/l; 0,4 g/l; dan 0,5 g/l, serta asam askorbat dengan konsentrasi 0,1 g/l; 0,2 g/l; dan 0,3 g/l. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA), apabila terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan dilanjutkan dengan uji lanjut BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan taraf nyata 5%.

Pembuatan Media dan Persiapan Eksplan

Media induksi kalus yang digunakan mengandung bahan-bahan dengan konsentrasi sebagai berikut; garam N6 4 g/l, sukrosa 30 g/l, kasein 1 g/l, proline 0,5 g/l, glutamin 0,5 g/l, 2,4-D 2 ppm, dan gellan 4 g/l. Media regenerasi tunas yang digunakan terdiri dari bahan-bahan dengan konsentrasi sebagai berikut; garam N6 3,6 g/l, sukrosa 30 g/l, kasein hidrolisat 0,27 g/l, glutamin 0,45 g/l, prolin 0,45 g/l, gellan 5,5 g/l, NAA 0,5 ppm, BAP 2 ppm dan kinetin 2 ppm, dan gellan 6 g/l.

Senyawa inhibitor etilen dan antioksidan ditambahkan dengan konsentrasi sesuai dengan perlakuan. pH larutan media kemudian diatur sampai 5,8 kemudian dilanjutkan dengan proses sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121 °C dan tekanan 17,5 psi selama 15 menit. Larutan media steril kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri di dalam *laminar air flow*, dengan masing-masing cawan berisi ± 25 ml larutan media untuk kemudian dibiarkan selama 40 menit hingga media memadat. Media pada kemudian disimpan pada suhu 4 °C sampai waktunya digunakan.

Benih padi masak yang telah dikupas kulit gabahnya dengan embrio utuh dan secara visual tidak berjamur disterilisasi dengan larutan hipoklorit 1% selama 10 menit. Residu hipoklorit kemudian dihilangkan melalui proses pembilasan benih menggunakan aquades steril secara berulang hingga bersih dan dikeringkan diatas kertas saring dalam petridish.

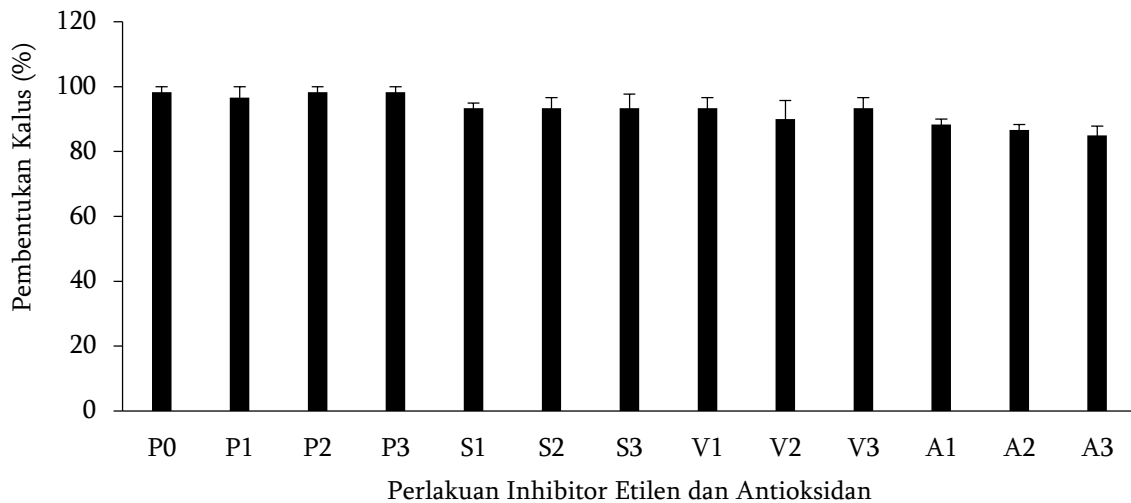
Penanaman Eksplan, Pengamatan Induksi dan Regenerasi Kalus

Eksplan yang telah steril ditanam di media induksi kalus yang telah dipersiapkan sebelumnya menggunakan pinset, dimana setiap petridish terdiri dari 20 eksplan. Eksplan yang telah ditanam diinkubasi selama 15 hari di dalam inkubator dengan suhu 28-30 °C. Pengamatan induksi kalus dilakukan pada hari ke 15 setelah tanam, sedangkan pengamatan regenerasi dilakukan setiap 1 minggu sekali selama 42 hari setelah subkultur. Variabel pengamatan pada penelitian ini meliputi daya pembentukan kalus, persentase pembentukan spot hijau, persentase kalus coklat, dan daya regenerasi kalus. Pertumbuhan dan perkembangan kalus diukur dan diamati menggunakan mikroskop binokuler yang dilengkapi dengan skala.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daya Pembentukan Kalus

Kalus yang muncul terbentuk dari embrio biji padi varietas Mentik Wangi Susu diinduksi pada media N6 yang mengandung 2 ppm 2,4-D. Gambar 1 menunjukkan bahwa penambahan senyawa inhibitor etilen (putrescine dan perak nitrat) dan antioksidan (polyvinylpyrrolidone dan asam askorbat) tidak memberikan pengaruh nyata terhadap persentase pembentukan kalus pada padi varietas Mentik Wangi Susu.



Gambar 1. Persentase terbentuknya kalus pada hari ke-15 di media induksi kalus dengan perlakuan inhibitor etilen dan antioksidan. Data merupakan nilai rata-rata $\pm$ SD (n=4). P (putresine: P1 0,5 mM, P2 1 mM, P3 1,5 mM), S (perak nitrat: S1 5 mg/l, S2 10 mg/l, S3 15 mg/l), V (polyvinylpyrrolidone: V1 0,3 g/l, V2 0,4 g/l, V3 0,5 g/l), dan A (asam askorbat: A1 0,1 g/l, A2 0,2 g/l, A3 0,3 g/l).

Penggunaan hormon auksin seperti 2,4-D dan NAA berperan dalam pembentukan kalus embriogenik dan pembentukannya ditandai dengan daerah skutelum pada benih mengalami pembengkakan sebagai respon pada media kultur yang diberikan (Purnamaningsih, 2006; Shahsavari *et al.*, 2010). Terdapat beberapa eksplan yang tidak dapat membentuk kalus. Eksplan yang tidak dapat berkembang membentuk kalus dapat diindikasikan bahwa terdapat adanya perbedaan kemampuan jaringan pada masing-masing eksplan dalam menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam media inisiasi (Ibrahim *et al.*, 2010).

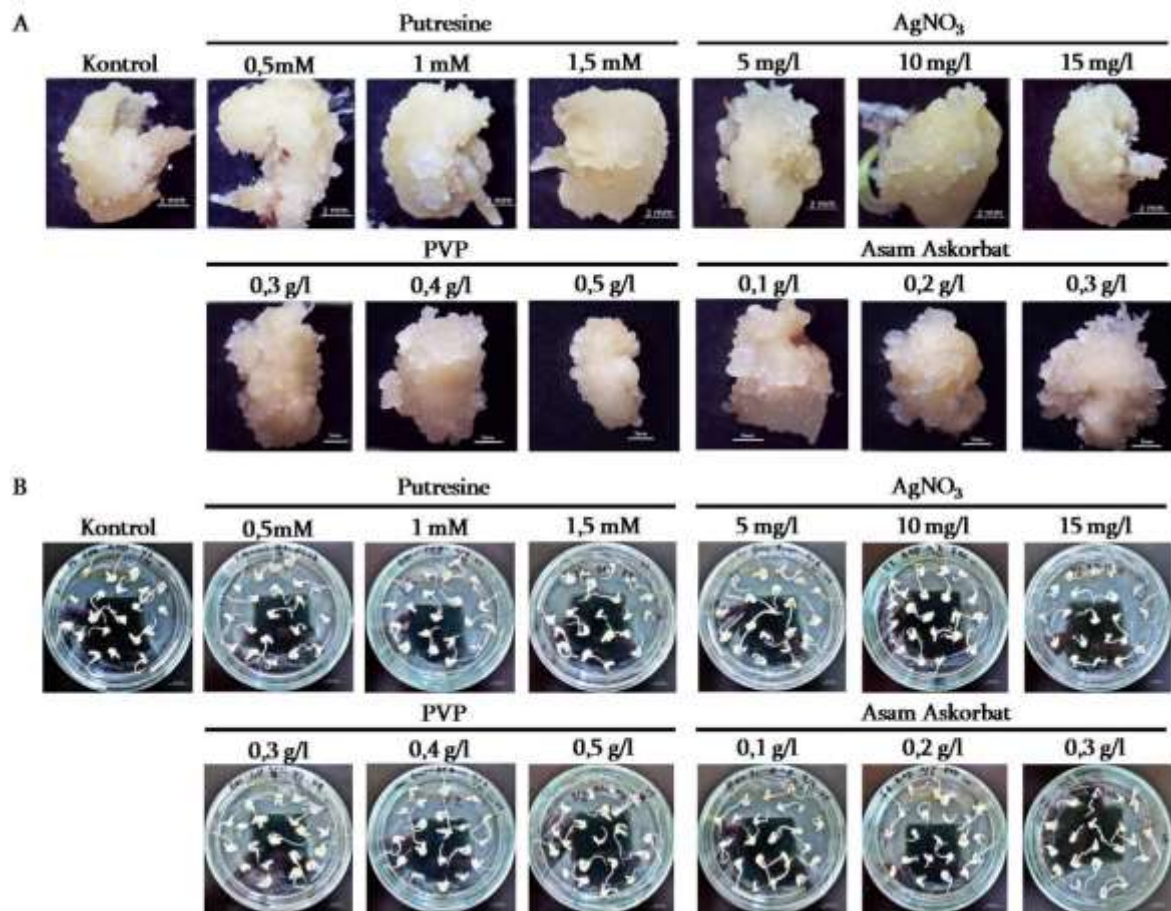
Morfologi Kalus

Hasil pengamatan secara visual induksi kalus gambar 2 yaitu morfologi kalus padi Mentik Wangi Susu menunjukkan bahwa kalus tumbuh secara normal. Bentuk, ukuran, dan warna kalus terlihat tidak jauh berbeda pada masing-masing perlakuan.

Morfologi kalus padi Mentik Wangi Susu memiliki struktur kalus yang menunjukkan terbentuknya nodul-nodul dan warna kalus yang putih kekuningan, dapat dilihat pada Gambar 2A.

Kalus yang dihasilkan dari induksi pada semua perlakuan inhibitor etilen (putresine dan perak nitrat) serta antioksidan (polyvinylpyrrolidone dan asam askorbat) dapat dikategorikan ke dalam kalus embriogenik. Kalus embriogenik inilah yang akan ditanam lagi pada media regenerasi kalus.

Kalus embriogenik memiliki ciri struktur globular, remah, warna kalus putih kekuningan sedangkan kalus non embriogenik memiliki ciri struktur gembur, berlendir, warna kalus bening dan kecoklatan (Bevitori *et al.*, 2014). Warna kalus putih kekuningan dari hasil induksi selama 15 hari menunjukkan bahwa kalus memiliki pertumbuhan yang baik, pertumbuhan kalus yang baik dapat dilihat dari warna kalus yaitu pigmen putih dan pigmen kuning pada kalus yang menunjukkan ciri kalus dalam fase pertumbuhan yang baik (Mahadi *et al.*, 2014). Kalus yang memiliki warna putih mengindikasikan bahwa sel-sel kalus tersebut masih muda dan masih aktif membelah sedangkan kalus yang berwarna putih kekuningan mengindikasikan bahwa sel-sel kalus telah dewasa dan memasuki fase pembelahan aktif (Arianto *et al.*, 2013).



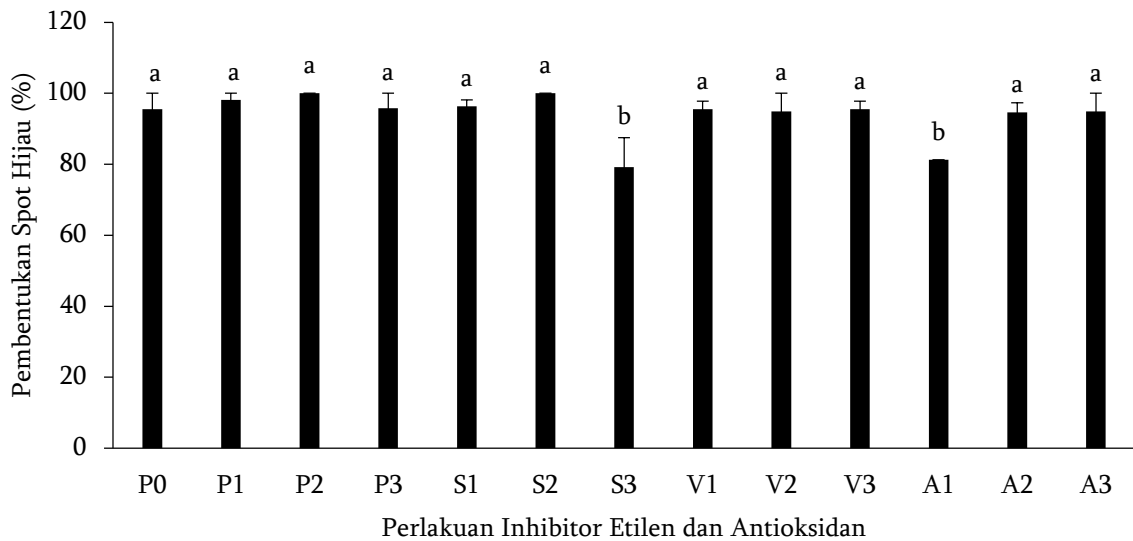
Gambar 2. (A) Kenampakan kalus padi varietas Mentik Wangi Susu dengan penambahan inhibitor etilen (putrescine dan perak nitrat (AgNO₃)) dan antioksidan (polyvinylpyrrolidone dan asam askorbat). (B) Hasil induksi kalus padi varietas Mentik Wangi Susu dengan penambahan inhibitor etilen (putrescine dan perak nitrat (AgNO₃)) dan antioksidan (polyvinylpyrrolidone dan asam askorbat).

Persentase Pembentukan Spot Hijau pada Kalus

Gambar 3 menunjukkan bahwa terdapat adanya pengaruh berbeda nyata dari penambahan senyawa inhibitor etilen terhadap variabel pembentukan spot hijau, sedangkan untuk perlakuan antioksidan tidak terdapat pengaruh berbeda nyata terhadap variabel pembentukan spot hijau. Kalus yang terhitung sebagai parameter spot hijau yaitu kalus yang memunculkan titik kehijauan disebabkan karena adanya paparan cahaya merangsang terbentuknya kandungan klorofil di dalam sel kalus. Puncak pembentukan spot hijau terdapat pada minggu ke 3 dimana hampir semua kalus telah berubah dari warna putih menjadi warna hijau. Pembentukan spot hijau di semua perlakuan inhibitor etilen kecuali S3 memiliki daya pembentukan yang sangat tinggi yaitu berada pada rentang 96%-100%, sedangkan perlakuan dengan hasil persentase pembentukan spot hijau terendah yaitu S3 dengan daya pembentukan spot hijau sebesar 79%. Hasil persentase pembentukan spot

hijau tertinggi pada perlakuan senyawa antioksidan yaitu perlakuan 0,3 g/l polyvinylpyrrolidone (V1) sebesar 96%, sedangkan hasil persentase pembentukan spot hijau terendah yaitu perlakuan 0,1 g/l asam askorbat (A1) sebesar 81%.

Perlakuan perak nitrat dengan konsentrasi 15 mg/l (S3) memiliki daya pembentukan spot hijau terendah. Hal ini menjelaskan bahwa pemberian senyawa perak nitrat yang terlalu tinggi pada media kultur mampu menurunkan daya pembentukan spot hijau. Semakin tinggi konsentrasi perak nitrat yang diberikan, maka semakin tinggi pula daya hambat terdapat perkembangan dan pemanjangan sel tanaman (Shofi, 2017). Kandungan perak nitrat yang tinggi pada media kultur jaringan memiliki dampak negatif bagi kalus. Hal ini dikarenakan ion logam Ag yang terkandung dalam senyawa perak nitrat juga dapat menghambat proses penyerapan dan produksi auksin oleh sel tanaman sehingga dapat mengganggu proses pemanjangan sel (Gusev *et al.*, 2016).

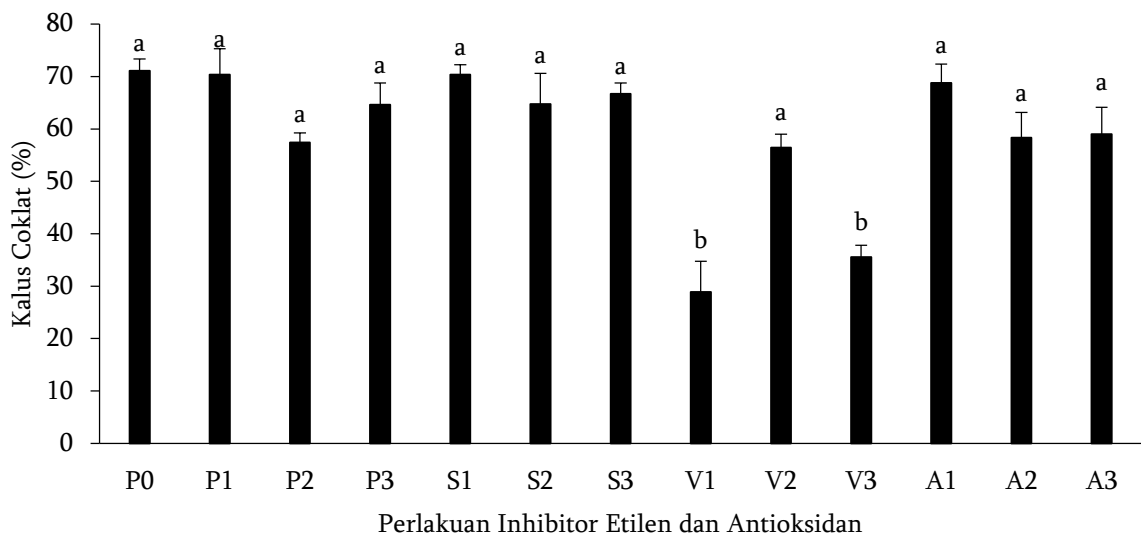


Gambar 3. Pengaruh senyawa inhibitor etilen dan antioksidan terhadap pembenttukan spot hijau kalus padi varietas Mentik Wangi Susu. Data merupakan nilai rata-rata $\pm$ SD ($n=4$) dan huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf 5 % menurut uji BNJ. P (putresine: P1 0,5 mM, P2 1 mM, P3 1,5 mM), S (perak nitrat: S1 5 mg/l, S2 10 mg/l, S3 15 mg/l), V (polyvinylpyrrolidone; V1 0,3 g/l, V2 0,4 g/l, V3 0,5 g/l), dan A (asam askorbat: A1 0,1 g/l, A2 0,2 g/l, A3 0,3 g/l).

Persentase Kalus Coklat

Kalus yang telah dipindah pada media regenerasi dapat mengalami pencoklatan. Pencoklatan dapat muncul pada saat kalus masih belum muncul spot hijau maupun yang telah muncul spot hijau. Kemunculan kalus coklat dimulai

pada minggu ke 4 setelah kalus dipindah ke media regenerasi. Batasan kalus yang termasuk dalam kriteria kalus coklat pada penelitian ini yaitu sebagian besar (>80%) kalus telah berubah warna menjadi coklat kehitaman.



Gambar 4. Pengaruh senyawa inhibitor etilen dan antioksidan terhadap persentase kalus coklat pada padi varietas Mentik Wangi Susu. Data merupakan nilai rata-rata $\pm$ SD ($n=4$) dan huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf 5 % menurut uji BNJ. P (putresine: P1 0,5 mM, P2 1 mM, P3 1,5 mM), S (perak nitrat: S1 5 mg/l, S2 10 mg/l, S3 15 mg/l), V (polyvinylpyrrolidone; V1 0,3 g/l, V2 0,4 g/l, V3 0,5 g/l), dan A (asam askorbat: A1 0,1 g/l, A2 0,2 g/l, A3 0,3 g/l).

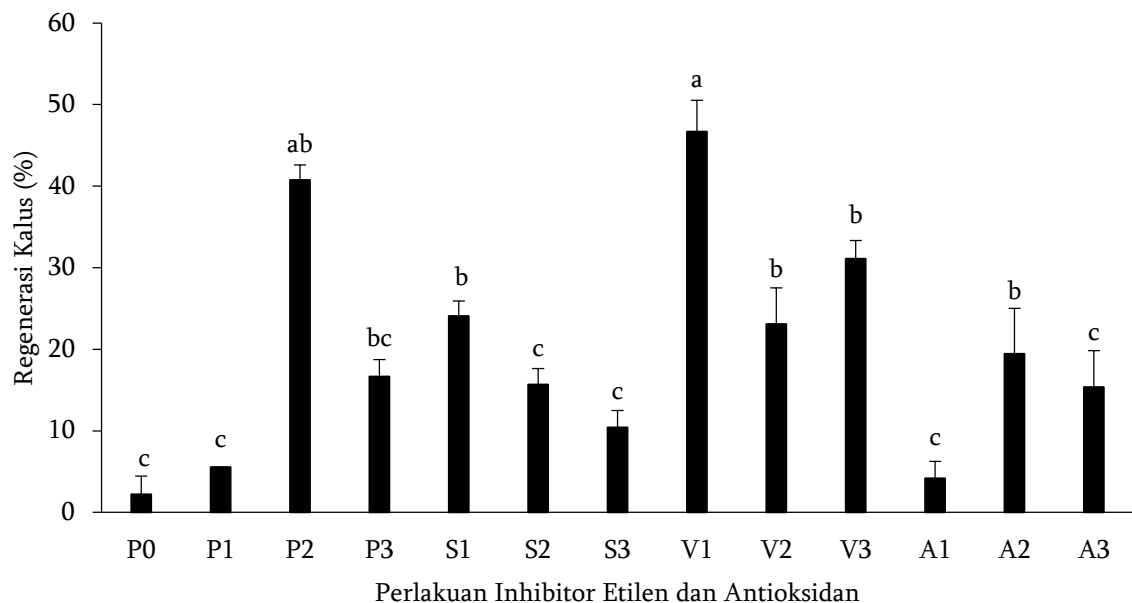
Hasil uji sidik ragam dari persentase kalus coklat tidak terdapat pengaruh berbeda nyata terhadap penambahan senyawa inhibitor etilen, sedangkan untuk perlakuan antioksidan terdapat pengaruh berbeda sangat nyata. Berdasarkan gambar 4 dapat dilihat bahwa persentase kalus coklat pada perlakuan inhibitor etilen berada di rentang 57%-71%. Persentase kalus browning yang terendah pada perlakuan inhibitor etilen yaitu pada perlakuan P2 sebesar 57%, sedangkan persentase kalus browning tertinggi yaitu pada perlakuan P0 sebesar 71%. Pencoklatan kalus tertinggi di perlakuan antioksidan terdapat pada perlakuan 0,1 g/l asam askorbat (A1). Perlakuan A1 kalus mengalami pencoklatan yang cukup tinggi sebesar 69%, sehingga kalus tidak mampu untuk berkembang ke fase selanjutnya atau tidak dapat berdiferensiasi. Pencoklatan kalus terendah pada perlakuan antioksidan terdapat pada perlakuan polyvinylpyrrolidone 0,3 g/l yaitu sebesar 29%.

Kalus coklat ditandai dengan munculnya warna coklat atau hitam pada kalus yang dapat membuat pertumbuhan dan perkembangan kalus terhambat dan mengakibatkan kematian pada jaringan (Purba *et al.*, 2017). Kemunculan kalus coklat pada padi varietas Mentik Wangi Susu terjadi pada saat kalus telah memunculkan spot hijau. Persentase kemunculan browning pada kalus padi

Mentik Wangi Susu tidak melihat perbedaan yang signifikan pada perlakuan senyawa inhibitor etilen. Hal ini mengindikasikan bahwa aktifitas etilen bukan merupakan faktor tunggal penyebab terjadinya browning. Faktor lain penyebab terjadinya browning yaitu senyawa fenol. Timbulnya browning pada kalus diduga karena terjadinya proses oksidasi fenol (Hussain *et al.*, 2011). Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian senyawa antioksidan berupa polyvinylpyrrolidone 0,3 g/l mampu menurunkan tingkat kalus coklat pada padi Mentik Wangi Susu. Senyawa polyvinylpyrrolidone mampu menekan produksi enzim *Phenilalanin ammonialase* (PAL) yang dapat menghasilkan senyawa fenolik bebas dengan mengubah senyawa fenilalanin yang bereaksi dengan *Polifenol oksidase* (PPO) (Hutami, 2008).

Daya Regenerasi Kalus

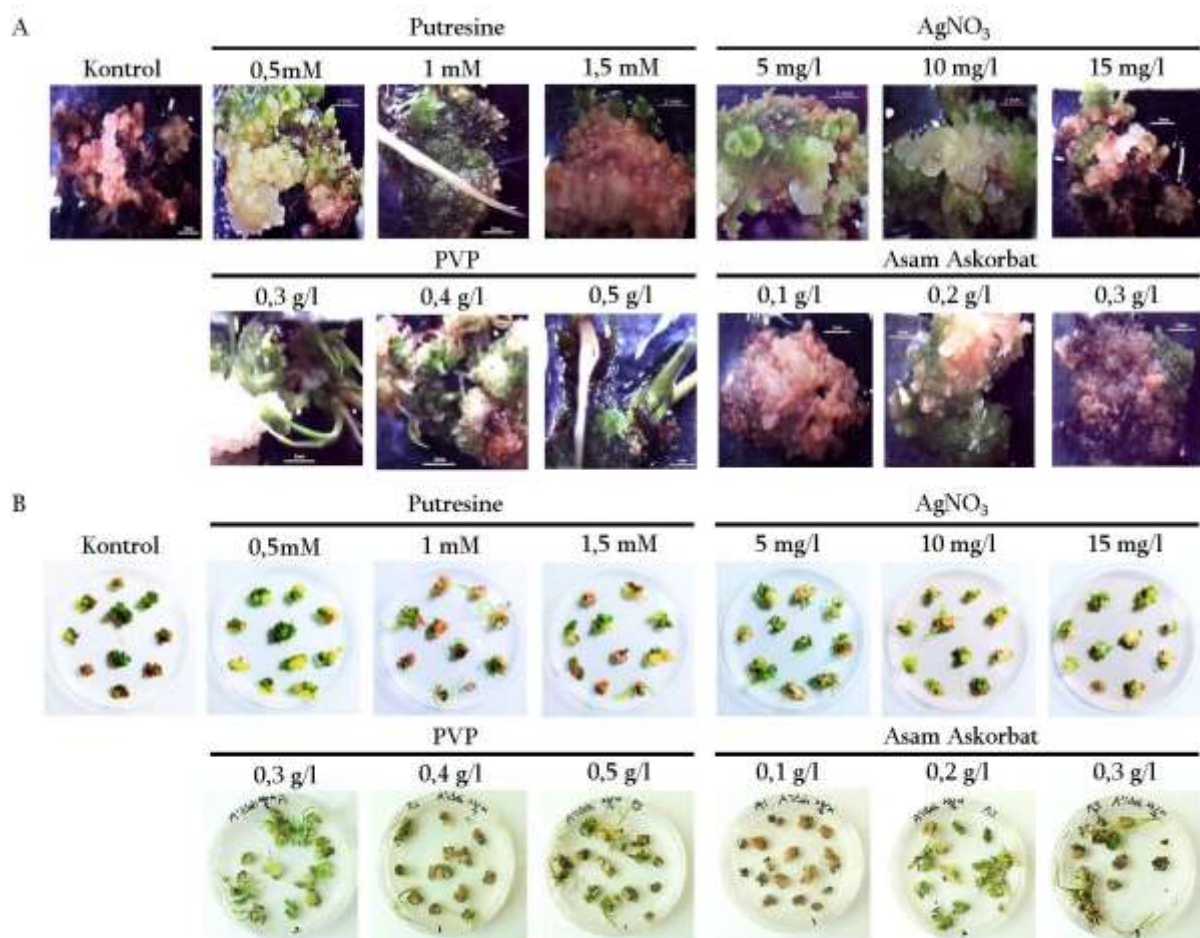
Daya regenerasi kalus yang ditunjukkan dengan kemampuan dalam membentuk tunas kemudian diukur pada minggu ke-6 setelah sub kultur ke media regenerasi yang mengandung senyawa inhibitor etilen atau antioksidan. Data hasil pengamatan daya regenerasi disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Pengaruh senyawa inhibitor etilen dan antioksidan terhadap daya regenerasi kalus. Data merupakan nilai rata-rata $\pm$ SD (n=4) dan huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf 5 % menurut uji BNJ. P (putresine: P1 0,5 mM, P2 1 mM, P3 1,5 mM), S (perak nitrat: S1 5 mg/l, S2 10 mg/l, S3 15 mg/l), V (polyvinylpyrrolidone; V1 0,3 g/l, V2 0,4 g/l, V3 0,5 g/l), dan A (asam askorbat: A1 0,1 g/l, A2 0,2 g/l, A3 0,3 g/l).

Terdapat pengaruh penambahan senyawa inhibitor etilen dan antioksidan pada media regenerasi terhadap daya regenerasi kalus. Kalus yang terhitung dalam kriteria regenerasi yaitu kalus yang telah memunculkan tunas dan daun. Hasil persentase regenerasi kalus yang tertinggi pada perlakuan inhibitor etilen ditunjukkan oleh perlakuan putresine (P2) yaitu sebesar 41%, sedangkan perlakuan senyawa inhibitor etilen perak nitrat yang terbaik yaitu S1 sebesar 26%. Hasil daya

regenerasi kalus tertinggi pada perlakuan antioksidan yaitu 0,3 g/l *polyvinylpyrrolidone* (V1) sebesar 47%, sedangkan perlakuan asam askorbat terbaik yaitu 0,2 g/l asam askorbat (A2) sebesar 19%. Perlakuan dengan daya regenerasi kalus terendah pada perlakuan 0,1 g/l asam askorbat (A1) sebesar 4%. Perlakuan yang menunjukkan hasil persentase daya regenerasi kalus yang terendah yaitu P0 (kontrol) yang sebesar 2%.



Gambar 6. Regenerasi kalus pada padi varietas Mentik Wangi Susu. (A) Kenampakan kalus yang berhasil membentuk tunas dan kalus coklat pada setiap perlakuan melalui pengamatan mikroskopis. (B) Kenampakan regenerasi tunas pada media regenerasi minggu ke 6 di media regenerasi.

Perlakuan inhibitor etilen putresine konsentrasi 1 mM (P2) pada penelitian ini dapat meningkatkan daya regenerasi kalus padi varietas Mentik Wangi Susu sebesar 41%. Konsentrasi putresine yang terbaik dalam merespon daya regenerasi kalus yaitu sebesar 10^{-3} M pada tanaman padi (Dewi & Purwoko, 2008). Penambahan senyawa poliamin putresine dengan konsentrasi 1 mM juga dapat meningkatkan respon pembentukan

kalus embriogenik serta daya regenerasi pada tanaman gandum (Aydin *et al.*, 2016).

Konsentrasi perlakuan perak nitrat yang terbaik yaitu 5 mg/l (S1) dengan persentase 26% yang disusul dengan perlakuan S2 dan S3 sebesar 16% serta 10%. Pemberian perak nitrat dengan konsentrasi 5 mg/l secara signifikan mampu meningkatkan tingkat regenerasi sebesar 14-87% tergantung genotip pada beberapa varietas sorgum (Oldach *et al.*, 2014). Berdasarkan Gambar 6 daya

regenerasi kalus pada perlakuan inhibitor etilen (perak nitrat) semakin turun seiring dengan semakin besar konsentrasi perak nitrat yang diberikan. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin tinggi pemberian senyawa perak nitrat, maka dapat menjadi penghambat dalam meregenerasikan kalus. Penambahan senyawa perak nitrat di atas konsentrasi 15 mg/l dapat menjadikannya sebagai inhibitor pada beberapa genotip di kultur jaringan (Lentini *et al.*, 1995).

Selain bermanfaat dalam meningkatkan daya regenerasi kalus pada konsentrasi yang tepat, senyawa inhibitor etilen putresine dan perak nitrat juga memiliki efek samping jika diberikan dengan konsentrasi tinggi. Kandungan putresine yang tinggi dapat menyebabkan penghambatan senyawa etilen yang berlebih sehingga terjadi ketidakseimbangan hormon yang menyebabkan terganggunya perkembangan sel (Hanafy *et al.*, 2017). Senyawa perak nitrat (AgNO_3) dapat bersifat toksik pada sel tanaman karena dapat memicu adanya *Reactive Oxygen Species* (ROS) dimana reaksi ini dapat meningkatkan aktifitas enzim peroksidase dan superoksida dismutase yang berdampak pada perkembangan sel karena meningkatnya kadar fenol pada sel tanaman (Shofi, 2017). Pernyataan-pernyataan di atas sejalan dengan penelitian ini bahwa semakin tinggi konsentrasi putresine dan perak nitrat yang diberikan, maka dapat menurunkan daya regenerasi kalus pada padi varietas Mentik Wangi Susu.

Selain inhibitor etilen, perlakuan senyawa antioksidan dengan penambahan polyvinylpyrrolidone 0,3 g/l telah meningkatkan secara nyata tingkat regenerasi kalus padi Mentik Wangi Susu sampai dengan 47% berbanding 2% untuk perlakuan kontrol. Senyawa antioksidan polyvinylpyrrolidone dapat menekan pencoklatan kalus padi Mentik Wangi Susu sehingga dapat meningkatkan pembentukan tunas. Perlakuan polyvinylpyrrolidone 0,3 g/l (V1) merupakan konsentrasi yang memberikan tingkat pencoklatan terendah dibandingkan perlakuan arang aktif pada kultur jaringan tebu dan asam askorbat dan asam sitrat pada kultur jaringan Kiwi Hongyang (Shimelis *et al.*, 2015; Chai *et al.*, 2018). Konsentrasi 300 mg/l polyvinylpyrrolidone ditambahkan pada media regenerasi dengan kombinasi larutan DIECA 20 mg/l yang diteteskan pada meristem tebu memberikan daya regenerasi 100% dan tunas terbentuk sebesar 3,8 tunas/eksplan (Roostika *et al.*, 2015).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa perlakuan penambahan senyawa inhibitor etilen dan antioksidan berpengaruh positif terhadap peningkatan daya regenerasi kalus pada padi varietas Mentik Wangi Susu. Inhibitor terbaik untuk regenerasi kalus Mentik Wangi Susu adalah 10 mM putresine, sedangkan antioksidan terbaik adalah 0,3 g/l polyvinylpyrrolidone.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada UPT Lab Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi-CDAST Universitas Jember yang telah memfasilitasi seluruh kegiatan penelitian yang telah dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arianto, D, Z Basri, dan M Bustami. 2013. Induksi kalus dua klon kakao (*Theobroma cacao* L.) Unggul Sulawesi pada berbagai konsentrasi 2,4 dichlorophenoxy acetic acid secara in vitro. Agrotekbis: e-Jurnal Ilmu Pertanian. 1: 211–220
- Aydin, M, A Hossein Pour, K Haliloğlu, and M Tosun, 2016. Effect of polyamines on somatic embryogenesis via mature embryo in wheat. Turkish Journal of Biology. 40: 1178–1184.
- Bevitori, R, M Popielarska-Konieczna, EM Dos Santos, MF Grossi-De-sá, and S Petrofeza. 2014. Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. Protoplasma. 251: 545–554.
- Chai, J, Y Gao, Y Dong, L Kong, and Y Zhang. 2018. Browning treatment in tissue culture of 'hongyang' kiwifruit. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 452: 022075. DOI: 10.1088/1757-899X/452/2/022075
- Damayanti, D, I Mariska, dan M Herman, 2007. Regenerasi pepaya melalui kultur in vitro. Jurnal AgroBiogen. 3: 49–54.
- Dewi, IS, and BS Purwoko, 2008. Role of polyamines in inhibition of ethylene biosynthesis and their effects on rice anther culture development. Indonesian Journal of Agricultural Science. 9: 60–67.
- Dewi, IS, BS Purwoko, H Aswidinnoor, dan IH Somantri, 2004. Kultur antera padi pada

- beberapa formulasi media yang mengandung poliamin. Jurnal Bioteknologi Pertanian. 9: 14–19
- Dubravina, GA, SM Zaytseva, and NV Zagorskina. 2005. Changes in formation and localization of phenolic compounds in the tissues of european and canadian yew during dedifferentiation in vitro. Russian Journal of Plant Physiology. 52: 672–678.
- Guntur, G, M Restu, dan M Ummusyahidah. 2019. Aplikasi berbagai zat antioksidan sebagai penghambat browning media tanam eksplan jati putih (*Gmelina Arborea Roxb*) secara in-vitro. Jurnal Eboni. 1: 12–24
- Gusev, AA, AA Kudrinsky, O V. Zakharova, AI Klimov, PM Zharebin, G V. Lisichkin, IA Vasyukova, AN Denisov, and YA Krutyakov. 2016. Versatile synthesis of PHMB-stabilized silver nanoparticles and their significant stimulating effect on fodder beet (*Beta vulgaris* L.). Materials Science and Engineering. C, 62: 152–159.
- Hanafy, A, E Darwish, and MG Alobaidy. 2017. Impact of putrescine and 24-epibrassinolide on growth, yield and chemical constituents of cotton (*Gossypium barbadense* L.) plant grown under drought stress conditions. Asian Journal of Plant Sciences. 16: 9–23.
- Humaira, A, dan S Amien, 2020. Induksi kalus lima kultivar seledri (*Apium graveolens* L.) dengan sukrosa dan berbagai konsentrasi maltosa. Agrin. 23: 1–11.
- Hussain, A, S Naz, H Nazir, & ZK Shinwari, 2011. Tissue culture of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Pakistan. Pakistan Journal of Botany. 43: 1069–1078
- Hutami, S. 2008. Ulasan masalah pencoklatan pada kultur jaringan. Jurnal AgroBiogen. 4: 83–88.
- Ibrahim, MSD, O Rostiana, dan N Khumaida. 2010. Pengaruh umur eksplan terhadap keberhasilan pembentukan kalus embriogenik pada kultur meristem jahe (*Zingiber officinale* Rosc). Jurnal Penelitian Tanaman Industri. 16: 37–42.
- Kumar, V, G Parvatam, and G Ravishankar, 2009. AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. Electronic Journal of Biotechnology. 12: 1–15.
- Kumar, V, A Ramakrishna, and GA Ravishankar, 2007. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 43: 602–607.
- Lentini, Z, P Reyes, CP Martínez, and WM Roca, 1995. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. Plant Science. 110: 127–138.
- Liang, S, Y He, H Zheng, Q Yuan, F Zhang, and B Sun, 2019. Effects of sucrose and browning inhibitors on callus proliferation and anti-browning of chinese kale. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 252: 022018. DOI: 10.1088/1755-1315/252/2/022018
- Lisdiyanti, ND, S Anwar, dan A Darmawati. 2019. Pengaruh iradiasi sinar gamma terhadap induksi kalus dan seleksi tingkat toleransi padi (*Oryza sativa* L.) terhadap cekaman salinitas secara in-vitro. Berkala Bioteknologi. 2: 65–75.
- Mahadi, I, S Wulandari, and A Omar. 2014. Pembentukan kalus tanaman rosella (*Hibiscus sabdariffa*) pada pemberian naftalen acetyl acid (NAA) dan benzyl amino purin (BAP) sebagai sumber belajar konsep bioteknologi. Biogenesis. 11: 1–6.
- Maulidia, ZRA, dan WID Fanata. 2019. Pengaruh jenis auksin terhadap pembentukan kalus dan daya regenerasi tiga varietas padi lokal. Berkala Ilmiah Pertanian. 2: 77–81.
- Ngomuo, M, E Mneney, and P Ndakidemi. 2015. Control of lethal browning by using ascorbic acid on shoot tip cultures of a local *Musa* spp. (Banana) cv. Mzuzu in Tanzania. African Journal of Biotechnology. 13: 1721–1725.
- Oldach, KH, A Morgenstern, S Rother, M Girgi, M O’Kennedy, and H Lörz, 2001. Efficient in vitro plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Plant Cell Reports. 20: 416–421.
- Purba, RV, H Yuswanti, dan ING Astawa. 2017. Induksi kalus eksplan daun tanaman anggur (*Vitis vinifera* L.) dengan aplikasi 2,4-D secara in vitro. Jurnal Agroekoteknologi Tropika. 6: 218–228.
- Purnamaningsih, R. 2006. Induksi kalus dan optimasi regenerasi empat varietas padi melalui kultur in vitro. Jurnal AgroBiogen. 2: 74–80.
- Roostika, I, RPDL Wati, dan D Sukmadjaja. 2015. Pengaruh PVP dan DIECA terhadap regenerasi meristem tebu. Buletin Tanaman

- Tembakau, Serat & Minyak Industri. 7: 9–14.
- Sahoo, KK, AK Tripathi, A Pareek, SK Sopory, and SL Singla-Pareek. 2011. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. *Plant Methods*. 7: 1–11.
- Shahsavari, E, AA Maheeran, ASN Akmar, and MM Hanafi, 2010. The effect of plant growth regulators on optimization of tissue culture system in Malaysian upland rice. *African Journal of Biotechnology*. 9: 2089-2094.
- Shimelis, D, K Bantte, and T Feyissa. 2015. Effects of polyvinyl pyrrolidone and activated charcoal to controleffect of phenolic oxidation on in vitro culture establishment stage of micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Advances in Crop Science and Technology*. 3: 1–4.
- Shofi, M. 2017. Daya hambat perak nitrat (AgNO_3) pada perkecambahan biji kacang hijau (*Vigna radiata*). *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*. 10: 98–104.
- Sisharmini, A, B Sapta Purwoko, N Khumaida, dan KR Trijatmiko. 2018. Optimasi konsentrasi asetosiringon dan higromisin dalam transformasi genetik padi fatmawati dengan perantaraan *Agrobacterium tumefaciens*. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*. 46: 223–230.
- Tabiyeh, DT, F Bernard, & H Shacker, 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae*. 726: 201–203.