

RADIO SENSITIVITAS PADA KALUS EMPAT GENOTIPE UBI KAYU (*Manihot esculenta* Crantz.)

Oleh : Candra Catur Nugroho *)

ABSTRAK

Seleksi *in vitro* bisa diterapkan pada berbagai kondisi cekaman abiotik misalnya cekaman terhadap aluminium dengan menggunakan agen seleksi $AlCl_3$. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan *lethal concentration* 20 (LC_{20}) dan LC_{50} dalam rangka seleksi *in vitro* terhadap toksisitas aluminium dengan menggunakan agen seleksi $AlCl_3$. Penelitian terdiri atas empat percobaan yang terpisah, masing-masing menggunakan genotipe Jame-jame, UJ 5, Adira 4, dan Gajah sebagai bahan tanam (eksplan). Percobaan ini disusun berdasarkan rancangan acak lengkap satu faktor. Faktor perlakuan adalah konsentrasi $AlCl_3$ (0, 100, 200, 400, 600 dan 800 mg L⁻¹). Hasil seleksi *in vitro* menunjukkan bahwa genotipe Jame-jame dan Gajah relatif peka terhadap toksisitas aluminium dibandingkan genotipe Adira 4 dan UJ 5. Hal ini dapat dilihat dari kepekaan kalus genotipe Jame-jame ($LC_{20} = 19,39$; $LC_{50} = 236,37$) dan Gajah ($LC_{20} = 39,99$; $LC_{50} = 289,10$) terhadap pemberian $AlCl_3$ dibandingkan kalus genotipe Adira 4 ($LC_{20} = 831,88$; $LC_{50} = 2897,10$) dan UJ 5 (LC_{20} dan LC_{50} belum teridentifikasi hingga konsentrasi maksimum $AlCl_3$).

Kata kunci : $AlCl_3$, seleksi *in vitro*, toksisitas aluminium, ubi kayu

ABSTRACT

In vitro selection using $AlCl_3$ as selection agent can be applied to support breeding program of plant tolerant to abiotic stress conditions such as aluminum toxicity. The research was aimed to determine the lethal concentration 20 (LC_{20}) and LC_{50} of $AlCl_3$ in the *in vitro* selection using $AlCl_3$ selection agent. The research consisted of four experiments, each using Jame-jame, UJ 5, Adira 4, and Gajah genotypes as explants. Each experiment was arranged in the completely randomized design with one factor. Treatment factor was the concentration of $AlCl_3$ (0, 100, 200, 400, 600 and 800 mg L⁻¹). Results of *in vitro* selection showed that Jame-jame and Gajah genotypes relatively sensitive to aluminum toxicity than Adira 4 and UJ 5 genotypes. It can be seen from the sensitivity of Jame-jame ($LC_{20} = 19,39$; $LC_{50} = 236,37$) and Gajah ($LC_{20} = 39,99$; $LC_{50} = 156,54$) genotypes callus's to $AlCl_3$ compared of Adira 4 ($LC_{20} = 831,88$; $LC_{50} = 2897,10$) and UJ 5 (LC_{20} and LC_{50} was not identified since the curve was still linear until the maximum $AlCl_3$ concentration) genotypes callus's.

Keywords : $AlCl_3$, aluminum toxicity, cassava, *in vitro* selection

PENDAHULUAN

Peningkatan produksi ubi kayu terkendala oleh semakin berkurangnya tanah subur (produktif) di Indonesia. Berdasarkan survei Bank Dunia tahun 1992, 3,4 juta ha tanah

*) Dosen Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Kutai Kartanegara

beririgasi di Jawa sudah dan akan dialihfungsikan menjadi peruntukan non pertanian (pemukiman, jalan lingkar, pusat perbelanjaan, ruko, dan kawasan industri) hingga tahun 2010 (Mawardi, 2006). Tanah-tanah subur yang tersedia saat ini diprioritaskan untuk ditanami padi, jagung dan tanaman pangan pokok lain sehingga budidaya ubi kayu terpaksa memanfaatkan lahan-lahan marginal.

Di Indonesia lahan marginal dijumpai baik pada lahan basah maupun lahan kering. Lahan basah berupa tanah gambut, tanah sulfat masam dan rawa pasang surut seluas 24 juta ha, sementara lahan kering berupa tanah masam (ultisol) 47,5 juta ha dan oxisol 18 juta ha (Suprpto, 2002). Berjuta-juta hektar tanah marginal khususnya tanah masam tersebut sangat prospektif untuk pengembangan budidaya ubi kayu. Salah satu syarat yang diperlukan adalah diperlukannya varietas ubi kayu yang toleran tanah masam (toksisitas aluminium). Tanah masam memiliki pH tanah $\leq 5,5$. Saat pH tanah berada di bawah 5 maka aluminium (Al) dalam bentuk Al^{3+} akan meracuni perakaran tanaman (Kochian *et al.*, 2005).

Variasi somaklonal yang diperoleh melalui embriogenesis somatik dapat digunakan sebagai materi seleksi *in vitro* dengan menggunakan media seleksi yang sesuai sehingga diperoleh somaklon dengan sifat yang diinginkan. Peran seleksi *in vitro* dalam program pemuliaan tanaman adalah mempercepat waktu seleksi (Jain, 2001). Seleksi *in vitro* bisa diterapkan pada berbagai kondisi cekaman abiotik misalnya cekaman terhadap aluminium. Seleksi ini biasanya menggunakan agen seleksi $AlCl_3$. $AlCl_3$ digunakan untuk menyeleksi varian somaklon ubi kayu yang ada, sehingga nantinya diharapkan diperoleh varian putatif ubi kayu yang potensial dikembangkan di lahan masam. Penentuan nilai *lethal concentration* 20 (LC_{20}) dan LC_{50} sangat penting dalam seleksi *in vitro*, karena sumber keragaman genetik tertinggi berada di antara LC_{20} dan LC_{50} . Penelitian ini bertujuan untuk menentukan LC_{20} dan LC_{50} dalam rangka seleksi *in vitro* terhadap toksisitas aluminium dengan menggunakan agen seleksi $AlCl_3$.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dalam jangka waktu 4 bulan mulai bulan Maret sampai Juni 2014 sejak persiapan media kultur/media seleksi, inokulasi kalus dan subkultur kalus ke media seleksi hingga pengambilan data terakhir. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan 3 Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Bahan tanam yang digunakan adalah kalus non-embriogenik genotipe Jame-jame, UJ 5, Adira 4, dan Gajah. Media seleksi yang digunakan adalah media MS modifikasi (Tabel 1) + 3 mg L^{-1} BAP, dengan penambahan $AlCl_3$ pada pH rendah (4,0).

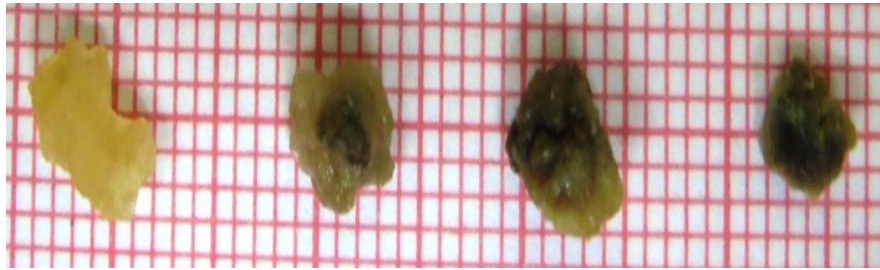
Penelitian terdiri atas empat sub percobaan yang terpisah, masing-masing menggunakan genotipe Jame-jame, UJ 5, Adira 4, dan Gajah sebagai bahan tanam (eksplan). Penelitian ini disusun berdasarkan rancangan acak lengkap satu faktor. Faktor perlakuan adalah konsentrasi $AlCl_3$ (0, 100, 200, 400, 600 dan 800 mg L^{-1}). Setiap satuan percobaan pada tiap genotipe diulang 8 kali dengan 4 kalus embriogenik per botol kultur (diameter 6 cm). Kultur dipelihara di ruang kultur dengan suhu 25°C , tingkat penyinaran 1.500 lux dan fotoperiode 24 jam. Kalus selanjutnya dipindahkan pada media seleksi selama tiga bulan dan setiap satu bulan disubkultur pada media seleksi yang sama. Pengamatan yang dilakukan meliputi:

1. Skor perubahan warna kalus

Pengamatan dilakukan setiap minggu hingga 12 MSK. Skor perubahan warna kalus berdasarkan persentase munculnya warna hitam pada kalus (Gambar 1), yaitu:

Skor 1 : $\leq 25\%$ kalus berwarna hitam

- Skor 2 : > 25% - 50% kalus berwarna hitam
 Skor 3 : > 50% - 75% kalus berwarna hitam
 Skor 4 : > 75% - 100% kalus berwarna hitam



Gambar 1. Skor perubahan warna kalus ubi kayu

2. Diameter kalus

Pengukuran diameter kalus dilakukan setiap empat minggu sekali hingga 12 MSK. Data diameter kalus yang diperoleh kemudian dibuat skoring untuk menghitung tingkat kematian kalus. Skoring diameter kalus meliputi:

- Skor 1 : kalus yang berdiameter ≥ 15 mm
 Skor 2 : kalus yang berdiameter > 11 – 15 mm
 Skor 3 : kalus yang berdiameter > 7 – 11 mm
 Skor 4 : kalus yang berdiameter > 4 – 7 mm

Tabel 1. Komposisi media MS modifikasi

Nama stok	Bahan kimia	Konsentrasi dalam media MS (mg L ⁻¹)	Pemekatan	Konsentrasi dalam larutan stok (g L ⁻¹)	Volume yang dipakai (ml L ⁻¹ media)
Makro	NH ₄ NO ₃	2.400		24.000	100
	KNO ₃	1.900	10X	19.000	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370		3.700	
	KH ₂ PO ₄	13		130	
Ca	CaCl ₂ .2H ₂ O	15	50X	750	20
Mikro A	H ₃ BO ₃	6,2		620	10
	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	100X	1.690	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6		860	
Mikro B	KI	0,83		830	1
	Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0,25	1.000X	250	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025		25	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025		25	
Fe	FeSO ₄ .7H ₂ O	28	Ditimbang langsung saat membuat media		
Vitamin	Thiamine·HCl	0,1		10	10
	Pyridoxine·HCl	0,5	100X	50	
	Nicotinic Acid	0,5		50	
	Glycine	2		200	
Myo	Myo-inositol	100	50X	5.000	20

Data diameter kalus dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan. Perlakuan yang berpengaruh nyata kemudian diuji lanjut dengan menggunakan *Duncan's multiple range test* (DMRT) dengan tingkat kepercayaan 95%. Analisis data menggunakan program SAS versi 9.1. Skoring kematian kalus dihitung dengan menggunakan proporsi data skoring perubahan warna kalus (40%) : skoring diameter kalus

(60%). Kalus yang mengalami kematian adalah kalus yang memiliki skoring kematian kalus ≥ 3.00 . Data skoring diuji menggunakan uji peringkat *Kruskal Wallis* (Walpole, 1995). Penentuan LC_{20} dan LC_{50} menggunakan program *CurveExpert*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi $AlCl_3$ yang digunakan dalam penelitian ini sampai dengan 800 mg L^{-1} yang bertujuan agar seleksi *in vitro* dapat dilakukan secara intensif, yaitu hanya kalus yang putatif terhadap cekaman lahan masam yang akan hidup. Roy dan Mandal (2005) menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi $AlCl_3$ yang tinggi pada seleksi *in vitro* akan bersifat intensif. Berdasarkan pengamatan, perlakuan taraf konsentrasi $AlCl_3$ berpengaruh nyata terhadap diameter kalus pada semua genotipe (Tabel 2). Secara umum, kalus mengalami perkembangan diameter yang cukup signifikan saat dikulturkan dalam media tanpa pemberian $AlCl_3$ (0 mg L^{-1}).

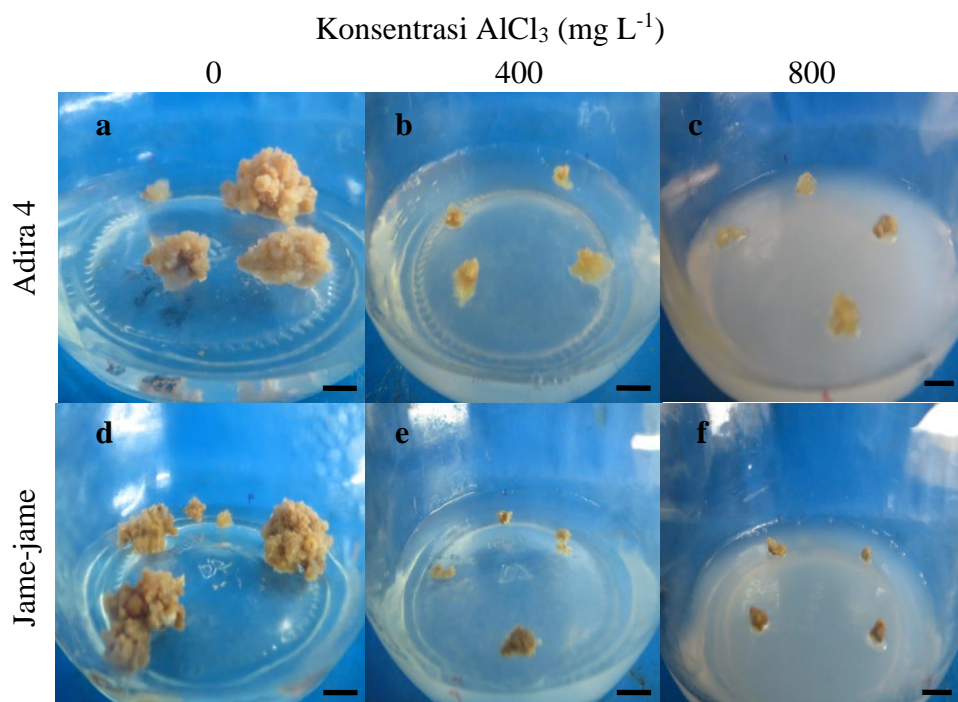
Tabel 2. Diameter kalus (mm) ubi kayu genotipe Jame-jame, UJ 5, Adira 4, dan Gajah

Genotipe	Konsentrasi $AlCl_3$ (mg L^{-1})	Umur (MSK)		
		4	8	12
Jame-jame	0	10,19 a	12,00 a	12,28 a
	100	4,69 b	4,69 b	4,69 b
	200	5,06 b	5,06 b	5,06 b
	400	4,58 b	4,58 b	4,58 b
	600	5,07 b	5,07 b	5,07 b
	800	4,69 b	4,69 b	4,69 b
UJ-5	0	7,67 a	8,40 a	8,60 a
	100	5,67 b	5,67 b	5,67 b
	200	5,00 b	5,00 b	5,00 b
	400	5,33 b	5,33 b	5,33 b
	600	5,27 b	5,27 b	5,27 b
	800	5,20 b	5,20 b	5,20 b
Adira 4	0	9,91 a	13,53 a	14,09 a
	100	6,15 b	6,56 b	6,56 b
	200	5,79 b	6,08 b	6,08 b
	400	5,38 b	5,63 b	5,63 b
	600	5,00 b	5,00 b	5,00 b
	800	5,00 b	5,00 b	5,00 b
Gajah	0	6,20 a	8,60 a	9,00 a
	100	5,00 b	5,00 b	5,00 b
	200	5,00 b	5,00 b	5,00 b
	400	5,00 b	5,00 b	5,00 b
	600	5,00 b	5,00 b	5,00 b
	800	5,00 b	5,00 b	5,00 b

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf $\alpha=5\%$. Genotipe bukan merupakan faktor perlakuan.

Kalus relatif tidak mengalami perkembangan diameter ketika dikulturkan dalam media yang mengandung $AlCl_3$ ($100\text{-}800 \text{ mg L}^{-1}$) pada semua genotipe ubi kayu. Akan tetapi, respon perubahan warna kalus setiap genotipe terhadap adanya $AlCl_3$ dalam media kultur

menunjukkan perbedaan (Gambar 2). Kalus genotipe UJ 5 dan Adira 4 tidak mengalami perubahan warna ketika dikulturkan dalam media yang mengandung AlCl_3 hingga 12 MSK. Warna kalus pada media yang mengandung AlCl_3 hingga 800 mg L^{-1} relatif sama dengan warna kalus pada media tanpa AlCl_3 (0 mg L^{-1}) yaitu berwarna putih kekuningan. Hal yang berbeda ditunjukkan oleh kalus genotipe Jame-jame dan Gajah. Warna kalus kedua genotipe tersebut mengalami perubahan ketika dikulturkan dalam media yang mengandung AlCl_3 ($100\text{-}800 \text{ mg L}^{-1}$). Kalus yang berwarna putih kekuningan ketika dikulturkan dalam media 0 mg L^{-1} AlCl_3 mengalami perubahan warna menjadi kuning kecokelatan hingga coklat ketika dikulturkan dalam media yang mengandung AlCl_3 ($100\text{-}800 \text{ mg L}^{-1}$). Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama kalus berada dalam media seleksi maka pertambahan diameter kalus akan semakin menurun dan kalus mengalami perubahan warna. Hasil percobaan ini sesuai dengan penelitian Baogui *et al.* (2010) yang menunjukkan bahwa tingkat keracunan Al pada tanaman kedelai tergantung pada konsentrasi dan waktu dari lamanya perlakuan.



Gambar 2. Kalus hasil seleksi *in vitro* menggunakan AlCl_3 pada genotipe Adira 4 (a-c) dan Jame-jame (d-f) di media: (a dan d) MS + 0 mg L^{-1} AlCl_3 , (b dan e) MS + 400 mg L^{-1} AlCl_3 , (c dan f) MS + 800 mg L^{-1} AlCl_3 saat 12 MSK. Bar = 1 cm.

Perlakuan taraf konsentrasi AlCl_3 berpengaruh nyata terhadap skor kematian kalus pada semua genotipe (Tabel 3). Saat 12 MSK skor kematian kalus tertinggi pada genotipe Jame-jame dan Gajah diperoleh ketika kalus dikulturkan dalam media yang mengandung AlCl_3 dengan konsentrasi 600 mg L^{-1} yaitu dengan skor 3,60. Pada genotipe UJ 5 dan Adira 4, penanaman kalus dalam media yang mengandung AlCl_3 dengan konsentrasi hingga 800 mg L^{-1} hanya mencapai skor 2,80. Genotipe UJ 5 dan Adira 4 relatif lebih tahan terhadap AlCl_3 hingga konsentrasi 800 mg L^{-1} dibandingkan dengan genotipe Jame-jame dan Gajah.

Tabel 3. Skor kematian kalus ubi kayu genotipe Jame-jame, UJ 5, Adira 4, dan Gajah

Genotipe	Umur kultur (MSK)
----------	-------------------

	Konsentrasi AlCl ₃ (mg L ⁻¹)	4		8		12	
		Median	Z	Median	Z	Median	Z
Jame- jame	0	2,80	-4,89	2,70	- 5,66	2,60	- 6,04
	100	2,80	0,22	2,80	0,14	2,80	- 0,48
	200	2,80	1,31	3,20	1,77	3,20	0,71
	400	2,80	-0,07	2,80	0,50	3,00	0,90
	600	3,20	2,67	3,20	2,65	3,60	3,74
	800	2,80	0,95	2,80	0,84	3,00	1,34
	P-Value		**		**		**
UJ-5	0	2,80	-1,98	2,80	- 2,77	2,80	- 2,77
	100	2,80	0,31	2,80	0,43	2,80	0,43
	200	2,80	0,52	2,80	0,73	2,80	0,73
	400	2,80	0,31	2,80	0,43	2,80	0,43
	600	2,80	0,52	2,80	0,73	2,80	0,73
	800	2,80	0,52	2,80	0,73	2,80	0,73
	P-Value		**		**		**
Adira 4	0	2,20	-6,09	2,20	- 6,13	1,90	- 6,15
	100	2,80	1,25	2,80	- 0,75	2,80	- 0,78
	200	2,80	1,07	2,80	0,99	2,80	0,94
	400	2,80	1,28	2,80	1,63	2,80	1,57
	600	2,80	1,33	2,80	2,20	2,80	2,43
	800	2,80	1,56	2,80	2,15	2,80	2,08
	P-Value		**		**		**
Gajah	0	2,80	-3,72	2,20	- 4,28	2,20	- 4,91
	100	2,80	-0,83	2,80	- 0,77	2,80	- 0,69
	200	3,20	1,87	3,20	0,49	3,20	0,45
	400	2,80	-0,18	3,00	- 0,24	3,00	- 0,21
	600	3,20	2,41	3,60	2,90	3,60	3,17
	800	2,80	0,12	3,20	1,59	3,20	1,91
	P-Value		**		**		**

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata ($p < 0.01$) berdasarkan uji *Kruskal Wallis*.

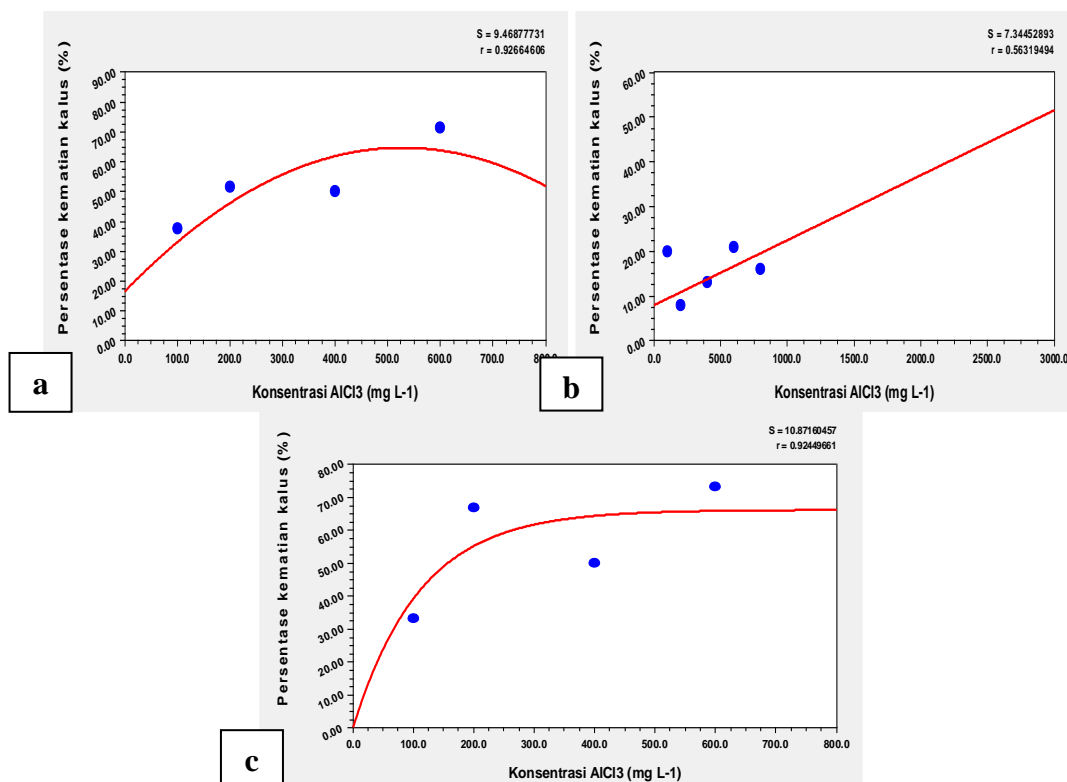
Berdasarkan pengamatan diameter kalus dan skor kematian kalus dengan menggunakan program *CurveExpert* diperoleh nilai *lethal concentration* 20 (LC₂₀) dan LC₅₀ pada masing-masing genotipe (Tabel 4 dan Gambar 3). Genotipe Jame-jame dan Gajah memiliki kisaran nilai LC₂₀ dan LC₅₀ berturut-turut 19,39-236,37 dan 39,99-156,54. Kisaran nilai LC₂₀ dan LC₅₀ pada genotipe Adira 4 yaitu 831,88-2897,10. Kisaran nilai LC₂₀ dan LC₅₀ pada genotipe Adira

4 ini melebihi konsentrasi AlCl_3 yang digunakan dalam percobaan. Pada genotipe UJ 5, kisaran nilai LC_{20} dan LC_{50} tidak diperoleh. Hal ini dimungkinkan karena pertumbuhan dan perubahan warna kalus dalam media dengan konsentrasi AlCl_3 hingga 800 mg L^{-1} memiliki respon yang sama dengan kalus dalam media tanpa pemberian AlCl_3 (0 mg L^{-1}) sehingga mengindikasikan kalus genotipe UJ 5 cukup toleran terhadap pemberian AlCl_3 . Secara umum, berdasarkan hasil LC_{20} dan LC_{50} diketahui bahwa kalus genotipe Jame-jame dan Gajah relatif peka terhadap pemberian AlCl_3 dibandingkan kalus genotipe Adira 4 dan UJ 5. Hal ini berarti genotipe Jame-jame dan Gajah relatif peka terhadap toksisitas aluminium dibandingkan genotipe Adira 4 dan UJ 5.

Tabel 4. Nilai LC_{20} dan LC_{50} AlCl_3 pada kalus ubi kayu genotipe Jame-jame, UJ 5, Adira 4, dan Gajah

Genotipe	LC_{20}	LC_{50}	Kurva Respon
Jame-jame	19,39	236,37	Quadratic fit
UJ 5	—	—	—
Adira 4	831,88	2897,10	Linear fit
Gajah	39,99	156,54	Exponential association

Keterangan: — = nilai belum teridentifikasi



Gambar 3. Kurva respon LC_{20} dan LC_{50} terhadap perlakuan konsentrasi AlCl_3 pada kalus ubi kayu genotipe: (a) Jame-jame, (b) Adira 4, dan (c) Gajah

KESIMPULAN

Seleksi *in vitro* terhadap cekaman aluminium dilakukan dengan menggunakan agen seleksi $AlCl_3$. Berdasarkan hasil seleksi *in vitro* diketahui bahwa genotipe Jame-jame dan Gajah relatif peka terhadap toksisitas aluminium dibandingkan genotipe Adira 4 dan UJ 5. Hal ini dapat dilihat dari kepekaan kalus genotipe Jame-jame dan Gajah terhadap pemberian $AlCl_3$ dibandingkan kalus genotipe Adira 4 dan UJ 5.

DAFTAR PUSTAKA

- Baogui, D., N. Hai, Z. Zhisheng, Y. Cunyi. 2010. Effects of aluminum on superoxide dismutase and peroxidase activities, and lipid peroxidation in the roots and calluses of soybeans differing in aluminum tolerance. *Acta Physiol Plant.* 32(5):883-890.
- Jain, M.S. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica.* 118:153-166.
- Kochian, L.V., M.A. Pineros, O.A. Hoekenga. 2005. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil.* 274:175–195.
- Mawardi, I. 2006. Kajian pembentukan kelembagaan untuk pengendalian konversi dan pengembangan lahan, peran dan fungsinya. *J Tek Ling.* 7(2):206-211.
- Roy, B., A.B. Mandal. 2005. Towards development of Al-toxicity tolerant lines in indica rice by exploiting somaclonal variation. *Euphytica.* 145:221–227.
- Suprpto, A. 2002. Land and water resources development in Indonesia. *Dalam Investment in land and water. Proceedings of the Regional Consultation, FAO.*
- Walpole, R.E. 1995. Pengantar statistika ed ke-3. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.