

INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK BEBERAPA GENOTIPE UBI KAYU (*Manihot esculenta* Crantz.)

Oleh : Candra Catur Nugroho^{*)}

ABSTRAK

Embriogenesis somatik merupakan salah satu tahapan penting dalam perbanyakan dan perbaikan tanaman ubi kayu. Percobaan ini bertujuan untuk menginduksi terbentuknya embrio somatik dari eksplan daun muda, tunas pucuk, dan petiol pada delapan jenis media induksi kalus embriogenik. Penelitian terdiri atas empat percobaan yang terpisah, masing-masing menggunakan genotipe UJ 5, Jame-jame, Gajah, and Adira 4 sebagai bahan tanam (eksplan). Hasil percobaan menunjukkan bahwa eksplan daun muda dan tunas pucuk yang dikulturkan dalam media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D dan MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA memberikan jumlah dan persentase eksplan membentuk kalus tertinggi, waktu muncul kalus tercepat, pertumbuhan kalus tertinggi, dan diameter kalus tertinggi.

Kata kunci: 2.4-D, embriogenesis somatik, NAA, ubi kayu

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is one of the important steps in the *in vitro* propagation and crop improvement of cassava. The experiment was aimed to induce the formation of somatic embryos from immature leaves, shoot tips, and petioles explants on eight types of embryogenic callus induction medium. The research consisted of four experiments, each using UJ 5, Jame-jame, Gajah, and Adira 4 genotypes as explants. The results showed that immature leaves and shoot tips cultured on the MS + 20 g L⁻¹ sucrose + 8 mg L⁻¹ 2.4-D medium and MS + 20 g L⁻¹ sucrose + 10 mg L⁻¹ NAA medium showed the highest number and percentage of explants forming callus, fastest initiation of callus, highest callus growth, and highest diameter of callus.

Key word : Cassava, 2.4-D, NAA, somatic embryogenesis

PENDAHULUAN

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) merupakan salah satu jenis tanaman pangan tropis penting yang dimanfaatkan untuk konsumsi pangan manusia, pakan ternak dan bahan baku industri. Penelitian mengenai embriogenesis somatik ubi kayu telah banyak dilaporkan baik di dalam negeri (Sudarmonowati dan Henshaw, 1996; Priadi dan Sudarmonowati 2006) maupun luar negeri (Ibrahim *et al.* 2008; Osorio *et al.*, 2012; Opabode *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2014).

^{*)} Dosen Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Unika

Namun demikian, penelitian embriogenesis somatik ini belum diaplikasikan untuk perbanyakkan skala luas karena frekuensi induksi kalus dan regenerasinya relatif rendah (Wongtiem *et al.*, 2011).

Penelitian *in vitro* ubi kayu difokuskan diantaranya pada propagasi klonal dan teknologi transformasi genetik untuk memperoleh sifat-sifat yang diinginkan (Thro *et al.*, 1999). Jaringan embriogenik telah digunakan sebagai target transformasi genetik maupun regenerasi tanaman ubi kayu transgenik (Taylor *et al.*, 2001). Kalus embriogenik adalah materi yang efektif untuk transformasi genetik melalui teknik *particle bombardment* maupun *Agrobacterium*. Joseph *et al.* (2000) juga menggunakan kalus embriogenik sebagai bahan penelitian induksi mutasi pada *Manihot glaziovii* Muell. Arg. melalui iradiasi sinar gamma. Eksplan yang berasal dari jaringan somatik seperti tunas pucuk dan daun juga dapat digunakan untuk inisiasi sistem regenerasi tanaman yang efisien. Oleh karena itu, Szabados *et al.* (1987) menggunakan tunas pucuk dan daun muda ubi kayu yang berasal dari kultur *in vitro* sebagai eksplan untuk induksi pembentukan embriogenesis somatik. Kalus embriogenik juga telah berhasil diinduksi dari daun pucuk muda kerabat ubi kayu penghasil getah yaitu *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (Joseph *et al.*, 2000).

Embriogenesis somatik merupakan proses yang sangat efisien untuk mikropropagasi dan regenerasi beberapa genotipe ubi kayu karena memungkinkan meningkatkan laju multiplikasi dan produksi embrio yang mampu berkembang menjadi tanaman utuh (Ibaraki dan Murata, 2001). Sumber dan jenis eksplan awal serta komposisi media dan zat pengatur tumbuh jenis auksin merupakan faktor penting dalam hal embriogenesis somatik ubi kayu (Rossin dan Rey, 2011). Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa picloram dan 2,4-D merupakan zat pengatur tumbuh yang paling sering digunakan untuk induksi embriogenesis pada tanaman ubi kayu (Hankoua *et al.*, 2006; Atehnkeng *et al.*, 2006; Rossin dan Rey, 2011). Hankoua *et al.* (2006) melaporkan bahwa 12 mg L⁻¹ picloram mampu menginduksi terbentuknya embrio somatik secara efisien pada sejumlah kultivar ubi kayu Afrika. Atehnkeng *et al.* (2006) meneliti beberapa varietas ubi kayu Afrika dan memperoleh hasil embriogenik serupa dengan menggunakan dua konsentrasi picloram (8 dan 12 mg L⁻¹). Rossin dan Rey (2011) melaporkan bahwa embrio somatik kultivar MT116 dihasilkan ketika tunas pucuk dan daun muda dikulturkan di media yang mengandung picloram dan daun muda yang dikulturkan di media yang mengandung 2,4-D. Beberapa penelitian tersebut menunjukkan bahwa kapasitas pembentukan embrio somatik tergantung pada genotipe, jenis eksplan, dan komposisi media.

Proses induksi, maturasi, perkecambahan hingga regenerasi embrio somatik ubi kayu relatif sulit dilakukan. Uzelac *et al.* (2007) menyatakan bahwa rendahnya frekuensi pematangan dan perkecambahan embrio somatik menjadi faktor pembatas dalam aplikasi embriogenesis somatik untuk perbaikan sejumlah spesies tanaman. Embriogenesis somatik pada ubi kayu sangat dipengaruhi oleh genotipe tanaman (*genotype specific*). Tidak semua kultivar atau genotipe ubi kayu responsif terhadap pembentukan embriogenesis somatik. Oleh sebab itu, sumber dan jenis eksplan awal serta komposisi media dan konsentrasi zat pengatur tumbuh merupakan faktor penting dalam pembentukan embriogenesis somatik ubi kayu. Hal ini sesuai dengan penelitian Rossin dan Rey (2011) yang melaporkan bahwa penggunaan eksplan tunas aksilar ubi kayu pada media yang mengandung picloram menghasilkan embrio somatik yang lebih tinggi dibandingkan jika menggunakan eksplan daun muda pada media picloram dan eksplan daun muda pada media 2,4-D.

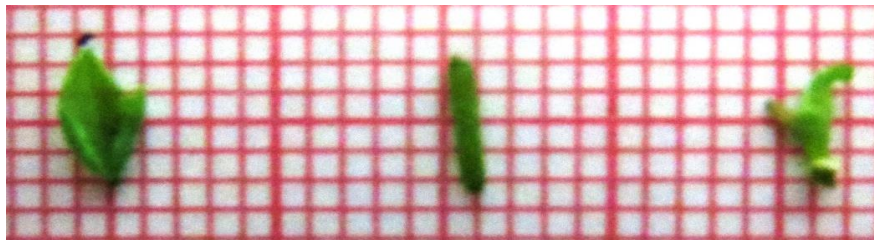
Penelitian ini bertujuan untuk menginduksi kalus embriogenik pada beberapa genotipe ubi kayu.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dalam jangka waktu 2 bulan mulai bulan Maret sampai April 2014 sejak persiapan media kultur, induksi kalus embriogenik hingga pengambilan data terakhir. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan 3 Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Penelitian ini terdiri atas empat sub percobaan yang terpisah, masing-masing menggunakan genotipe Adira 4, UJ 5, Jame-jame, dan Gajah sebagai bahan tanam (eksplan). Bahan tanam (eksplan) yang digunakan adalah daun muda, tunas pucuk, dan petiol planlet ubi kayu genotipe UJ 5, Jame-jame, Gajah dan Adira 4 (Gambar 1). Bahan lain yang digunakan meliputi sukrosa dan gelrite. Media dasar yang digunakan yaitu media MS (Murashige and Skoog) dan GD (Gresshoff and Doy) serta zat pengatur tumbuh 2.4-D, picloram, dan NAA. Peralatan yang digunakan adalah Laminar Air Flow Cabinet (LAFC), autoclave, alat tanam, cawan petri, timbangan, kamera digital, dan mikroskop cahaya.

Percobaan disusun berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama yaitu jenis eksplan yang terdiri atas 3 jenis yaitu daun muda, tunas pucuk, dan petiol. Faktor kedua yaitu komposisi media induksi kalus embriogenik yang terdiri atas 8 jenis media (Tabel 1). Kombinasi dari dua faktor tersebut menghasilkan 24 kombinasi perlakuan yang masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali, sehingga terdapat 240 satuan percobaan. Setiap ulangan terdiri atas satu botol kultur (diameter 5 cm) yang berisi dua eksplan. Kultur diinkubasi di tempat gelap, pada suhu 25 °C selama 4 minggu.



Gambar 1. Eksplan yang digunakan: (D) daun muda, (P) petiol, dan (T) tunas pucuk dengan ukuran $\pm 4-5$ mm

Tabel 1. Komposisi media induksi kalus embriogenik ubi kayu

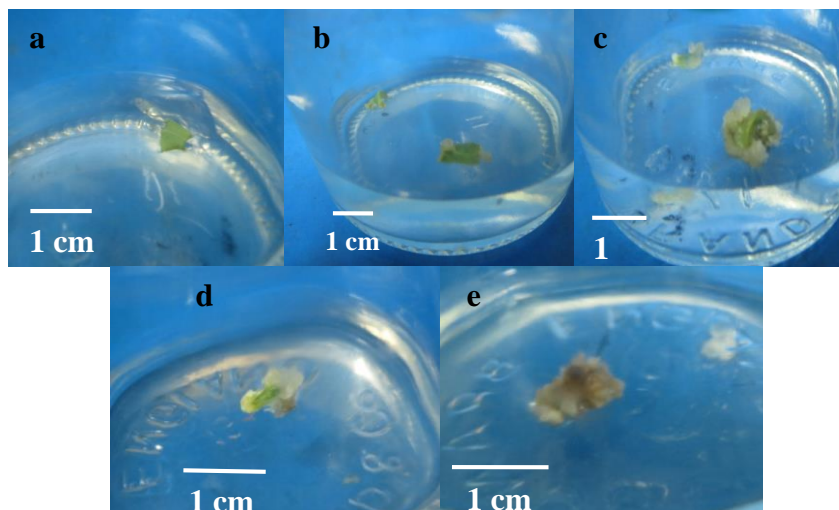
Kode Media	Komposisi Media
II	MS + 40 g L ⁻¹ sukrosa + 10 mg L ⁻¹ picloram + 6 mg L ⁻¹ NAA + 4

I2	$\mu\text{M CuSO}_4$ GD + 40 g L ⁻¹ sukrosa + 10 mg L ⁻¹ picloram + 6 mg L ⁻¹ NAA + 4 $\mu\text{M CuSO}_4$
I3	MS + 20 g L ⁻¹ sukrosa + 12 mg L ⁻¹ picloram + 2 $\mu\text{M CuSO}_4$
I4	MS + 20 g L ⁻¹ sukrosa + 8 mg L ⁻¹ 2.4-D + 2 $\mu\text{M CuSO}_4$
I5	MS + 20 g L ⁻¹ sukrosa + 8 mg L ⁻¹ 2.4-D
I6	GD + 20 g L ⁻¹ sukrosa + 8 mg L ⁻¹ 2.4-D
I7	MS + 20 g L ⁻¹ sukrosa + 10 mg L ⁻¹ NAA
I8	GD + 20 g L ⁻¹ sukrosa + 10 mg L ⁻¹ NAA

Keterangan: MS = media dasar *Murashige and Skoog*; GD= media dasar *Gresshoff and Doy*. Media dipadatkan menggunakan 0,25% (w/v) gelrite.

Pengamatan dilakukan untuk melihat pertumbuhan dan perkembangan kalus yang terbentuk selama 1-4 minggu. Peubah yang diamati meliputi:

1. Jumlah dan persentase eksplan membentuk kalus. Pengamatan dilakukan setiap minggu hingga 4 minggu setelah kultur (MSK).
2. Waktu terbentuk kalus, diamati setiap hari selama periode pengamatan berlangsung.
3. Pertumbuhan kalus
Pengamatan dilakukan dengan skoring setiap minggu hingga 4 MSK. Skor pertumbuhan kalus (Gambar 2) adalah sebagai berikut:
Skor 1 : eksplan tidak membentuk kalus
Skor 2 : $\leq 25\%$ kalus menutupi eksplan
Skor 3 : $> 25\%$ - 50% kalus menutupi eksplan
Skor 4 : $> 50\%$ - 75% kalus menutupi eksplan
Skor 5 : $> 75\%$ - 100% kalus menutupi eksplan
4. Diameter kalus. Pengamatan dilakukan setiap minggu hingga 4 MST.
5. Jumlah eksplan membentuk kalus embriogenik fase globular



Gambar 2. Skor pertumbuhan kalus: (a) Skor 1, (b) Skor 2, (c) Skor 3, (d) Skor 4, dan (e) Skor 5 pada eksplan daun muda genotipe Jame-jame

Data kuantitatif 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. Data skoring diuji menggunakan uji peringkat *Kruskal Wallis* (Walpole, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pengamatan terlihat bahwa persentase eksplan membentuk kalus dari empat genotipe (UJ 5, Jame-jame, Gajah, dan Adira 4) cukup tinggi pada empat jenis media (I5, I6, I7, dan I8) dan jenis eksplan yang digunakan (daun, petiol dan tunas pucuk) yaitu > 50%. Secara umum, persentase eksplan membentuk kalus > 80% pada semua genotipe diperoleh pada media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I5) dan MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I7) untuk semua jenis eksplan yang digunakan (Tabel 2). Tingginya persentase eksplan membentuk kalus pada media I5 dan I7 diduga disebabkan oleh adanya kandungan 2.4-D dan NAA dalam masing-masing media. 2.4-D dan NAA merupakan jenis auksin terbanyak yang digunakan dalam induksi embriogenesis somatik (Jimenez 2005). Fletcher *et al.* (2011) melaporkan bahwa penggunaan eksplan daun yang dikulturkan dalam media yang mengandung 8 mg L⁻¹ 2.4-D menghasilkan persentase kalus tertinggi pada semua kultivar ubi kayu yang dicobakan.

Tabel 2. Persentase eksplan membentuk kalus pada ubi kayu genotipe UJ 5, Jame-jame, Gajah, dan Adira 4 saat 4 MSK

Komposisi media	Jenis eksplan	Genotipe			
		UJ-5	Jame-jame	Gajah	Adira 4
	%.....			
I1	Daun	0,0	5,0	0,0	10,0
	Petiol	0,0	0,0	0,0	0,0
	Tunas	0,0	10,0	0,0	20,0
I2	Daun	0,0	0,0	0,0	0,0
	Petiol	0,0	5,0	0,0	11,8
	Tunas	0,0	70,0	44,4	50,0
I3	Daun	0,0	0,0	0,0	0,0
	Petiol	5,0	5,0	0,0	25,0
	Tunas	10,0	50,0	10,0	50,0
I4	Daun	0,0	5,6	0,0	14,3
	Petiol	25,0	6,3	0,0	27,8
	Tunas	10,0	44,4	50,0	44,4
I5	Daun	100,0	100,0	95,0	89,5
	Petiol	95,0	100,0	100,0	88,9
	Tunas	100,0	100,0	88,9	66,7
I6	Daun	54,6	58,8	20,0	53,3
	Petiol	41,7	75,0	44,4	52,6
	Tunas	58,3	85,7	90,0	66,7
I7	Daun	95,0	94,4	90,0	93,3
	Petiol	100,0	100,0	90,0	100,0

	Tunas	100,0	100,0	100,0	100,0
	Daun	75,0	88,9	35,0	58,8
I8	Petiol	83,3	81,3	50,0	44,4
	Tunas	83,3	100,0	100,0	85,7

Keterangan : I1-I8 merupakan komposisi media induksi kalus embriogenik seperti yang tertera pada Tabel 1.

Uji kontras ortogonal dilakukan untuk membandingkan persentase pembentukan kalus antar komponen dalam media yang digunakan dalam penelitian. Untuk membandingkan pengaruh media dasar MS dan GD, uji kontras ortogonal dilakukan terhadap komposisi media yang mengandung MS (I1, I3, I4, I5) vs GD (I2, I6, I8). Selain itu, dilakukan juga perbandingan antara media MS vs GD dengan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang sama (I1 vs I2, I5 vs I6, I7 vs I8), serta perbandingan antar jenis zat pengatur tumbuh seperti picloram vs 2.4-D (I3 vs I4) (Tabel 3). Berdasarkan hasil analisis, persen pembentukan kalus pada media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I5) lebih tinggi dibandingkan pada media GD + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I6) pada semua genotipe. Hal yang sama terjadi pada media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I7) yang dibandingkan dengan media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I8), dimana persen pembentukan kalus pada media I7 lebih tinggi dibandingkan pada media I8 pada tiga genotipe (UJ 5, Gajah, dan Adira 4). Persen pembentukan kalus tidak berbeda antara media dasar MS dan GD kecuali pada genotipe Jame-jame dimana persen pembentukan kalus pada media dasar GD lebih tinggi dibandingkan pada media dasar MS.

Tabel 3. Uji kontras ortogonal terhadap persentase pembentukan kalus ubi kayu

Genotipe		MS vs GD	I1 vs I2	I3 vs I4	I5 vs I6	I7 vs I8
UJ-5	P-value	tn	tn	tn	**	**
	Rata-rata	(43% vs 44%)	(0% vs 0%)	(5% vs 12%)	(98,3% vs 51,5%)	(98,3% vs 80,6%)
Jame-jame	P-value	**	**	tn	**	tn
	Rata-rata	(48% vs 63%)	(5% vs 25%)	(18% vs 19%)	(100% vs 73,2%)	(98,2% vs 90,1%)
Gajah	P-value	tn	**	*	**	**
	Rata-rata	(42% vs 43%)	(0% vs 15%)	(3% vs 17%)	(94,6% vs 51,5%)	(93,3% vs 61,7%)
Adira 4	P-value	tn	tn	tn	**	**
	Rata-rata	(49% vs 47%)	(10% vs 21%)	(25% vs 29%)	(81,7% vs 57,5%)	(97,8% vs 62,9%)

Keterangan: tn = tidak berbeda nyata ($p > 0.05$); * = berbeda nyata ($p < 0.05$); ** = berbeda sangat nyata ($p < 0.01$); MS = media dasar *Murashige and Skoog*; GD = media dasar *Gresshoff and Doy*; I1-I8 merupakan komposisi media induksi kalus embriogenik seperti yang tertera pada Tabel 1.

Interaksi jenis media induksi kalus embrio somatik (ES) dan jenis eksplan berpengaruh nyata terhadap waktu muncul kalus pada semua genotipe (Tabel 4). Genotipe UJ 5, Jame-jame, dan Gajah memiliki waktu muncul kalus tercepat yang relatif sama yaitu berturut-turut 6; 5,5; dan 5,8 hari pada media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I7) dengan menggunakan eksplan daun (UJ 5) dan tunas (Jame-jame dan Gajah). Waktu muncul kalus tercepat (5,3 hari) pada genotipe Adira 4 diperoleh pada media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I5) dengan

menggunakan eksplan tunas. Waktu muncul kalus pada penelitian ini relatif lebih cepat dibandingkan penelitian Fletcher *et al.* (2011) yang melaporkan bahwa waktu muncul kalus tercepat terjadi saat 7 hari setelah kultur (HSK) ketika eksplan daun dikulturkan dalam media yang mengandung 8 mg L⁻¹ 2.4-D.

Tabel 4. Waktu terbentuknya kalus (hari) pada empat genotipe ubi kayu

Komposisi media	Jenis eksplan	Genotipe			
		UJ-5	Jame-jame	Gajah	Adira 4
I1	Daun	—	12,00 ^{bc}	—	10,50 ^{ab}
	Petiol	—	—	—	—
	Tunas	—	13,00 ^b	—	10,00 ^{ab}
I2	Daun	—	—	—	—
	Petiol	—	10,00 ^{bcdef}	—	11,00 ^{ab}
	Tunas	—	9,86 ^{bcdef}	7,25 ^{efg}	10,00 ^{ab}
I3	Daun	—	—	—	—
	Petiol	12,00 ^{bcd}	10,00 ^{bcdef}	—	10,00 ^{ab}
	Tunas	—	10,00 ^{bcdef}	10,00 ^{def}	7,40 ^{bc}
I4	Daun	—	19,00 ^a	—	9,50 ^{abc}
	Petiol	14,00 ^{abc}	12,00 ^{bc}	—	11,25 ^{ab}
	Tunas	17,00 ^a	11,75 ^{bcd}	15,20 ^a	7,50 ^{bc}
I5	Daun	6,85 ^e	8,25 ^{bcdef}	9,42 ^{defg}	8,00 ^{bc}
	Petiol	6,74 ^e	6,81 ^{def}	8,56 ^{defg}	7,00 ^{bc}
	Tunas	6,10 ^e	5,90 ^f	6,25 ^{fg}	5,33 ^c
I6	Daun	11,25 ^{cd}	12,30 ^{bc}	14,50 ^{ab}	11,25 ^{ab}
	Petiol	14,90 ^{ab}	11,75 ^{bcd}	11,00 ^{bcd}	12,55 ^a
	Tunas	11,71 ^{bcd}	10,83 ^{bcd}	11,33 ^{bcd}	9,00 ^{abc}
I7	Daun	6,00 ^e	7,42 ^{cdef}	7,67 ^{defg}	8,00 ^{bc}
	Petiol	6,70 ^e	6,56 ^{ef}	7,78 ^{defg}	8,00 ^{bc}
	Tunas	6,40 ^e	5,50 ^f	5,78 ^g	7,75 ^{bc}
I8	Daun	10,17 ^d	11,36 ^{bcd}	14,14 ^{abc}	11,20 ^{ab}
	Petiol	13,45 ^{bcd}	10,07 ^{bcd}	14,56 ^{ab}	11,25 ^{ab}
	Tunas	11,30 ^{cd}	8,57 ^{bcdef}	10,60 ^{cde}	8,50 ^{abc}

Keterangan: — = kalus tidak terbentuk hingga akhir pengamatan (4 MSK); I1-18 merupakan komposisi media induksi kalus embriogenik seperti yang tertera pada Tabel 1. 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.

Uji kontras ortogonal dilakukan untuk membandingkan waktu muncul kalus antar komponen dalam media yang digunakan dalam penelitian (Tabel 5). Berdasarkan hasil analisis, waktu muncul kalus pada media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I5) dan MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I7) lebih cepat dibandingkan pada media GD + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I6) dan GD + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I8) pada semua genotipe. Waktu muncul kalus pada media dasar MS lebih cepat dibandingkan pada media dasar GD pada genotipe UJ 5, Gajah, dan Adira 4.

Tabel 5. Uji kontras ortogonal terhadap waktu terbentuknya kalus (HSK) ubi kayu

Genotipe		MS vs GD	I1 vs I2	I3 vs I4	I5 vs I6	I7 vs I8
UJ-5	P-value	**	—	tn	**	**
	Rata-rata	(9,09 vs 12,13)		(12,00 vs 15,50)	(6,56 vs 12,62)	(6,37 vs 11,64)
Jame- jame	P-value	tn	tn	*	**	**
	Rata-rata	(9,86 vs 10,59)	(12,50 vs 9,93)	(10,00 vs 14,25)	(6,99 vs 11,63)	(6,49 vs 10,00)
Gajah	P-value	**	—	tn	**	**
	Rata-rata	(8,83 vs 11,91)		(10,00 vs 15,20)	(8,08 vs 12,28)	(7,08 vs 13,10)
Adira 4	P-value	**	tn	tn	**	**
	Rata-rata	(8,48 vs 10,59)	(10,25 vs 10,50)	(8,70 vs 9,42)	(6,78 vs 10,93)	(7,92 vs 10,32)

Keterangan: tn = tidak berbeda nyata ($p>0.05$); * = berbeda nyata ($p<0.05$); ** = berbeda sangat nyata ($p<0.01$); — = uji kontras tidak teranalisis karena data salah satu kelompok yang dibandingkan tidak ada; MS = media dasar *Murashige and Skoog*; GD = media dasar *Gresshoff and Doy*; I1-I8 merupakan komposisi media induksi kalus embriogenik seperti yang tertera pada Tabel 1.

Interaksi jenis media induksi kalus ES dan jenis eksplan berpengaruh nyata terhadap skor pertumbuhan kalus pada semua genotipe (Tabel 6). Skor pertumbuhan kalus tertinggi (skor 5) diperoleh pada media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I5) dan MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I7) dengan menggunakan semua jenis eksplan pada semua genotipe. Kalus yang terbentuk pada media I5 dan I7 sebagian besar menutupi semua bagian eksplan yang dikulturkan. Hal ini berarti penambahan 2.4-D dan NAA pada media dasar MS memberikan respon yang lebih baik terhadap pertumbuhan kalus.

Interaksi jenis media induksi kalus ES dan jenis eksplan berpengaruh nyata terhadap diameter kalus pada semua genotipe (Tabel 7). Diameter kalus tertinggi diperoleh dari jenis eksplan daun yang dikulturkan dalam media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I7). Respon diameter kalus tertinggi ini terjadi di semua genotipe. Kalus yang terbentuk dari setiap jenis eksplan menunjukkan struktur yang berbeda. Kalus yang berasal dari eksplan daun muda dan tunas pucuk berstruktur remah, sedangkan kalus yang berasal dari eksplan petiol berstruktur kompak dan keras (Gambar 3).

Tabel 6. Skor pertumbuhan kalus ubi kayu genotipe UJ 5, Jame-jame, Gajah, dan Adira 4 pada 4 MSK

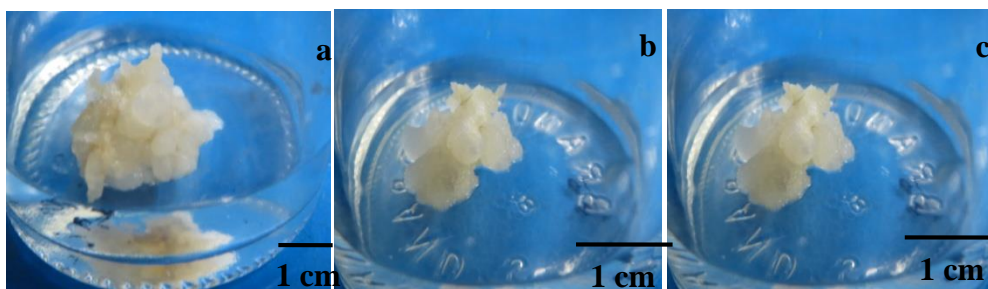
Perlakuan	UJ-5		Jame-jame		Gajah		Adira 4		
	Median	Z	Median	Z	Median	Z	Median	Z	
I1	D	1	-3,39	1	-3,60	1	-3,00	1	-3,11
	P	1	-3,39	1	-3,81	1	-3,00	1	-3,60
	T	1	-2,37	1	-2,06	1	-2,09	1	-1,58
I2	D	1	-3,73	1	-3,50	1	-3,00	1	-3,30
	P	1	-3,73	1	-3,38	1	-3,00	1	-2,55
	T	1	-2,60	4	0,55	1	0,04	2	-0,04
I3	D	1	-3,39	1	-3,39	1	-3,00	1	-3,30
	P	1	-2,97	1	-3,38	1	-3,00	1	-1,61
	T	1	-1,79	2	-0,23	1	-1,51	3	0,49
I4	D	1	-3,39	1	-3,36	1	-3,00	1	-2,21
	P	1	-1,65	1	-2,91	1	-3,00	1	-1,34
	T	1	-2,03	1	-0,51	2	0,41	1	-0,13
I5	D	5	4,89	5	4,22	5	4,93	5	3,83
	P	5	4,47	5	4,22	5	5,06	5	3,84
	T	5	3,17	5	3,31	5	2,92	5	1,42
I6	D	4	1,02	3	0,08	1	-1,65	4	0,11
	P	1	-0,10	5	1,93	1	0,67	5	1,19
	T	3	0,87	5	1,43	4,5	2,30	4	0,90
I7	D	5	4,47	5	4,04	5	4,51	5	3,82
	P	5	4,89	5	4,22	5	5,06	5	4,74
	T	5	3,41	5	2,95	5	3,54	5	3,12
I8	D	4	1,86	4,5	1,94	1	-1,14	3	-0,25
	P	5	3,57	5	2,55	2,5	0,96	1	-0,19
	T	5	2,28	5	2,76	5	3,35	5	1,93
P-Value	**		**		**		**		

Keterangan: D = daun muda, P = petiol, T = tunas pucuk; ** = berbeda sangat nyata ($p < 0.01$) berdasarkan uji *Kruskal Wallis*; I1-I8 merupakan komposisi media induksi kalus embriogenik seperti yang tertera pada Tabel 1. Genotipe bukan merupakan faktor perlakuan.

Tabel 7. Diameter kalus (mm) ubi kayu genotipe UJ 5, Jame-jame, Gajah, dan Adira 4 pada 4 MSK

Komposisi media	Jenis eksplan	Genotipe			
		UJ 5	Jame-jame	Gajah	Adira 4
I1	Daun	0,00 ^c	5,00 ^{defg}	0,00 ^e	3,00 ^{de}
	Petiol	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ^e	0,00 ^e
	Tunas	0,00 ^c	5,00 ^{defg}	0,00 ^e	4,00 ^{de}
I2	Daun	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ^e	0,00 ^e
	Petiol	0,00 ^c	4,00 ^{efg}	0,00 ^e	4,50 ^{de}
	Tunas	0,00 ^c	4,29 ^{efg}	3,75 ^{de}	4,40 ^{de}
I3	Daun	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ^e	0,00 ^e
	Petiol	8,00 ^{bc}	4,00 ^{efg}	0,00 ^e	3,40 ^{de}
	Tunas	7,00 ^{bc}	4,60 ^{efg}	7,00 ^{cde}	5,80 ^{cde}
I4	Daun	0,00 ^c	3,00 ^{fg}	0,00 ^e	3,50 ^{de}
	Petiol	5,40 ^{bc}	4,00 ^{efg}	0,00 ^e	3,40 ^{de}
	Tunas	5,00 ^{bc}	6,33 ^{defg}	4,60 ^{de}	6,50 ^{cde}
I5	Daun	17,15 ^a	15,69 ^{abc}	14,58 ^{ab}	13,24 ^{ab}
	Petiol	8,53 ^{bc}	12,81 ^{abcd}	9,44 ^{abcd}	7,94 ^{bcd}
	Tunas	12,00 ^{ab}	16,40 ^{ab}	15,00 ^{ab}	14,17 ^{ab}
I6	Daun	7,75 ^{bc}	9,90 ^{abcdef}	4,00 ^{de}	8,50 ^{bcd}
	Petiol	6,67 ^{bc}	6,75 ^{cdefg}	5,00 ^{de}	8,09 ^{bcd}
	Tunas	7,71 ^{bc}	8,83 ^{bcdefg}	5,00 ^{de}	7,67 ^{bcd}
I7	Daun	17,32 ^a	18,29 ^a	16,56 ^a	16,43 ^a
	Petiol	8,63 ^b	12,63 ^{abcde}	8,83 ^{bcd}	8,78 ^{bcd}
	Tunas	12,80 ^{ab}	14,25 ^{abcd}	12,56 ^{abc}	11,88 ^{abc}
I8	Daun	6,50 ^{bc}	10,36 ^{abcdef}	3,86 ^{de}	5,90 ^{cde}
	Petiol	5,40 ^{bc}	6,85 ^{cdefg}	4,33 ^{de}	5,50 ^{cde}
	Tunas	6,90 ^{bc}	11,14 ^{abcdef}	6,20 ^{cde}	8,00 ^{bcd}

Keterangan: I1-I8 merupakan komposisi media induksi kalus embriogenik seperti yang tertera pada Tabel 1. 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.



Gambar 3. Struktur kalus ubi kayu genotipe Adira 4 dari eksplan (a) daun muda, (b) tunas pucuk, dan (c) petiol saat 4 MSK

Uji kontras ortogonal dilakukan untuk membandingkan diameter kalus antar komponen dalam media (Tabel 8). Berdasarkan hasil analisis, diameter kalus pada media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I5) dan MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I7) lebih tinggi dibandingkan pada media GD + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I6) dan GD + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I8) pada semua genotipe. Diameter kalus yang dihasilkan berbeda antara media dasar MS dan GD

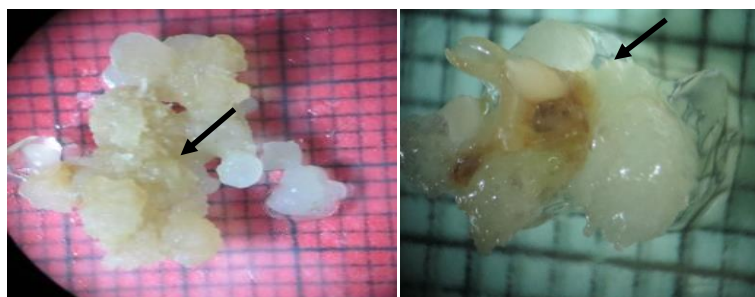
dimana eksplan yang dikulturkan di media dasar MS menghasilkan diameter kalus lebih tinggi dibandingkan jika dikulturkan di media dasar GD.

Tabel 8. Uji kontras ortogonal terhadap diameter kalus ubi kayu pada 4 MSK

Genotipe		MS vs GD	I1 vs I2	I3 vs I4	I5 vs I6	I7 vs I8
UJ-5	P-value	*	tn	tn	**	**
	Rata-rata (mm)	(6,79 vs 4,55)	(0,00 vs 0,00)	(5,00 vs 3,47)	(12,56 vs 7,38)	(12,92 vs 6,27)
Jame-jame	P-value	tn	tn	tn	**	**
	Rata-rata (mm)	(8,13 vs 6,90)	(3,33 vs 2,76)	(2,87 vs 4,44)	(14,97 vs 8,49)	(15,06 vs 9,45)
Gajah	P-value	**	tn	tn	**	**
	Rata-rata (mm)	(5,90 vs 3,57)	(0,00 vs 1,25)	(2,33 vs 1,53)	(13,01 vs 4,67)	(12,65 vs 4,80)
Adira 4	P-value	tn	tn	tn	**	**
	Rata-rata (mm)	(6,80 vs 5,84)	(2,33 vs 2,97)	(3,07 vs 4,47)	(11,78 vs 8,09)	(12,36 vs 6,47)

Keterangan: tn = tidak berbeda nyata ($p > 0.05$); * = berbeda nyata ($p < 0.05$); ** = berbeda sangat nyata ($p < 0.01$); MS = media dasar *Murashige and Skoog*; GD = media dasar *Gresshoff and Doy*; I1-I8 merupakan komposisi media induksi kalus embriogenik seperti yang tertera pada Tabel 1.

Embrio somatik diamati ketika embrio memasuki fase globular (Gambar 4). Pembentukan embrio somatik pada penelitian ini cukup rendah jika dibandingkan dengan penelitian embriogenesis somatik ubi kayu lainnya yang dapat mencapai 80% (Feitosa *et al.*, 2007; Rossin dan Rey, 2011). Embrio somatik yang terbentuk pada penelitian ini kurang dari 50% pada semua genotipe (Tabel 9). Persentase embrio somatik yang cukup tinggi (41,7%) pada genotipe UJ 5 diperoleh dari eksplan daun yang dikulturkan dalam media GD + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I6). Pada genotipe Jame-jame, pembentukan embrio somatik yang cukup tinggi diperoleh dari eksplan daun yang dikulturkan dalam media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I5) yaitu sebesar 30%. Sementara itu, persentase embrio somatik yang cukup tinggi pada genotipe Gajah (33,3%) dan Adira 4 (40%) berturut-turut diperoleh dari eksplan petiol dan daun yang ditanam dalam media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I7). Rendahnya persentase embrio somatik yang dihasilkan diduga karena belum optimalnya media yang digunakan dalam menginduksi embrio somatik pada genotipe UJ 5, Jame-jame, Gajah, dan Adira 4. Tingginya frekuensi dan efisiensi embriogenesis somatik sangat tergantung genotipe (*genotype specific*), dan tidak semua kultivar ubi kayu responsif terhadap pembentukan embriogenesis somatik. Oleh karena itu, diperlukan upaya optimasi dalam pembentukan struktur embriogenik untuk setiap kultivar ubi kayu (Guohua dan Qiusheng, 2002; Atehnkeng *et al.*, 2006).



Gambar 4. Kalus embriogenik ubi kayu genotipe Adira 4 saat 4 MSK. Anak panah menunjukkan embrio somatik fase globular.

Tabel 9. Persentase eksplan membentuk embrio somatik fase globular pada ubi kayu genotipe UJ 5, Jame-jame, Gajah, dan Adira 4

Komposisi media	Jenis eksplan	Genotipe			
		UJ-5	Jame-jame	Gajah	Adira 4
	%.....			
I1	Daun	0,0	0,0	0,0	0,0
	Petiol	0,0	0,0	0,0	0,0
	Tunas	0,0	0,0	0,0	0,0
I2	Daun	0,0	0,0	0,0	0,0
	Petiol	0,0	0,0	0,0	0,0
	Tunas	0,0	0,0	0,0	0,0
I3	Daun	0,0	0,0	0,0	0,0
	Petiol	0,0	0,0	0,0	0,0
	Tunas	0,0	0,0	0,0	0,0
I4	Daun	0,0	0,0	0,0	0,0
	Petiol	0,0	0,0	0,0	0,0
	Tunas	0,0	0,0	0,0	0,0
I5	Daun	20,0	30,0	30,0	26,3
	Petiol	0,0	0,0	22,2	22,2
	Tunas	10,0	0,0	22,2	22,2
I6	Daun	41,7	0,0	0,0	0,0
	Petiol	8,3	0,0	0,0	0,0
	Tunas	16,7	0,0	0,0	0,0
I7	Daun	30,0	20,0	10,0	40,0
	Petiol	0,0	10,0	33,3	5,6
	Tunas	0,0	0,0	20,0	37,5
I8	Daun	16,7	0,0	0,0	0,0
	Petiol	0,0	0,0	0,0	0,0
	Tunas	16,7	0,0	0,0	0,0

Keterangan: I1-I8 merupakan komposisi media induksi kalus embriogenik seperti yang tertera pada Tabel 1.

Uji kontras ortogonal dilakukan untuk membandingkan persentase ES antar komponen dalam media (Tabel 10). Berdasarkan hasil analisis, persen ES pada media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I5) dan MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I7) lebih tinggi dibandingkan pada media GD + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I6) dan GD + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I8) pada semua genotipe kecuali genotipe UJ 5 dimana persen ES pada media I6 lebih tinggi dibandingkan pada media I5. Persen pembentukan ES yang dihasilkan berbeda antara media dasar MS dan GD. Eksplan yang dikulturkan di media dasar MS menghasilkan ES lebih tinggi dibandingkan jika dikulturkan di media dasar GD pada genotipe Jame-jame, Gajah, dan Adira 4. Hal yang berbeda ditunjukkan pada genotipe UJ 5 dimana persen ES pada media dasar GD lebih tinggi dibandingkan pada media dasar MS.

Tabel 10. Uji kontras ortogonal terhadap persentase eksplan membentuk embrio somatik

Genotipe		MS vs GD	I1 vs I2	I3 vs I4	I5 vs I6	I7 vs I8
UJ-5	P-value	*	tn	tn	**	tn
	Rata-rata (%)	(4,0 vs 11,1)	(0,0 vs 0,0)	(0,0 vs 0,0)	(10,0 vs 22,2)	(10,0 vs 11,1)
Jame-jame	P-value	*	tn	tn	**	**
	Rata-rata (%)	(4,0 vs 0,0)	(0,0 vs 0,0)	(0,0 vs 0,0)	(10,0 vs 0,0)	(10,0 vs 0,0)
Gajah	P-value	**	tn	tn	**	**
	Rata-rata (%)	(9,2 vs 0,0)	(0,0 vs 0,0)	(0,0 vs 0,0)	(24,8 vs 0,0)	(21,1 vs 0,0)
Adira 4	P-value	**	tn	tn	**	**
	Rata-rata (%)	(10,3 vs 0,0)	(0,0 vs 0,0)	(0,0 vs 0,0)	(23,6 vs 0,0)	(27,7 vs 0,0)

Keterangan: tn = tidak berbeda nyata ($p > 0.05$); * = berbeda nyata ($p < 0.05$); ** = berbeda sangat nyata ($p < 0.01$); MS = media dasar *Murashige and Skoog*; GD = media dasar *Gresshoff and Doy*; I1-I8 merupakan komposisi media induksi kalus embriogenik seperti yang tertera pada Tabel 1.

KESIMPULAN

Ubi kayu genotipe UJ 5, Jame-jame, Gajah, dan Adira 4 memberikan respon pembentukan kalus embriogenik yang berbeda saat dikulturkan pada sejumlah media induksi kalus dengan menggunakan berbagai jenis eksplan. Berdasarkan persentase pembentukan kalus, waktu muncul kalus, skoring pertumbuhan kalus, diameter kalus, dan persentase embrio somatik menunjukkan bahwa media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 8 mg L⁻¹ 2.4-D (I5) dan MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA (I7) serta eksplan daun muda dan tunas pucuk merupakan media dan eksplan terbaik.

DAFTAR PUSTAKA

- Atehnkeng, J., V.O. Adetimirin, S.Y.C. Ng. 2006. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) germplasm for somatic embryogenic competence. *Afr J Biotechnol.* 5(14):1324-1329.
- Fletcher, E.K.A., T.N.E. Amoako, P. Twumasi. 2011. Effect of 2,4-D, explants type and cultivar on the callogenesis expression of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) in Ghana. *Afr J Biotechnol.* 10(46):9396-9401.
- Guohua, M., X. Qiusheng. 2002. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. *Plant Cell Tiss Org Culture.* 70:281–288.
- Hankoua, B.B., N.J. Taylor, S.Y.C. Ng, I. Fawole, J. Puonti-Kaerlas, C. Padmanabhan, J.S. Yadav, C.M. Fauquet, A.G.O. Dixon, V.N. Fondong. 2006. Production of the first transgenic cassava in Africa via direct shoot organogenesis from friable embryogenic calli and germination of maturing somatic embryos. *Afr J Biotechnol.* 5(19):1700-1712.
- Ibaraki, Y., K. Murata. 2001. Automation of somatic embryo production. *Plant Cell Tiss Org Culture.* 65(3):179-199.
- Ibrahim, A.B., F.F. Heredia, C.B. Pinheiro, F.J.L. Aragao, F.A.P. Campos. 2008. Optimization of somatic embryogenesis and selection regimes for particle bombardment of friable embryogenic callus and somatic cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Afr J Biotechnol.* 7(16):2790-2797.
- Joseph, T., H.H. Yeoh, C.S. Loh. 2000. Somatic embryogenesis, plant regeneration and cyanogenesis in *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (ceara rubber). *Plant Cell Rep.* 19:535-538.
- Opabode, J.T., O.O. Oyelakin, O.A. Akinyemiju, I.L. Ingelbrecht. 2014. Influence of type and age of primary somatic embryo on secondary and cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Br Biotechnol J.* 4(3):254-269.
- Osorio, M., E. Gamez, D. Infante. 2012. Evaluation of cassava plants generated by somatic embryogenesis in different stages of development using molecular markers. *Electron J Biotechnol.* 15:1-11.
- Priadi, D., E. Sudarmonowati. 2006. Pengaruh komposisi media dan ukuran eksplan terhadap pembentukan kalus embriogenik beberapa genotip lokal ubi kayu (*Manihot sculenta* Crantz.). *Biodiversitas.* 7(3):269-272.
- Rossin, C.B., M.E.C. Rey. 2011. Effect of explants source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Mannihot esculenta* Crantz) cultivar. *S Afr J Bot.* 77:59-65.

- Sudarmonowati, E., G.G. Henshaw. 1996. The use of picloram and dicamba to induce somatic embryogenesis in cassava. *Ann Bogor.* 4(1):27-34.
- Szabados, L., R. Hoyos, W. Roca. 1987. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Rep.* 6 (3):248-251.
- Taylor, N.J., M.V. Masona, R. Carcamo, T. Ho, C. Schöpke, C.M. Fauquet. 2001. Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Euphytica.* 120:25-34.
- Thro, A.M., W.M. Roca, J. Restrepo, H. Caballero, S. Poats, R. Escobar, G. Mafla, C. Hernandez. 1999. Can *in vitro* biology have farm-level impact for small-scale cassava farmers in latin America. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 35 (5):382-387.
- Uzelac, B., Ninkovic, A. Smigocki, S. Budimir. 2007. Origin and development of secondary somatic embryos in transformed embryogenic cultures of *Medicago sativa*. *Biol Plant.* 51(1)1-6.
- Vidal, A.M., M.A.P.C. Costa, A.S. Souza, W.A.B. Almeida, F.V.D. Souza. 2014. *In vitro* regeneration and morphogenesis of somatic embryos of cassava. *Rev Ciencia Agronom.* 45(3):558-565.
- Walpole, R.E. 1995. Pengantar statistika ed ke-3. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Wongtiem, P., D. Courtois, B. Florin, M. Juchaux, D. Peltier, P. Broun, J.P. Ducos. 2011. Effects of cytokinins on secondary somatic embryogenesis of selected clone Rayong 9 of *Manihot esculenta* Crantz for ethanol production. *Afr J Biotechnol.* 10(9):1600-1608.