

Pengaruh Komposisi Media dan Ukuran Eksplan terhadap Pembentukan Kalus Embriogenik Beberapa Genotip Lokal Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz)

Effect of medium composition and explant size on embryogenic calli formation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) local genotypes

DODY PRIADI*, ENNY SUDARMONOWATI

Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor 16911

Diterima: 22 April 2006. Disetujui: 10 Juni 2006.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important tropical crop species used for human consumption, feed and raw material for various industries. Genetic transformation through embryogenic tissues is known as an effective method for cassava genetic improvements. Objective of this study was to obtain a suitable medium and length of explants to induce embryogenic callus on friable embryogenic callus (FEC) as a target for genetic transformation. Immature leaf lobes (1-3 mm, 3-5 mm and larger than 5 mm in length) of local genotypes of cassava (Adira 4, Menti, Iding, Gebang, Rawi and Timtim-29) cultured *in vitro* were used as explants. The explants were incubated for 2 and 4 weeks on MS (Murashige-Skoog) or GD (Greshooff & Doy) semi solid medium containing 10 mg/L picloram, 6 mg/L NAA supplemented with 4% sucrose and 4 μ M CuSO₄. Results showed that the highest percentage (100%) of embryogenic calli formation for 4 weeks obtained by culturing Iding of 3-5 mm length on GD semi solid medium, whereas the lowest (33%) one obtained by incubation 5 mm leaf lobe of Timtim-29 on the same medium. The most suitable medium for callus induction was GD, whereas the optimum length of explants was 5 mm or larger. Further study needs to be done to obtain friable embryogenic calli (FEC) by employing different concentration of picloram and varying other critical factors.

© 2006 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: *Manihot esculenta* Crantz, cassava, medium, embryogenic, callus.

PENDAHULUAN

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) adalah tanaman daerah tropik yang dapat tumbuh di berbagai kondisi tanah, bahkan pada tanah yang tidak subur sekalipun (Priadi *et al.*, 2004). Perbanyakannya ubi kayu dilakukan secara vegetatif sehingga vigor dan produktivitasnya dapat dipertahankan (Roca *et al.*, 2000). Umbi ubi kayu mengandung sumber karbohidrat (termasuk pati) untuk pangan dan pakan serta untuk bahan baku berbagai macam industri. Berbagai penelitian pemuliaan telah dilakukan untuk memperoleh tanaman ubi kayu unggul yang mempunyai kandungan amilose dan amilopektin yang tepat sesuai dengan tujuannya, baik untuk pangan maupun industri. Salah satu teknik untuk meningkatkan mutu genetik ubi kayu adalah dengan rekayasa genetik. Menurut Zhang *et al.* (2001), rekayasa genetik ubi kayu mempunyai potensi yang besar untuk melengkapi teknik pemuliaan tradisional dalam menghasilkan bibit yang tahan terhadap hama dan penyakit atau meningkatkan mutu umbinya. Pemuliaan ubi kayu secara tradisional seringkali mengalami kesulitan diantaranya karena heterozigositas yang tinggi dan secara alami mempunyai fertilitas yang rendah (Li *et al.*, 1996).

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 media yang efektif untuk transformasi genetik melalui teknik *particle bombardment* maupun *Agrobacterium*. Joseph *et al.* (2004) juga menggunakan kalus embriogenik sebagai bahan penelitian induksi mutasi pada ubi kayu melalui iradiasi sinar- γ . Eksplan yang berasal dari jaringan somatik seperti daun pucuk 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. Dilaporkan oleh Joseph *et al.* (2000) bahwa kalus embriogenik juga telah berhasil diinduksi dari daun pucuk muda kerabat ubi kayu penghasil getah yaitu *Manihot glaziovii* Muell. Arg.

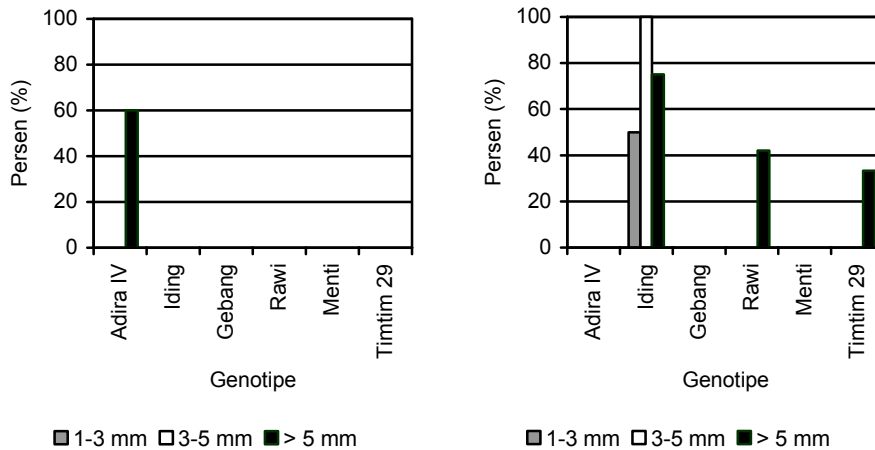
Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh komposisi media dan ukuran eksplan yang tepat untuk induksi kalus embriogenik khususnya *friable embryogenic callus* (FEC) yang akan digunakan sebagai target transformasi genetik.

BAHAN DAN METODE

Sumber eksplan

Genotip ubi kayu yang digunakan sebagai bahan penelitian berasal dari berbagai daerah di Indonesia dan ditanam di Kebun Plasma Nutfah Puslit Bioteknologi-LIPI,

* Alamat korespondensi:
Jl. Raya Bogor Km.46 Cibinong 16911
Tel. +62-21-8754587, Fax. +62-21-8754588
e-mail: d_priadi@telkom.net



Gambar 1. Pembentukan kalus embriogenik dari daun pucuk ubi kayu yang diinduksi pada media A. MS dan B. GD

Cibinong, Jawa Barat. Eksplan yang digunakan adalah daun pucuk yang masih kuncup dalam berbagai macam ukuran (1-3 mm, 3-5 mm dan >5 mm) berasal dari stek ubi kayu yang ditumbuhkan secara *in vitro* pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh. Genotip ubi kayu yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Genotip ubi kayu bahan penelitian

Genotip	Asal koleksi	Peruntukan
Adira 4	Cibinong, Jawa Barat	Industri/pakan
Menti	Wonosari, Jawa Timur	Pangan
Iding	Cibinong, Jawa Barat	Pangan
Gebang	Cibinong, Jawa Barat	Pangan
Rawi	Balit Tanaman Pangan, Bogor	Pangan
Timtim 29	Bobonaro, Timor Timur	Pangan

Media

Eksplan ditanam pada media dengan komposisi berbeda yaitu: Media GD (Gresshoff dan Doy) (*Duchefa Biochemie BV*) atau MS (Murashige dan Skoog) yang ditambah dengan 10 mg/L picloram, 6 mg/L NAA, 4% sukrosa, 4 µM CuSO₄. Sebelum disterilisasi, media diatur pHnya menjadi 5,8 dan dipadatkan dengan 0,8% agar Oxoid No.1. Media disterilisasi menggunakan otoklaf pada suhu 121°C (1,5 atm) selama 20 menit. Kultur yang menghasilkan kalus berbentuk globular ditransfer ke media yang sama seperti semula tetapi dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang lebih rendah, 6 mg/L picloram dan 0,5 mg/L NAA atau ke media MS tanpa zat pengatur tumbuh (MS0). Kultur dipelihara di dalam ruang kultur (25°C) tanpa cahaya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh media

Pada ubi kayu terdapat dua jenis embriogenesis somatik, yaitu embriogenesis sekunder dan *friable embryogenic callus* (FEC) (Raemakers *et al.*, 2001). FEC adalah ratusan embrio globular yang terbenam dalam suatu bahan lunak sel-sel hyalin (Lopez *et al.*, 2001). Hasil pengamatan pertumbuhan kalus setelah eksplan diinkubasi ada media MS dan GD selama 2 minggu menunjukkan bahwa hanya genotip Iding, Gebang dan Menti yang

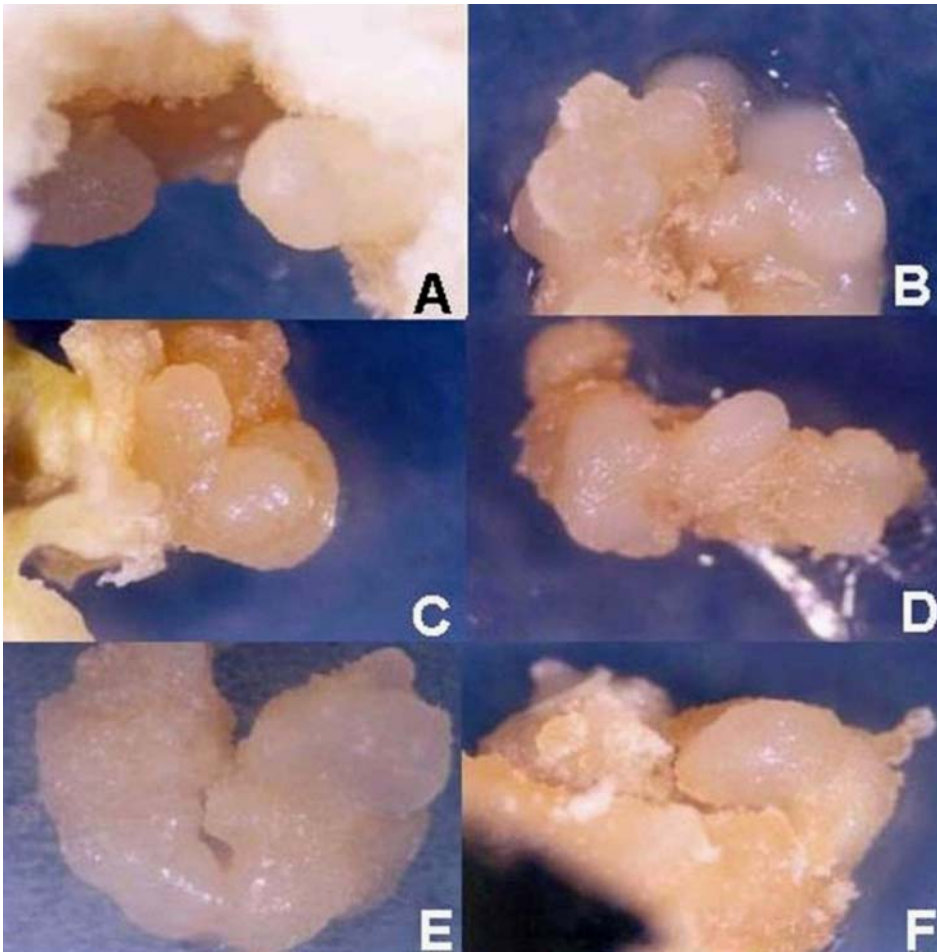
berhasil membentuk kalus, sedangkan sisanya belum menunjukkan adanya pertumbuhan. Media MS maupun GD berhasil menginduksi kalus Gebang, tetapi kalus Iding hanya berhasil diinduksi pada media MS, sedangkan kalus Menti berhasil diinduksi pada media GD. Pengamatan pertumbuhan kalus setelah 27 hari inkubasi menunjukkan bahwa hampir semua genotip ubi kayu dapat membentuk kalus yang berwarna putih kekuning-kuningan, kecuali pada genotip Adira 4 (60%) yang berasal dari eksplan berukuran lebih dari 5 mm

yang diinkubasi pada media MS dan genotip Rawi (42%) dengan ukuran eksplan yang sama tetapi diinkubasi pada media GD (Tabel 2 dan Gambar 1).

Tabel 2. Pengamatan induksi kalus beberapa genotip ubi kayu lokal

Genotipe	Media	Ukuran daun (mm)	Eksplan membentuk kalus (%)	
			Inkubasi 2 minggu	Inkubasi 4 minggu
Adira 4	MS	1-3	*	100
		3-5	*	100
		>5	*	60
	GD	1-3	*	100
		3-5	*	100
		>5	*	100
Iding	MS	1-3	100	100
		3-5	100	100
		>5	100	100
	GD	1-3	0	100
		3-5	0	100
		>5	0	100
Gebang	MS	1-3	100	100
		3-5	0	100
		>5	100	100
	GD	1-3	100	100
		3-5	100	100
		>5	100	100
Rawi	MS	1-3	0	100
		3-5	0	100
		>5	0	100
	GD	1-3	0	100
		3-5	0	100
		>5	0	42
Menti	MS	1-3	0	100
		3-5	0	100
		>5	0	100
	GD	1-3	100	100
		3-5	100	100
		>5	100	100
Timtim 29	MS	1-3	0	100
		3-5	0	100
		>5	0	100
	GD	1-3	0	100
		3-5	0	100
		>5	0	100

Keterangan: *) = tidak dilakukan karena sampel terbatas. MS = Basal MS +10 mg/L picloram + 6 mg/L NAA + 4% sukrosa + 4 µM CuSO₄. GD = Basal Greshoff dan Doy +10 mg/L picloram + 6 mg/L NAA + 4% sukrosa + 4 µM CuSO₄



Gambar 2. Kalus embriogenik beberapa genotip ubi kayu yang diinduksi dari berbagai ukuran eksplan daun dan diinkubasi pada media berbeda, A. Adira 4 (lebih dari 5 mm, MS), B. Iding (lebih dari 5 mm, GD), C. Timtim 29 (lebih dari 5 mm, GD), D. Iding (1-3 mm, GD), E. Iding (3-5, GD), dan F. Rawi (lebih dari 5 mm, GD)

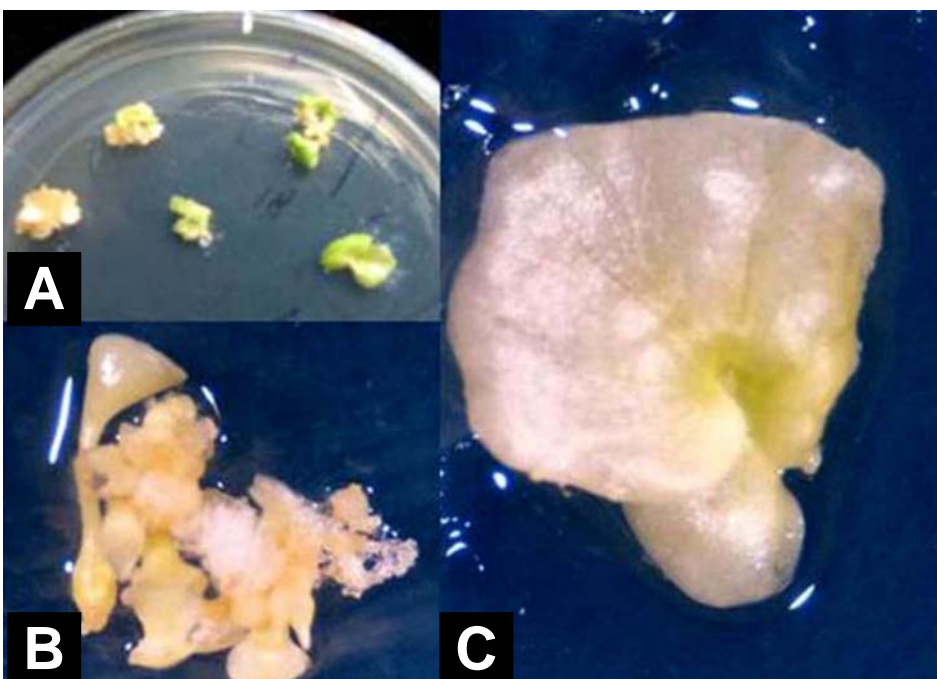
dalam menginduksi eksplan daun pucuk ubi kayu menjadi kalus embriogenik pada sebagian besar genotip ubi kayu yang digunakan pada penelitian ini. Penelitian Taylor *et al.* (1996) menunjukkan bahwa media GD yang ditambah picloram telah berhasil dalam menginduksi kalus embriogenik ubi kayu secara efisien, sedangkan media MS komposisi penuh maupun setengah komposisi direkomendasikan untuk diferensiasi dan perkembangan embrio somatik ubi kayu yang mampu berkecambah (Groll *et al.*, 2002).

Menurut Danso dan Lloyd (2002) penambahan CuSO_4 pada media dapat meningkatkan induksi embrio primer dan meningkatkan produksi embrio sekunder serta dapat mempersingkat waktu pematangan embrio somatik menjadi 25 hari sejak inisiasi embrio. Penambahan unsur logam lain seperti seng (Zn) pada media GD telah terbukti mempunyai pengaruh yang baik terhadap embriogenesis somatik (Raemakers *et al.*, 2001). Penambahan senyawa AgNO_3 pada media dapat meningkatkan frekuensi regenerasi dan mengurangi pembentukan kalus (Zhang *et al.*, 2001).

Setelah diinkubasi selama 7 hari, eksplan ditransfer ke media yang konsentrasi zat pengatur tumbuhnya diturunkan menjadi 6mg/L picloram dan 0,5 mg/L NAA.

Pengaruh ukuran eksplan

Inkubasi selama 2 minggu pada media MS maupun GD menunjukkan bahwa genotip Gebang dapat menghasilkan kalus (100%) pada semua ukuran eksplan kecuali yang berukuran 3-5 mm pada media MS. Eksplan genotip Iding dalam berbagai ukuran dapat menghasilkan kalus pada media MS tetapi belum membentuk kalus pada media GD. Eksplan genotip Menti dalam berbagai ukuran yang diinkubasi pada media GD dapat menghasilkan kalus tetapi pada media MS belum



Gambar 3. Perkembangan kalus embriogenik genotip Iding setelah ditransfer ke media MS0. A. Embrio somatik yang membentuk kecambah, B. Kumpulan kecambah yang tumbuh dari embrio somatik, dan C. Kecambah yang telah dipisahkan

membentuk kalus. Genotip Rawi dan Timtim 29 yang diinkubasi selama 2 minggu pada media MS maupun GD belum dapat menghasilkan kalus. Hal ini menunjukkan bahwa setiap genotip ubi kayu memerlukan periode tertentu untuk inisiasi pembentukan kalus, terbukti pada genotip yang sama setelah diinkubasi selama 4 minggu, semuanya dapat membentuk kalus. Faktor lain yang berpengaruh terhadap inisiasi pembentukan kalus adalah zat pengatur tumbuh. Penelitian Joseph *et al.*, (2001) menunjukkan bahwa eksplan pucuk ubi kayu genotip PRC 60a, M Col 22 dan Putih yang diinkubasi pada media MS yang mengandung 4 μ M 2,4-D tanpa cahaya selama 1 minggu sudah dapat menghasilkan kalus, tetapi embrio somatik berbentuk globular dapat terbentuk setelah 4 minggu.

Eksplan yang diinkubasi selama 4 minggu hampir semuanya menghasilkan kalus pada semua genotip, tetapi kalus yang berhasil berkembang menjadi kalus embriogenik terjadi hanya pada genotip Iding, Rawi dan Menti. Pada umumnya kalus embriogenik berhasil diinduksi dari eksplan berukuran lebih dari 5 mm, kecuali pada genotip Iding yang menghasilkan kalus embriogenik dari tiga kisaran ukuran eksplan yang dicoba. Persentase kalus embriogenik tertinggi (100%) ditunjukkan oleh genotip Iding yang berasal dari ukuran eksplan 3-5 cm yang diinkubasi pada media GD, sedangkan terendah (33%) ditunjukkan oleh genotip Timtim 29 yang berasal dari ukuran eksplan lebih dari 5 mm yang diinkubasi pada media yang sama (Gambar 1B). Szabados *et al.* (1987) menyatakan bahwa setiap varietas ubi kayu mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menghasilkan kalus embriogenik. Respon tanaman untuk menghasilkan tunas baru (multiplikasi tunas) atau kalus embriogenik bervariasi bergantung kepada banyak faktor antara lain bagian tanaman yang digunakan, umur fisiologis bagian tersebut atau umur pohon induk, jenis tanaman dan prosedur perbanyakan termasuk jenis zat pengatur tumbuh yang ditambahkan pada media (Sudarmonowati *et al.*, 2002). Penampilan kalus embriogenik beberapa genotip ubi kayu dapat dilihat pada Gambar 2.

Kalus embriogenik yang telah terbentuk, kemudian ditransfer ke media MS tanpa zat pengatur tumbuh (MS0) dan ditransfer ke media segar setiap 2 bulan. Beberapa kalus embriogenik Iding telah berkembang ke tahap pembentukan embrio somatik tetapi tidak semua embrio berbentuk globular menjadi bentuk torpedo untuk berkecambah. Kondisi perkembangan seperti itu terjadi juga pada genotip M Col 22 (Raemakers *et al.*, 1993). Perkembangan kalus embriogenik ditunjukkan pada Gambar 3.

KESIMPULAN

Baik media MS maupun GD dapat menginduksi kalus friable, tetapi hanya media GD yang lebih efektif untuk menginduksi kalus embriogenik semua genotip ubi kayu yang digunakan sebagai bahan penelitian. Sebagian besar

kalus embriogenik dihasilkan dari eksplan yang berukuran lebih dari 5 mm yang diperoleh dari daun pucuk tanaman yang dipelihara *in vitro*. Persentase kalus embriogenik tertinggi (100%) diperoleh dari genotip Iding, sedangkan terendah (33%) diperoleh dari genotip Timtim 29. Genotip Iding relatif lebih responsif terhadap media GD bila dibandingkan dengan genotip lain, walaupun perlu penelitian lanjutan yang membandingkan perlakuan lain yang lebih bervariasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Danso, K. and B. Ford-Lloyd. 2002. Induction of high-frequency somatic embryos in cassava for cryopreservation. *Plant Cell Reports* 21 (3): 226-232.
- Groll, J., D.J. Mycock and V.M. Gray. 2002. Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Annals of Botany* 89: 645-648.
- Joseph, R., H.-H. Yeoh, C.-S. Loh. 2004. Induced mutations in cassava using somatic embryos and the identification of mutant plants with altered starch yield and composition. *Plant Cell Reports* 23: 91-98.
- Joseph, T., H.-H. Yeoh and C.-S. Loh. 2000. Somatic embryogenesis, plant regeneration and cyanogenesis in *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (ceara rubber). *Plant Cell Reports* 19: 535-538.
- Joseph, T., H.-H. Yeoh and C.-S. Loh. 2001. Linamarin content and genetic stability of cassava plants derived by somatic embryogenesis. *Euphytica* 120: 7-13.
- Li, H.Q., C. Sautter, I. Potrykus and J.P. Kaerlas. 1996. Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology* 14: 736-740.
- Lopez, D., P. Chavarriaga and W.M. Roca. 2001. *Development of Friable Embryogenic Callus (FEC) and Regeneration of Plants of Cassava Cultivar Mco12215 (Venezolana)*, www.redbio.org/portall/encuentros/enc_2001/posters/07/pdf/Sin%20registro3.pdf
- Priadi, D., R. Hartati, S. Jitno Rijadi dan E. Sudarmonowati. 2004. Karakterisasi dan uji organoleptik ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) Indonesia. *Dinamika Pertanian* 19 (2): 150-159.
- Raemakers, C.J.J.M., M. Amati, G. Staritsky, E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 1993. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Annals of Botany* 71: 289-294.
- Raemakers, K., C. Bazin and R. Visser. 2001. *The Effect of Zinc on Somatic Embryogenesis in Cassava*. www.cost843.org/html/WG2-Greece-2001
- Roca, W.M., D. Deboucq, R.H. Escobar, G. Mafía and M. Fregene. 2000. Cryopreservation and cassava germplasm conservation at CIAT. In: Engelmann, F and H. Takagi (eds.). *Proceedings of Cryopreservation of Tropical Germplasm. Current Research Progress and Application*, October 20-23, 2000. JIRCAS-IPGRI Tsukuba, Japan: 273-279.
- Sudarmonowati, E., R. Hartati dan T. Taryana. 2002. Produksi tunas, regenerasi dan evaluasi hasil Ubi kayu (*Manihot esculenta*) Indonesia asal kultur jaringan di lapang. *Natur Indonesia* 4 (2): 96-108
- Szabados, L., R. Hoyos and W. Roca. 1987. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Reports* 6 (3): 248-251.
- Taylor, N.J., M. Edwards, R.J. Kiernan, C.D.M. Davey, D. Blakesley and G.G. Henshaw. 1996. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology* 14: 726-730.
- Taylor, N.J., M.V. Masona, R. Carcamo, T. Ho, C. Schöpke and 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. Mafía and C. Hernandez. 1999. Can in vitro biology have farm-level impact for small-scale cassava farmers in latin America? *In Vitro Cell Developmental Biology of Plant* 35 (5): 382-387.
- Zhang, P., S. Phansiri and J.P. Kaerlas. 2001. Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 47-54.